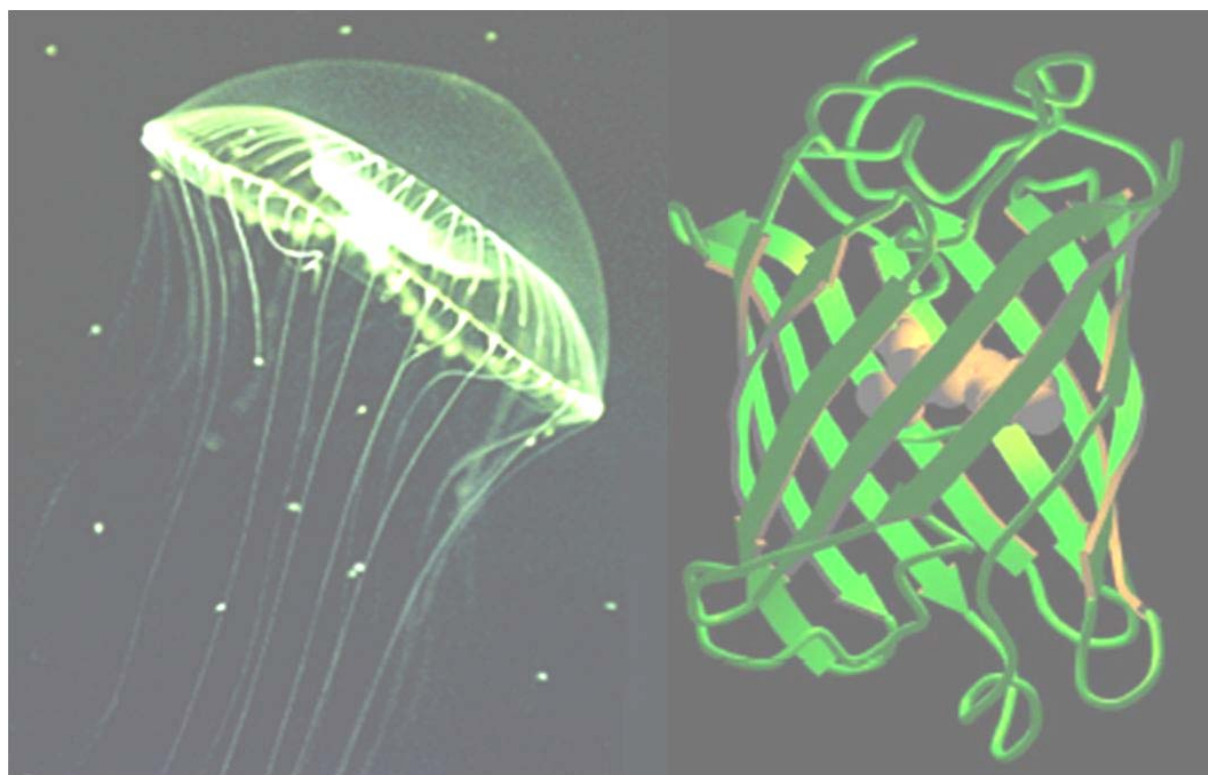


Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos

Por

Marcele Neves Rocha



Belo Horizonte

Fevereiro de 2009

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR

M. N. ROCHA 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos

Por

Marcele Neves Rocha

**Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título Mestre em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares**

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R672d Rocha, Marcele Neves.
2009

Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos, ou, Development of fluorescent species of *Leishmania* and characterization of the susceptibility of *L. amazonensis* GFP as model for chemotherapeutic tests / Marcele Neves Rocha. – Belo Horizonte, 2009.

xvii, 66 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 66 - 83

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose/quimioterapia 2. Imunofluorescência/métodos 3. Transfecção/instrumentação 4. Fluorometria/utilização I. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos

por

Marcele Neves Rocha

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Presidente)

Profa. Dra Maria Terezinha Bahia (UFOP)

Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (CPqRR)

Suplente: Dra. Célia Maria Gontijo (CPqRR)

Dissertação defendida e aprovada em: 26/02/2009

Você é o que você faz.

Suas crenças e valores não são o que você diz. São o que você faz. Suas ações têm o dom de comunicar intensamente com uma veracidade difícil de negar ou ignorar.

O sucesso e as conquistas requerem a substância das ações, que é necessariamente o que parece ou o que gostaria de ser. E sim o que faz.

Suas ações revelam a dedicação e as verdadeiras prioridades na sua vida. Elas criam a substância da sua vida e fazem toda a diferença no mundo, estando completamente sob o seu controle. Sua qualidade de vida é determinada pela qualidade e consistência das suas ações.

Então tome ações positivas todos os dias, como se sua vida dependesse disso. Porque ela depende.

Ralph H Marston

Agradecimentos

À Deus, por me dar uma vida cheia de encanto e aprendizado, principalmente os do caminho da ciência, fazendo-me valorizar, cada vez mais, a cada passo, a vida.

À minha família linda e essencial, que mesmo de longe, sempre tão presente, fazendo-me sentir o que é o verdadeiro amor. À minha mãe Maria Rosalina que me encoraja, anima, afaga, e que, a cada palavra, mostra que a vida é para aqueles que têm coragem. Aos meus irmãos, Michel, Marcel e Michela pelo amor incondicional e por seus esforços imensos para que eu sempre conquistasse os meus sonhos. Apoiando e incentivando sempre a seguir em frente. Aos primos Adriano, Viviani, Juliana, Rayssa, Christiani que proporcionaram momentos inesquecíveis nesta cidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr^o. Rodrigo pela acolhida calorosa, pela enorme competência e valiosa orientação. Por todo apoio e alegria frente aos resultados obtidos com este trabalho contribuindo enormemente para o meu amadurecimento científico. Minha gratidão, admiração e respeito imensuráveis.

Ao Dr^o Paulo Pimenta, chefe do laboratório pelo apoio em todos os momentos e à todos do Laboratório de Entomologia Médica (Alessandra, Ana Carolina, Ana Flávia, Ana Paula, Andrezza, Breno, Bruno, Caroline, Carol Cunha, Daniella, Erika, Felipe, Fernanda Gambogi, Guilherme, Helena, Igor, Janes, Klívia, Kenia, Luciana, Maira, Nágila e Rafael) que sempre me ajudaram no trabalho diário, que tanto me fizeram rir nos momentos de desespero, quanto me aguentarem nos momentos de alegria. Em especial a Dr^a Carina por sua alegria sempre constante, pela amizade, apoio e partilha de vida. E as preciosas amigas Junara e Vanessa por todo incentivo, amor, alegria e por acreditar que tudo isso seria possível.

À toda equipe do Laboratório de Malária pela agradável convivência, apoio sempre presente e ajuda em todos os momentos.

Ao amigo, professor e primo Dr^o Fernando Varotti por ter sido o primeiro responsável por me iniciar na vida científica da cultura celular. Obrigada por tudo.

Aos amigos de mestrado Antônio, Tati e Sabrina não só pelo convívio durante as aulas, mas também nos churrascos e principalmente no clube da peteca. A amiga Fernanda Freire pelos conselhos e sempre disposta a escutar meus desabaços pessoais, muito obrigada miguinha.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo apoio estrutural e financeiro.

À Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade deste curso.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

À Dr^a Ana Paula Madureira pela ajuda nas análises estatísticas e ao Dr^o Olindo Assis no citômetro de fluxo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me acompanharam durante a realização deste trabalho, por proporcionarem um ambiente de estímulo, amor, partilha, respeito e seriedade. Por me ajudarem a converter toda a grandiosidade de cada minuto, cada pensar e agir, nesta dissertação que guarda muito mais do que sua valiosa contribuição científica, a minha realização profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 As Leishmanioses	18
1.2 Ciclo biológico	20
1.3 Controle das Leishmanioses	21
1.4 Tratamento e mecanismos de resistência	23
1.4.1 Antimoniais pentavalentes.....	23
1.4.2 Anfotericina B.....	25
1.4.3 Miltefosina (hexadecilfosfocolina).....	26
1.4.4 Pentamidinas.....	27
1.4.5 Outras drogas (paromomicina, azitromicina, compostos azóis, alopurinol).....	28
1.5 Busca por novos agentes antiparasitários	31
1.6 O método tradicional de testes de drogas	32
1.7 A tecnologia do gene repórter	33
1.7.1 Sistemas colorimétricos.....	33
1.7.2 Sistemas luminescentes e fluorescentes.....	34
1.8 Justificativa	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Cepas e cultura de <i>Leishmania</i>	38
3.2 Transfecção dos parasitos	38
3.2.1 Plasmídeo B5793.....	38
3.2.2 Clonagem e produção dos plasmídeos.....	39
3.2.3 Eletroporação de <i>Leishmania</i> spp.....	40
3.2.4 Clonagem de <i>Leishmania</i>	40
3.3 Avaliação da produção de fluorescência por Microscopia laser confocal - MLC	40
3.4 Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo (FACS)	41

3.5 Avaliação Biológica	41
3.5.1 Curvas de crescimento em meio M199.....	41
3.5.2 Obtenção de macrófagos murinos.....	41
3.5.3 Infecção de macrófagos.....	42
3.6 Teste quimioterápico tradicional	42
3.6.1 Plaqueamento dos macrófagos.....	42
3.6.2 Exposição à Anfotericina B e Glucantime.....	42
3.6.3 Exposição às moléculas derivadas do Propranolol.....	42
3.7 Síntese dos derivados do propranolol	43
3.8 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Digestão do plasmídeo B5793	48
4.2 Detecção da expressão da proteína GFP nas formas promastigotas	48
4.3 Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo (FACS)	49
4.4 Avaliação da emissão de fluorescência por amastigostas intracelulares	51
4.5 Avaliação biológica	52
4.5.1 Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> WT e GFP.....	52
4.5.2 Avaliação dos níveis de infectividade.....	53
4.6 Teste quimioterápico tradicional	53
4.6.1 Tratamento com drogas tradicionais.....	54
4.6.1.1 Anfotericina B.....	54
4.6.1.2 Glucantime.....	55
4.6.2 Moléculas derivadas do Propranolol.....	56
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figuras da capa: Alga marinha <i>Aequoria Victoria</i> e estrutura da proteína verde fluorescente (GFP).....	i
Figura 1: Formas Amastigotas dentro do macrófago (A) e Promastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.....	20
Figura 2: Estrutura química do Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostan®).....	24
Figura 3: Mecanismo de ação e resistência ao glucantime em formas amastigotas de <i>Leishmania</i> . Legenda: SbIII– antimoniato trivalente, SbV– -antimoniato pentavalente, AQP1- aquagliceroporina, MRPA- transportador. Fonte: Ouellette <i>et al.</i> , 2004.....	25
Figura 4: Mecanismo de ação e resistência da Miltefosina (A), Pentamidina (B) e Anfotericina B (C). Legenda: ATP- adenosina trifosfato, ADP- adenosina difosfato. Fonte: Ouellette <i>et al.</i> , 2004.....	26
Figura 5: Estrutura química da Pentamidina.....	28
Figura 6: Estrutura química da Paromomicina.....	29
Figura 7: Mapa do plasmídeo B5793.....	39
Figura 8: Obtenção de β -bloqueadores. Reação do sal de potássio do naftol, gerado <i>in situ</i> seguido pela adição de epícloridrina.....	44
Figura 9: Estrutura química do Propranolol e síntese de análogos da fenoxipropanolaminas.....	45
Figura 10: Substâncias sintetizadas a partir da modificação do propranolol.....	46
Figura 11: Derivados obtidos a partir da simplificação do anel naftaleno do propranolol.....	46
Figura 12: Digestão do plasmídeo B 5793 com a enzima <i>Swa I</i> em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) M- marcador de 1kb, A) amostra 1, B) amostra 2.....	48

Figura 13: Visualização de promastigotas das quatro espécies de <i>Leishmania</i> transformadas com a Proteína verde fluorescente (GFP) no Microscópio Laser Confocal (488 nm). A) <i>L. amazonensis</i> B) <i>L. chagasi</i> , C) <i>L. braziliensis</i> , D) <i>L. guyanensis</i> . Controle negativo <i>L. chagasi</i> WT: E) DIC (Contraste por Interferência Diferencial) e F) 488 nm.....	49
Figura 14: Avaliação dos parâmetros tamanho e granulosidade de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> pela citometria de fluxo. WT, tipo selvagem e GFP, transformada.....	50
Figura 15: Avaliação dos parâmetros tamanho e granulosidade de formas promastigotas de <i>L. guyanensis</i> e <i>L. braziliensis</i> pela citometria de fluxo. WT, tipo selvagem e GFP, transformada.....	50
Figura 16: Análise comparativa da emissão de fluorescência de formas promastigotas WT (preto) e GFP (verde) no citômetro de fluxo. A) <i>L. amazonensis</i> , B) <i>L. chagasi</i> , C) <i>L. braziliensis</i> e D) <i>L. guyanensis</i>	51
Figura 17: Visualização da fluorescência em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> GFP em macrófagos murinos (Balb/c) no Microscópio Laser Confocal (488 nm). A) DIC (Contraste por Interferência Diferencial) e B) 488 nm.....	52
Figura 18: Curvas de crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . WT (verde) e GFP (preto).....	52
Figura 19: Teste quimioterápico tradicional <i>in vitro</i> . Susceptibilidade de <i>L. amazonensis</i> WT à Anfotericina B em macrófagos murinos (Balb/c) corados pelo método Panótipo Rápido. A) Controle positivo, B) 1µg/ml, C) 0,5µg/ml, D) 0,25µg/ml, E) 0,12µg/ml, F) 0,06µg/ml.....	54
Figura 20: Curvas de IC ₅₀ de Anfotericina B frente <i>L. (L.) amazonensis</i> . A) Cepa WT, B) Cepa GFP.....	55
Figura 21: Curvas de IC ₅₀ de Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) frente <i>L. (L.) amazonensis</i> . A) Cepa WT, B) Cepa GFP.....	56

Figura 22: Curvas de IC₅₀ de UFOP 1 frente *L. (L.) amazonensis*. A) Cepa WT, B) Cepa GFP.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índices Médios de Fluorescência (IFM) observados para as quatro espécies de <i>Leishmania</i> selvagens (WT) e transfectadas (GFP).....	51
Tabela 2: Porcentagens médias de células infectadas obtidas em diferentes doses de Anfotericina B ($\mu\text{g/ml}$) nas cepas selvagem (WT) e transformada (GFP).....	55
Tabela 3: Porcentagens médias de células infectadas obtidas em diferentes doses de Glucantime ($\mu\text{g/ml}$) nas cepas selvagem (WT) e transformada (GFP).....	56
Tabela 4: Porcentagens médias das células infectadas obtidas em diferentes doses da molécula UFOP 1 ($\mu\text{g/mL}$) nas cepas selvagem (WT) e transformadas (GFP).....	57
Tabela 5: Valores de IC_{50} observados para <i>L. amazonensis</i> (WT e GFP) frente a drogas tradicionais e moléculas teste obtidos à partir da porcentagem de células infectadas (esquerda) e das médias dos valores de IC_{50} (direita).....	58
Tabela 6: Drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses (Fonte: Croft <i>et al.</i> , 2006).....	60
Tabela 7: Espécies de <i>Leishmania</i> expressando gene reporter.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

- μg = Microgramas
- ADP**= Difosfato de adenosina
- AmB**= Anfotericina B
- ACR2**= enzima antimônio redutase
- AQP1**= Aquagliceroforina
- ATP**= Trifosfato de adenosina
- CAT**= Cloranfenicol acetiltransferase
- CEUA**= Comissão de Ética no Uso de Animais
- COBEA**= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- DIC**= Contraste por Interferência Diferencial
- DNA**= Ácido desoxiribonucléico
- EDTA**= Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FACS**= Citometria de Fluxo (FACS) (Fluorescence-activated cell sorter)
- FITC**= Isotiocianato de fluoresceína
- GFP**= Proteína verde fluorescente
- HIV**= Vírus da imunodeficiência humana
- IC₅₀**= Concentração inibitória de 50 %
- IMF**= Índice médio de fluorescência
- kDNA**= Ácido desoxiribonucléico cinetoplasmático
- LC**= Leishmaniose cutânea
- LCD**= Leishmaniose cutâneo difusa
- LM**= Leishmaniose mucosa
- LMC**= Leishmaniose muco-cutânea
- LPG**= Lipofosfoglicano
- LT**= Leishmaniose tegumentar
- LV**= Leishmaniose visceral
- LV-HIV**= Leishmaniose visceral- vírus da imunodeficiência humana
- M199**= Meio 199
- MDR1**= Resistência a várias drogas
- ml**= Mililitro
- MLC**= Microscopia Laser Confocal
- mM**= Milimolar
- MØ**= Macrófago

MP= Matriz peritrófica
nm= Nanômetro
NMG= Antimoniato de N-metilglucamina
ODC= ornitina descarboxilase
OMS= Organização Mundial de Saúde
PBS= Tampão fosfato/salina (“Phosphate Buffer Saline”)
PB= pares de base
PKDL= Leishmaniose dérmica pós calazar (“Post-kala-azar dermal leishmaniasis”)
QSAR= Estudos quantitativos de relação estrutura atividade
RNA= Ácido ribonucléico
RPMI= Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
rRNA= Ácido ribonucléico ribossomal
SAMDC= *S*-adenosilmetionina descarboxilase
SbIII= Antimonial trivalente
SbV= Antimonial pentavalente
SEAP= Fosfatase alcalina secretada
SFB= Soro Fetal Bovino
SGS= Estibogluconato de sódio
SSU'= subunidade pequena do gene RNA no locus do DNA ribossomal (small subunit RNA gene in rDNA locus)
Transportador ABC= grande família de proteínas de transporte de membrana caracterizada por um domínio de ligação ATP altamente conservado
TDR1= tripanotiona redutase
WT= Tipo selvagem (wild-type)

RESUMO

As Leishmanioses estão entre as doenças tropicais mais importantes classificadas pela Organização Mundial de Saúde como doenças negligenciadas. Seu controle é baseado no tratamento de casos humanos, borrifação com inseticidas e eliminação dos reservatórios quando possível. Entretanto, a quimioterapia das Leishmanioses apresenta algumas dificuldades tais como: toxicidade dos medicamentos disponíveis, via de administração e resistência natural de algumas cepas. O método de teste de drogas tradicional *in vitro* apresenta limitações por ser laborioso e sujeito a variações individuais do observador. Devido a estes obstáculos a procura de novas drogas e desenvolvimento de métodos faz-se necessária. Por isso é importante o estabelecimento de um método semi-automatizado para teste de drogas em *Leishmania*. Para que isto seja alcançado utilizou-se de técnicas de biologia molecular como a inserção de um fenótipo no protozoário permitindo sua detecção em um aparelho. Neste trabalho, produzimos cepas de *Leishmania* expressando a proteína verde fluorescente (“*green fluorescent protein*”- GFP). Essa proteína foi transfectada nas espécies brasileiras de maior importância médica: *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Para confirmar a transfecção, os parasitos selvagens (WT) e transformados (GFPs) foram analisados pela Citometria de Fluxo (FACS) e Microscopia Laser Confocal (LCM). Para avaliar se a transfecção teve algum impacto na viabilidade celular de *L. amazonensis* foram realizados alguns ensaios biológicos como a comparação da curva de crescimento e infectividade em macrófagos entre as cepas selvagem e GFP. Posteriormente foi verificada a susceptibilidade à drogas. *L. amazonensis* foram expostas aos fármacos tradicionais e moléculas teste e os valores de IC₅₀ determinados. Não foram observadas diferenças na susceptibilidade entre as cepas tanto na presença dos fármacos tradicionais (Anfotericina B e Glucantime), como de moléculas teste (derivadas do propranolol). Baseado nos valores de IC₅₀ obtidos com o teste tradicional a transformação da cepa GFP de *L. amazonensis* não alterou suas características biológicas nem de susceptibilidade aos agentes leishmanicidas tradicionais e moléculas teste. Algumas moléculas derivadas do propranolol mostraram ser promissoras na atividade leishmanicida. Estes resultados dão suporte à utilização da cepa GFP nos testes semi-automatizados utilizando o fluorímetro. Isso possibilitará o teste de um número maior de fármacos/moléculas aumentando a eficiência do método quimioterápico atual.

ABSTRACT

The Leishmaniasis is between the most important tropical diseases classified by the World-wide Organization of Health as neglected diseases. Its control is based on the treatment of human cases, the elimination of the vector and reservoirs whenever it's possible. However, Leishmaniasis chemotherapy is hindered due to toxicity of available drugs, route of administration and resistance of natural strains. The traditional method for testing drugs *in vitro* presents limitations such as being laborious and subject to individual variations of the observer. Thus, the search of new drugs and the development of more accurate methods for their testing is still needed. Therefore, the establishment of a half-automatized method for testing drugs in *Leishmania* is important. To accomplish this goal we used molecular biology techniques such as the insertion of a phenotype in the protozoa, facilitating its detection. In this work, we produced strains of *Leishmania* expressing the green fluorescent protein (GFP). This protein was transfected in the most important species found in Brazil including: *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*. In order to confirm transfection, wild type (WT) and transfected parasites (GFP) were compared using Flow Cytometry (FACS) and Laser Confocal Microscopy (LCM). To evaluate the impact of transfection in drug susceptibility, WT and GFP strains of *L. amazonensis* were exposed to current drugs and test molecules and the IC₅₀ determined. There was no difference in such susceptibility between the strains not only in the presence of current antileishmanial drugs (Anfotericin B and Glucantime), but also in the presence of test molecules (derived from propranolol). Based on IC₅₀ values obtained in the traditional test, the GFP strain of *L. amazonensis* did not alter neither its biological properties nor its susceptibility to drugs. Some propranolol derivatives exhibit promising antileishmanial activity. These data support the use of GFP transfected parasites for drug screening procedures using a fluorimeter. This will enable the testing a higher number of drugs/molecules increasing efficiency of discovery of potential *Leishmania* chemotherapeutic drugs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são enfermidades antroponozoonóticas de transmissão vetorial causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Família: Trypanosomatidae, Ordem: Kinetoplastida). O gênero *Leishmania* foi criado por Ross em 1903 (Gontijo e Carvalho, 2003). São organismos unicelulares flagelados, cuja característica principal é a presença do cinetoplasto, organela junto à base do flagelo que contém sequências repetidas de DNA (kDNA) (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Possuem ampla distribuição e atualmente afetam cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, dos quais 500.000 desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhão a forma tegumentar a cada ano (Murray *et al.*, 2005). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco tanto no Novo como no Velho Mundo (Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005).

As leishmanioses são doenças negligenciadas (Desjeux, 2001, 2004; Bañuls *et al.*, 2007; Lynn & McMaster, 2008), que impactam a saúde pública e a economia dos países em desenvolvimento (Desjeux, 2004). A população mais afetada por essas doenças vive em áreas remotas, rurais, periferias urbanas e zonas de conflito (Yamey & Torreele, 2002). Nas últimas décadas, elas têm se estabelecido nas áreas urbanas e peri-urbanas, através da adaptação de seus vetores e reservatórios aos ambientes artificiais (Ashford, 2000).

As Leishmanioses são caracterizadas por um amplo espectro de manifestações clínicas existindo três formas principais: cutânea (LC), muco-cutânea (LMC) e visceral (LV). Dentre as LCs podemos ter ainda a forma difusa (LCD) causada por *Leishmania amazonensis* (Herwaldt, 1999). Além desta última, no Brasil, as espécies responsáveis pela incidência de maior número de casos clínicos são *Leishmania chagasi* (sin. *Leishmania infantum*), *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*. Por esta razão, neste trabalho daremos enfoque específico a estas quatro espécies.

No Novo Mundo, a LV é causada por *L. chagasi*, sendo encontrada desde o México até Argentina cuja distribuição coincide com a do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Grimaldi *et al.*, 1989). É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia, perda de peso, anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Nas últimas décadas, a LV vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, não só no Brasil como em outras partes do mundo (Gontijo & Melo 2004). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção, enquanto as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e

gambás (*Didelphis albiventris*) são os reservatórios silvestres (Sherlock *et al.*, 1985; Brasil, 2005). Atualmente, a LV ocorre em 20 dos 27 estados brasileiros destacando-se os da região Nordeste, onde ocorre a maior parte dos casos notificados (Brasil, 2008).

Assim como *L. chagasi*, *L. braziliensis* possui ampla distribuição nas Américas. É a principal espécie incriminada responsável pelas LCs e LMC. É caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos (Herwaldt, 1999). A frequência desta complicação vem sendo reduzida, provavelmente devido ao diagnóstico e tratamento precoces. Muitos aspectos da eco-epidemiologia desta espécie ainda são desconhecidos. Seus reservatórios principais incluem roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*). Seus principais vetores incluem *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* dependendo da região (Lainson & Shaw, 1978).

A *L. amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da LCD (Desjeux, 2004). Evidências indicam que roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* seriam os reservatórios desta espécie. Os flebotomíneos vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia) (Silveira *et al.*, 1997). Estas espécies são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana, estando associada com atividades ocupacionais ligadas à mata. Seu principal vetor, *L. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes *habitats* de países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em matas úmidas em densidades elevadas (Lainson, 1997).

Finalmente, *L. guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo estas últimas consequência de várias picadas simultâneas ou metástases linfáticas secundárias (Desjeux, 2004). É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie, atingindo principalmente indivíduos do sexo masculino em fase produtiva. É de natureza ocupacional relacionada ao desmatamento, penetração em áreas de florestas e exercícios militares. Em áreas endêmicas pode haver percentuais expressivos de crianças acometidas pela doença. O parasito já foi isolado de mamíferos silvestres, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*D. albiventris*), tendo sido encontrado na pele e vísceras. Embora o papel desempenhado por estes animais ainda não tenha sido definido, as evidências encontradas indicam que estes seriam os reservatórios. O principal vetor seria *Lutzomyia umbratilis* distribuída nos países

fronteiriços ao Brasil e também nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia (Lainson & Shaw, 1978).

1.2 Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* possui ciclo biológico heteroxênico, cujas formas de desenvolvimento alternam-se entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, que transmitem o parasito durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1979; Sacks & Perkins, 1984). Os hospedeiros invertebrados são dípteros da família Psychodidae, sub-Família Phlebotominae, representados pelos Gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). São observadas duas formas principais (Figura 1): as promastigotas (1-B), células flageladas alongadas encontradas no intestino médio do vetor e; amastigotas (1-A), constituindo-se de células imóveis, ovóides, com flagelo rudimentar encontradas no interior de fagócitos mononucleados de mamíferos, sendo responsáveis pela patologia da doença (Bates, 1994).

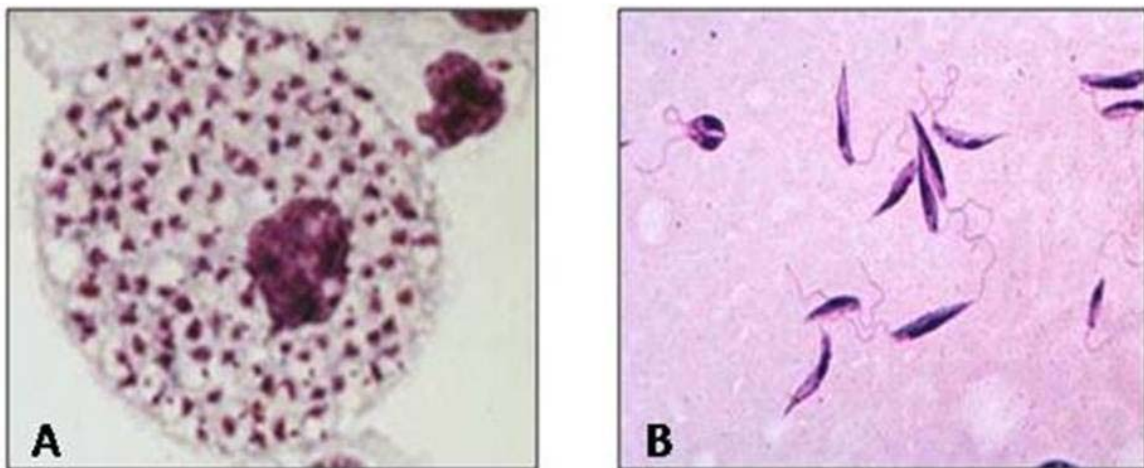


Figura 1: Formas Amastigotas dentro do macrófago (A) e Promastigotas (B) de *Leishmania* spp.

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre após a picada das fêmeas de flebotomíneos que inoculam as formas promastigotas metacíclicas (Killick-Kendrick, 1990). Estas são fagocitadas pelos macrófagos, diretamente ou após a infecção de neutrófilos (Van Zandbergen *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008) e diferenciam-se em formas amastigotas no fagolisossomo. As amastigotas dividem-se binariamente, rompendo a célula, podendo reinvadir outros macrófagos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos (Naderer & McConville, 2008). Para manutenção do seu ciclo intracelular, o parasito desenvolveu várias estratégias dentro da célula do hospedeiro. A forma amastigota é especialmente adaptada ao ambiente intracelular do vacúolo parasitóforo, estrutura que se assemelha aos lisossomos

secundários com pH 4,5-5,0. Essa capacidade bem sucedida de sobreviver nestes vacúolos demonstra que estas formas são organismos acidofílicos. Esta adaptação provavelmente está ligada à presença de bombas de prótons envolvidas na captura e transporte de metabólitos, estágio específico (Antoine *et al.*, 1998).

Durante um novo repasto sanguíneo, macrófagos infectados com as formas amastigotas são ingeridos pelo vetor. Uma vez transformadas em promastigotas, estas exibem uma distribuição preferencial dentro do trato digestivo do vetor, formando “micro-habitats” Lainson & Shaw (1987). No seu intestino, junto com o bolo alimentar, elas são envolvidas por uma matriz peritrófica (MP) constituída de proteínas, glicoproteínas e microfibrilas de quitina. A MP protege o epitélio intestinal de partículas alimentares abrasivas bem como os parasitos da ação das enzimas digestivas, permitindo sua transformação em formas flageladas mais resistentes (Pimenta *et al.*, 1997; Kamhawi, 2006) Ao longo do trato digestivo, os parasitos assumem diferentes formas que incluem: promastigotas procíclicas, nectomonas, haptomonas, leptomonas e promastigotas metacíclicas (Lawyer *et al.*, 1990). Cada um destes morfotipos exerce determinada função. Por exemplo, as nectomonas têm a função de escapar da MP e aderir-se ao epitélio intestinal, impedindo sua eliminação durante a excreção do sangue digerido (Bates & Rogers, 2004). Esta adesão faz-se através do lipofosfoglicano (LPG), que reconhece um receptor nas microvilosidades do epitélio intestinal (Kamhawi *et al.*, 2004). Cerca de 2-5 dias depois, as formas promastigotas procíclicas diferenciam-se em metacíclicas, que se desligam do epitélio intestinal. Em seguida, as mesmas migram em direção a porção anterior do intestino de onde serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Descoteaux & Turco, 1999).

1.3 Controle das Leishmanioses

O controle das Leishmanioses baseia-se principalmente no combate ao vetor, tratamento dos pacientes e eliminação dos reservatórios (Gontijo & Melo, 2004). Entretanto, devido à complexidade de aspectos epidemiológicos, determinadas medidas podem não serem aplicáveis em algumas situações. Por exemplo, as LCs geralmente são transmitidas no ambiente silvestre quando o homem entra na mata para trabalhar (Gontijo & Carvalho, 2003). Neste caso a aplicação de inseticidas torna-se inviável sendo a proteção individual mais adequada com o uso de repelentes. Já para a LV, que tem aumentado nas grandes cidades, a borrfiação tanto do intra como do peridomicílio é necessária principalmente nos canis e galinheiros, que são ambientes propícios à proliferação do vetor (Gontijo & Melo, 2004). Outra medida aplicável, a de eliminação do reservatório doméstico (cão), resulta em

desconforto afetivo para as famílias. Esta medida é necessária devido ao fato do animal não responder ao tratamento convencional e tornar-se um foco de transmissão importante para o vetor. Mesmo com estas medidas a expansão das Leishmanioses principalmente nas grandes cidades têm tornado discutível a medida de sacrifício dos cães (Dietze *et al.*, 1997).

Para contornar este problema, vacinas contra a LV encontram-se ainda em desenvolvimento para o cão. Atualmente, existem duas vacinas em uso no mercado: a Leishmune®, desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) e a Leishtec®, recentemente desenvolvida por grupo da Universidade Federal de Minas Gerais (Fernandes *et al.*, 2008). Embora tenham conferido níveis de proteção promissores, estas vacinas ainda carecem de mais estudos no campo (Fase III e IV) para real determinação de sua eficácia.

Devido às dificuldades no controle das Leishmanioses, assim como para as outras doenças causadas por tripanosomatídeos, o controle baseia-se primariamente no tratamento e para este existe uma reduzida quantidade de medicamentos (Croft *et al.*, 2006). Além disso, as drogas disponíveis são tóxicas, pouco eficazes e requerem atendimento ambulatorial (Davies *et al.*, 2003). Outro fator agravante, nesse contexto, é o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento (Sundar *et al.*, 2000; Sundar, 2001).

A alta variabilidade genética intra e interespecífica de *Leishmania* resultam em diversas manifestações clínicas. Portanto, a identificação das espécies de *Leishmania* é importante para escolha do tratamento e conhecimento da epidemiologia (Mimori *et al.*, 1998, Andrade *et al.*, 2001). Além disso, sua progressão dependerá também das características genéticas e imunológicas do hospedeiro. A atuação do sistema imune do paciente juntamente a droga cooperam para a eliminação da infecção. Este fato é observado durante o tratamento com antimoniais em pacientes com leishmaniose difusa e na co-infecção LV-HIV (Fauraty-Gambarelli *et al.*, 1997). Nestes casos o comprometimento da resposta mediada por células T resulta na exacerbação da infecção (Ercoli, 1966, Berhe *et al.*, 1999, Desjex & Alvar, 2003). A co-infecção de LV-HIV já foi relatada em 34 países incluindo os continentes Africano, Asiático, Europeu e Sul Americano. No sul da Europa, 70% dos casos de LV em adultos estão associadas ao HIV (WHO, 2000).

Do que foi exposto, é possível concluir que existem inúmeros desafios o controle das Leishmanioses que exibem epidemiologia altamente complexa. A ausência, na prática, de uma vacina eficaz e a dificuldade em se controlar os vetores e reservatórios ainda constitui um problema geral. Portanto, o tratamento dos casos humanos ainda constitui a principal ferramenta no controle do parasito.

1.4 Tratamento e mecanismos de resistência

1.4.1 Antimoniais pentavalentes

O antimonial trivalente (SbIII) foi o primeiro agente farmacológico utilizado no tratamento da LV, em 1915 na Itália e Índia. Após a década de 40, novas formulações dos antimoniais pentavalentes (SbV) foram introduzidos na terapêutica, o que diminuiu o tempo de tratamento (Murray *et al.*, 2005). São eles: o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam®) e o antimoniato de N-metilme glucamina (NMG) (Glucantime®Aventis), que continuam em uso até hoje (Soto *et al.*, 2004) (Figura 2).

No Brasil, a droga de primeira escolha é o Glucantime, que é de distribuição gratuita na rede de saúde pública. O esquema terapêutico é de 20 mg/kg/dia administrado por via endovenosa com soro glicosado durante 30 dias. Quando o insucesso terapêutico ocorre opta-se pela Anfotericina B (AmB). Entretanto, estas drogas são extremamente tóxicas, administradas por via intravenosa e requerem atendimento ambulatorial. Apesar de sua comprovada eficácia, elas apresentam efeitos colaterais, período de terapia longo e administração parenteral (Dube *et al.*, 2005).

A existência de efeitos colaterais e o fenômeno de resistência tanto natural quanto adquirida (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1990; Lira *et al.*, 1998) têm-se tornado um desafio cada vez maior. Cepas de *Leishmania* com diversos graus de resistência têm sido isoladas no Novo Mundo, sendo que *L. braziliensis* frequentemente apresenta resistência a tratamentos de curta duração ou em doses baixas (Moreira *et al.*, 1995; 1998). No Velho Mundo, cepas de *L. donovani* resistentes ao glucantime têm sido isoladas no campo principalmente na Índia (Sundar, 2001). As principais causas para o aparecimento desta resistência incluem: uso indiscriminado do glucantime nestas áreas, tratamento médico inadequado com doses baixas e descontínuas (Sundar *et al.*, 1994).

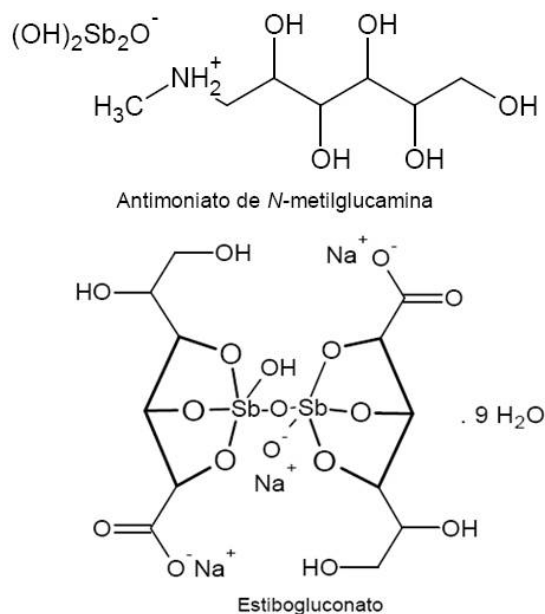


Figura 2: Estrutura química do Antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostan®).

O mecanismo de ação dos antimoniais está representado na Figura 3. O antimônio pentavalente (SbV) entra no macrófago e pode agir diretamente sobre a forma amastigota no vacúolo ou ser reduzido à forma trivalente (SbIII) no citosol. A entrada de SbV dá-se através de um transportador desconhecido, enquanto que a de SbIII faz-se através da aquagliceroforina (AQP1). A redução de SbV a SbIII pode ser catalisada pelas redutases ACR2 e TDR1 ou ocorrer quimicamente pela ação de tióis. O SbIII provavelmente interage com componentes celulares ou pode ser conjugado com tióis (cisteína, glutatona e tripanotona), porém não se sabe se esta conjugação é enzimática. O metal conjugado com o tiol pode ser sequestrado em uma organela pelo transportador ABC MRPA ou ser excretado para fora da célula por outro transportador provavelmente também ABC.

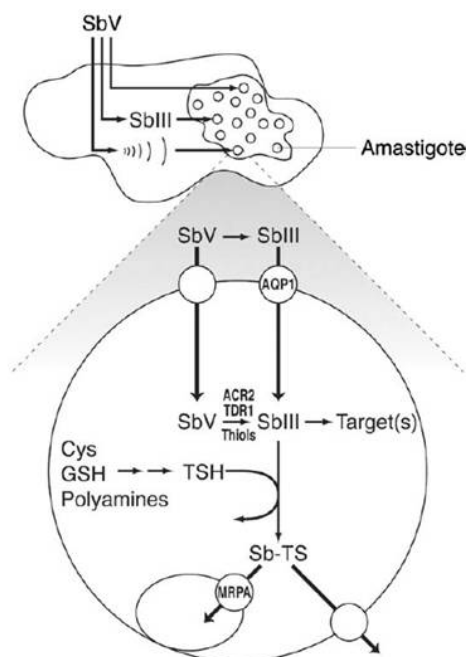


Figura 3: Mecanismo de ação e resistência ao glucantime em formas amastigotas de *Leishmania*. Legenda: SbIII– antimoniato trivalente, SbV– -antimoniato pentavalente, AQP1- aquagliceroforina, MRPA- transportador. Fonte: Ouellette *et al.*, 2004.

1.4.2 Anfotericina B

O polieno Anfotericina B (AmB) (Figura 4C), é utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas apresentando também atividade contra *Leishmania*. Este fármaco tem induzido altas taxas de cura em pacientes infectados por *L. donovani*, particularmente quando administradas em crianças e gestantes e nos casos de resistência do parasito aos antimoniais (Lira *et al.*, 1998; Singh & Sivakumar, 2004). É uma droga extremamente tóxica que exige internação e monitoramento de funções vitais, sendo uma terapia de alto custo (Kafetzis *et al.*, 2005). A dose recomendada é de 0,5 mg/kg/dia com aumento gradativo até 1 mg/kg/dia conforme a tolerância do paciente. Deve ser administrado via endovenosa com soro glicosado em dias alternados respeitando o limite máximo de 50 mg por aplicação até a dose total de 1 a 1,5 g para LC e de 2,5 a 3 g para LMC. Atualmente, as formas lipossomais têm ajudado a diminuir a toxicidade, mas é de custo elevado o que dificulta seu uso em larga escala nos países em desenvolvimento onde ocorre a maioria das infecções por *Leishmania* (Brattacharya *et al.*, 2004).

A AmB atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular de fungos e *Leishmania* (Figura 4), porém, não apresenta afinidade pelo colesterol da membrana plasmática de mamíferos (Singh & Sivakumar, 2004). A AmB interage com os ergosteróis de membrana, principalmente o ergosta-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol (Figura 4C – seta à direita) (Roberts *et al.*,

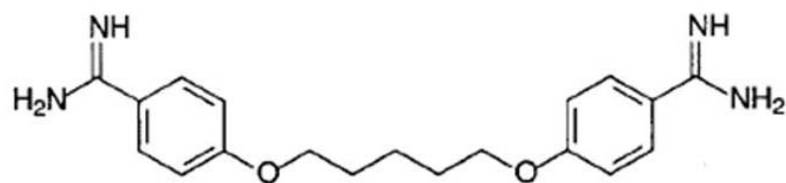
para determinar seu potencial terapêutico (Sundar, 2001; Ganguly *et al.*, 2001).

Não se sabe precisamente como ocorre seu mecanismo de ação (Figura 4A), mas suspeita-se que ela atue no metabolismo de lipídios alquil e na biossíntese de fosfolípidos (Lux *et al.*, 2000). Esta droga seria captada pela célula através de uma ATPase aminofosfolipídica do tipo P, sendo que mutações pontuais neste transportador levariam a um decréscimo na acumulação da droga dentro da célula e a um mecanismo de resistência (Perez-Victoria *et al.*, 2003). Estudos em laboratório indicam que seus prováveis mecanismos de resistência incluiriam: permeabilidade diferencial da membrana plasmática à droga, diminuição de sua captação, aumento do seu metabolismo e do seu efluxo (Figura 4A). Em *Leishmania* resistente ao agente antitumoral daunomicina foi observada a superexpressão do gene da P-glicoproteína P *MDR1*, que são transportadores do tipo ABC envolvidos na multi resistência a drogas em células tumorais (Perez-Victoria *et al.*, 2001).

1.4.4 Pentamidinas

A descoberta da atividade terapêutica desta diamida aromática foi inicialmente utilizada no tratamento de infecção por *Pneumocystis carinii* e, demonstrou ser efetiva na terapêutica da LV sendo considerada como uma droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses e indicada para os casos não responsivos aos antimoniais. Embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira a administração parenteral (Singh & Sivakumar, 2004).

A pentamidina (Lomidina®) é uma molécula de grande interesse no tratamento contra LV e LMC refratária aos antimoniais pentavalentes (Amato *et al.*, 2000). A alta toxicidade desta droga, com relatos de morte súbita, é um fator limitante de seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (Rath *et al.*, 2003). Com sua utilização terapêutica da LV no final da década de 70, altas taxas de cura (acima de 98%) foram obtidas (Jha, 1983). Com o desenvolvimento de resistência a este fármaco, pelos parasitos, na década de 80, os índices de cura declinaram (Thakur *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2005). Contudo, em alguns países a pentamidina continua sendo utilizada como único fármaco ou associada a outras drogas (Becker *et al.*, 1999). O uso da pentamidina resulta em efeitos indesejáveis como: mialgias, desconforto no local da injeção e hipotensão. Assim, devido a sua maior toxicidade, quando comparada aos antimoniais e ao surgimento de resistência, esta droga tem sido pouco utilizada na LV (Singh & Sivakumar, 2004).



**4,4'-Diamidino- α,ω -diphenoxypentane
di-isethionate (Pentamidine)**

Figura 5: Estrutura química da Pentamidina.

Acredita-se que o mecanismo de ação desse composto atue no DNA do cinetoplasto inibindo suas funções (Donkor *et al.*, 2001) bloqueando a topoisomerase mitocondrial (Kramp *et al.*, 2005). Outra hipótese, diz respeito à interferência de diamidinas aromáticas (ex. berenil e pentamidina) sobre sistemas de transporte poliamínicos, biomoléculas de importância em vários processos bioquímicos da fisiologia celular (Basselin *et al.*, 2000).

O mecanismo molecular está associado à inibição não-competitiva da recaptura de poliaminas (ex. espermidina, espermina, putrescina e arginina) e inibição direta da *S*-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina, sendo que estudos quantitativos de relação estrutura atividade (QSAR) mostraram que a inibição da recaptura é proporcional à distância entre grupos aminos dos substituintes amidino. Outro mecanismo proposto é a inibição direta da *S*-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina (Reguera *et al.*, 2005). O mecanismo de resistência pode estar associado a um decréscimo do potencial da membrana mitocondrial com redução do acúmulo do fármaco em terapias prolongadas (Mukherjee *et al.*, 2006).

1.4.5 Outras drogas (paromomicina, azitromicina, compostos azóis, alopurinol).

A paromomicina (Figura 6), um antibiótico aminoglicosídeo, também chamado aminosidina, é produzido pelo *Streptomyces rimosus*, e utilizado em infecções bacterianas. Já demonstrou capacidade de inibir o crescimento de diversos microorganismos, inclusive protozoários do gênero *Leishmania* (Iraji & Sadeghinia, 2005). Esta tem sido usada no tratamento da LV humana, principalmente na África e Europa (Chunge *et al.*, 1989) e a combinação paromocinina e estibogluconato de sódio elevou a taxa de cura acima de 82% (Berman, 1997). A atividade da formulação hidrofílica de paromomicina foi avaliada no tratamento tópico de infecções por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em camundongos e

mostrou ser efetiva na cura da lesão quando comparada aos antimoniais (Gonçalves *et al.*, 2005). Por isso é uma alternativa promissora no caso de resistência aos compostos antimoniais (Amato *et al.*, 2000; Poli *et al.*, 1997).

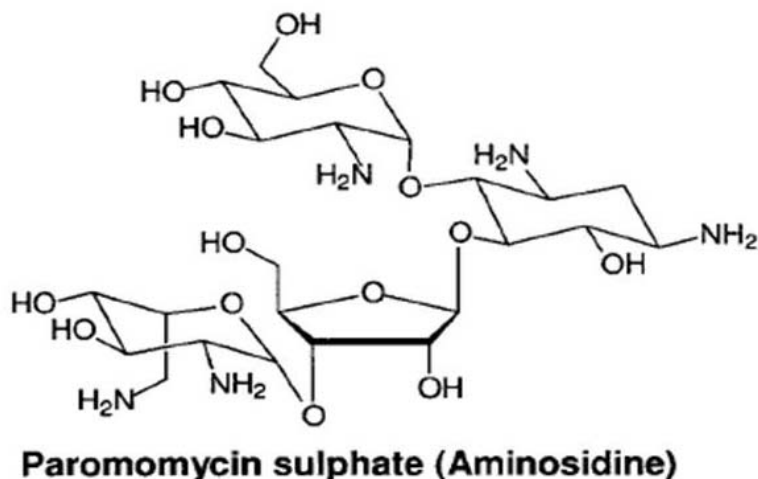


Figura 6: Estrutura química da Paromomicina.

Embora apresente baixa toxicidade, pode apresentar nefrotoxicidade e ototoxicidade (Poli *et al.*, 1997). Além disso, ainda é desconhecida sua eficácia sobre os parasitos (Croft, 1997; Armijos *et al.*, 2004). É um fármaco de uso parenteral, podendo ser administrado em associação com os antimoniais, porém não apresenta testes conclusivos (Guerin *et al.*, 2002).

O mecanismo de resistência em bactérias dá-se pela inibição da síntese de proteínas relacionadas às sub-unidades do RNA ribossomal (rRNA). Este mecanismo tem sido relatado também para *Leishmania*. Ribossomas mitocondriais e indução da disfunção respiratória e despolarização da membrana têm sido implicadas (Maarouf *et al.*, 1997).

Em estudos de seleção populacional de promastigotas, a resistência foi relatada devido a diminuição rápida da droga em *L. donovani* (Maarouf *et al.*, 1998), mas isto não parece ser devido a modificações enzimáticas ou mutações no gene da sub-unidade menor do rRNA de *Leishmania tropica* (Fong *et al.*, 1994). Com a introdução futura da paromomicina, são necessários mais estudos para definir os mecanismos de ação e resistência em *Leishmania*.

A azitromicina foi desenvolvida no final dos anos 80 e utilizada no tratamento de infecções bacterianas como uretrites não-gonocócicas, tracomas, ateroscleroses, úlcera péptica, infecções gastro-intestinais e infecções do trato respiratório. Além disso, tem sido usada sobre protozoários como *Leishmania* sp, *Plasmodium* sp e *Toxoplasma gondii* (Pechère, 2001). É um fármaco que atinge altas concentrações intracelulares quando comparada a outros antibióticos como a penicilina e possui fatores moduladores que podem regular esta

concentração no interior das células (Prata *et al.*, 2003; Silva-Vergara *et al.*, 2004). Possui uma boa capacidade de penetração nos tecidos, sendo o tratamento limitado de 3 a 5 dias.

Os azóis, outra classe de antifúngicos têm sido avaliados quanto sua atividade leishmanicida, e têm demonstrado serem efetivos no tratamento das leishmanioses cutâneas (Alrajhi *et al.*, 2002). São representados pelos imidazóis, que incluem o cetoconazol, itraconazol, fluconazol e as alilaminas (terbinafina).

A terbinafina é um inibidor do metabolismo de esteróis e por isso pode provocar efeitos colaterais mais importantes. Ela age através da inibição da enzima escalo epoxidase. Seu efeito foi menos eficaz do que o cetoconazol e o itraconazol para a LT em humanos (Khalil *et al.*, 1996, Bahamdan *et al.*, 1997).

O cetoconazol, itraconazol e fluconazol são inibidores do metabolismo do ergosterol e foram submetidos a vários ensaios para LV e LC com resultados controversos. O cetoconazol em doses de 200 a 400 mg/dia obteve cura de 70% para *L. major* e foi ineficaz para *L. tropica* e *L. aethiopica* (Weinrauch *et al.*, 1987). O mecanismo de ação destes compostos baseia-se na inibição da síntese de ergosterol mediada pela citocromo P₄₅₀ oxidase. Assim, não ocorre a conversão de lanosterol em ergosterol, com a depleção conseguinte de ergosterol, acúmulo de precursores e perda da integridade da membrana. Os derivados imidazólicos e triazólicos inibem o metabolismo de outros compostos devido sua interferência em diferentes isoenzimas do complexo citocromo P₄₅₀ humano. O resultado é um potencial aumentado dos níveis plasmáticos de outros fármacos facilitando a aparição de efeitos adversos (Colombo *et al.*, 2002; Sant'ana *et al.*, 2002).

O aluporinol, um análogo da hipoxantina, inibe o catabolismo das purinas em mamíferos e o anabolismo em patógenos do gênero *Leishmania*. Este fármaco apresenta atividade citotóxica seletiva aos parasitos, devido à incapacidade destes em sintetizar purinas, necessitando, portanto de purinas pré-formadas do hospedeiro para a sua sobrevivência (Singh & Sivakumar, 2004). Embora o aluporinol seja pouco eficaz como terapia isolada no tratamento da LC (Berman, 1997), o aumento da eficácia foi observado, quando utilizado em combinação com outras drogas (Pasa *et al.*, 2005). É um substrato para várias enzimas da via das purinas e incorpora-se ao ácido nucléico do parasito. Na LV e LC foi ineficaz quando usado isoladamente. Inibe a xantina oxidase e a produção de reativos do oxigênio úteis na eliminação dos parasitos, o que explica a pouca eficácia quando usado isolado (Sampaio *et al.*, 1997). Na Colômbia a associação de alopurinol ao NMG mostrou-se superior ao NMG isolado na LC (36% e 74%, respectivamente) (Martinez *et al.*, 1992). A associação de alopurinol ao SGS foi superior ao SGS isolado no tratamento da LC (71% e 39%, respectivamente) (Martinez *et al.*, 1997). No Iran, estudo comparando a eficácia de NMG

8mg SbV/kg/dia durante 14 dias, alopurinol 15mg/kg/dia durante 21 dias e NMG associado ao alopurinol concluiu que a associação foi superior às drogas usadas isoladas (24%, 18% e 46%, respectivamente) (Esfandiarpour & Alair, 2002). O NMG associado ao alopurinol foi eficaz em pacientes com LC refratária no Iran (Momeni & Amijavaheri, 2003).

1.5 Busca por novos agentes antiparasitários

O uso empírico de plantas medicinais pela população tem demonstrado que caule, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas apresentam eficácia na cura para diversos males, suscitando assim grande interesse no estudo científico. Nos últimos anos, as plantas tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de fármacos semi-sintéticos (Bergmann et al., 1997).

A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos compostos ativos de várias espécies vegetais, metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides considerados no passado como inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica. Compostos que estimulam o sistema imune são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários, como na leishmaniose. Neste caso, estudos químicos e imunofarmacológicos tem sido realizado com intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta à resistência do parasito aos fármacos (Bergmann *et al.*, 1997).

Os avanços na bioinformática, associados ao seqüenciamento do genoma dos parasitos, permitem identificar novas moléculas e vias bioquímicas e distinguir diferenças moleculares entre parasito e hospedeiro (Croft, 1997; Davis *et al.*, 2004).

Um dos grandes problemas para o desenvolvimento de novos fármacos ocorre no momento da interpretação das diferenças e identificação do alvo que se tornará válido para a ação do fármaco (Croft, 1997). Por exemplo, os estudos têm atentado para fármacos de ação antiparasitária que possam se acumular no interior das células. Além disso, deve ser dada atenção às características físico-químicas do fármaco, pois são estas que irão interferir diretamente na sua biodisponibilidade (Croft, 1997).

Na procura por drogas contra *Leishmania*, compostos que foram testados com sucesso contra outros protozoários podem propiciar uma atividade leishmanicida. Este é o caso da buparvaquona, uma hidroxinaftoquinona que é comumente utilizada no tratamento contra a *Theileria* em bovinos (Garnier *et al.*, 2007). Esta molécula apresentou uma atividade

leishmanicida marcante quando aplicada topicamente nas lesões cutâneas e também quando administrada parenteralmente para controlar a forma visceral. Outra classe de compostos recentes os cis-DDP (ou cisplatina), com atividade antitumoral, foram recentemente testados contra *L. infantum* apresentando atividade tanto contra formas promastigotas quanto amastigotas por mecanismo semelhante a apoptose (Tavares *et al.*, 2007). Similarmente, Sen *et al.*, (2007) utilizando o antimalárico artemisinina também observaram o desencadeamento de apoptose em *L. donovani*. Estes trabalhos recentes demonstram a importância atual da procura de drogas antileishmania à partir de fármacos já existentes.

Neste trabalho, dentro da busca de novos fármacos, pretendemos testar moléculas derivadas do propranolol que apresentaram atividade prévia contra *T. cruzi*. As drogas sintéticas catiônicas, os bloqueadores β -adrenérgicos, como por exemplo, pindolol, acebutalol, alprenolol e o propranolol que apresentam a cadeia oxipropanolamínica, mostraram atividade contra formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Hamond *et al.*, 1984). O β -bloqueador adrenérgico propranolol apresentou atividade esterilizante *in vitro* contra as formas tripomastigotas das cepas Peru, Sonya e Y do *T. cruzi* e foi escolhido como protótipo para obtenção dos derivados.

1.6 O método tradicional de testes de drogas

Vários ensaios são realizados para a avaliação da susceptibilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp a fármacos. Os dois estágios possuem diferenças bioquímicas, sendo que as promastigotas são menos susceptíveis a fármacos que as amastigotas. Experimentos realizados com amastigotas intracelulares se correlacionam melhor com a resposta *in vivo*. Isso ocorre devido ao fato da forma amastigota ser aquela encontrada no hospedeiro vertebrado (Fumarola *et al.*, 2004). Entretanto, para se fazer uma triagem de moléculas contra protozoários intracelulares várias dificuldades são encontradas na implementação de um modelo de testes de drogas. No caso de *Leishmania*, existe um método tradicional que é muito laborioso e não automatizado já utilizado há muitos anos. Ele consiste na avaliação do crescimento intracelular das amastigotas em macrófagos após a administração da droga. Estes macrófagos são obtidos da cavidade peritoneal de camundongos após estimulação com tioglicolato (3%) e colocados para aderir a lamínulas em placas de cultura. Feito isto, eles são infectados com o parasito antes da incubação com as drogas teste. A atividade é medida através da contagem da porcentagem de células infectadas e do número de amastigotas por 50-300 macrófagos (Berman & Lee, 1984; Neal & Croft, 1984; Sereno *et al.*, 2005; Moraes-Teixeira *et al.*, 2008). Este método envolve uma contagem de um grande

número de células e exige um profissional bem treinado. Entretanto, a variação individual do experimento poderia ser minimizada com o desenvolvimento de métodos semi-automatizados.

Em malária, também existe um teste tradicional que se baseia na contagem de eritrócitos contendo o *Plasmodium falciparum* (Rieckmann *et al.*, 1978). Este método foi semi-automatizado utilizando um marcador radioativo, a hipoxantina tritiada. Este precursor de ácido nucléico incorpora-se no DNA dos trofozoítos, uma vez que estes parasitos encontram-se em hemácias que não possuem núcleo (Desjardins *et al.*, 1979). Este teste é bastante eficaz e têm auxiliado a triagem inicial de várias moléculas, permitindo um direcionamento para os testes *in vivo* em camundongos reduzindo gastos técnico-operacionais. Contudo, o método da hipoxantina não pode ser usado em *Leishmania*, pois este precursor também seria incorporado ao DNA dos macrófagos. Este método apresenta a desvantagem de produzir lixo radioativo. Em recente trabalho (Sanches *et al.*, 2007) desenvolveram uma metodologia que utiliza *P. falciparum* transfectados com a GFP para substituir tanto o método da hipoxantina quanto o tradicional. Para viabilizar a semi-automatização do teste de drogas em *Leishmania* no futuro, a produção de cepas de *Leishmania* GFPs é um dos principais objetivos de nosso trabalho. Com o advento da biotecnologia, desenvolvimento de ferramentas moleculares e de aparelhos mais sensíveis, esta possibilidade torna-se mais viável. Uma delas seria a aplicação da tecnologia do gene repórter.

1.7 A tecnologia do gene repórter

1.7.1 Sistemas colorimétricos

O gene repórter consiste em uma sequência de nucleotídeos, que introduzida em um sistema biológico, produz a expressão de um fenótipo que pode ser detectado. É um parâmetro conveniente que correlaciona eventos moleculares com a expressão genética (Wood, 1995). Embora novos genes repórteres sejam introduzidos a cada ano, são poucos os utilizados rotineiramente. Sua escolha deve ser criteriosa, pois dependerá da linhagem celular, da natureza do experimento, e da adaptação do ensaio para sua detecção, levando-se em conta a conveniência, sensibilidade, linearidade, simplicidade e dinâmica (Naylor, 1999).

Os genes repórteres colorimétricos mais empregados são: β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT) e fosfatase alcalina. A CAT foi o primeiro gene repórter utilizado no monitoramento da atividade celular transcricional. É uma enzima bacteriana que catalisa a transferência do grupo acetil da acetil-coenzima A, para o substrato, o cloranfenicol. A principal vantagem do sistema que emprega CAT decorre do fato de se tratar de uma

enzima procariótica que apresenta uma atividade endógena mínima em células de mamíferos (Lin & Barbosa, 2002). Além disso, CAT apresenta uma meia-vida de cerca de 50h em células de mamíferos e essa estabilidade pode ser satisfatória para experimentos de transfecção transitória. Por outro lado, os ensaios são trabalhosos e longos, o substrato radioativo necessário para a maioria dos experimentos é caro e a sensibilidade do método é inferior àquela exibida por outros sistemas repórteres desenvolvidos mais recentemente (Naylor, 1999).

A enzima β -galactosidase é uma enzima bacteriana bem caracterizada e representa um dos sistemas repórteres mais versáteis. Sua atividade pode ser mensurada por métodos colorimétricos ou quimioluminescentes. A clivagem do substrato (várias formas de galactosídeos) pela enzima produz uma solução de coloração amarela, detectada a 420 nm no espectrofotômetro. No ensaio quimioluminescente, mediante substratos específicos, a atividade da enzima é refletida pela quantidade de emissão luminosa registrada por um luminômetro. Esse ensaio chega a ser 50.000 vezes mais sensível que o colorimétrico. A expressão da β -galactosidase é usada como um sistema repórter para caracterizar seqüências regulatórias, mas é também frequentemente adotada como um controle interno para normalizar a variabilidade de outros ensaios repórter, notadamente CAT e luciferase (Hollon & Yoshimura, 1989).

O gene da fosfatase alcalina secretada (SEAP) codifica uma forma de fosfatase alcalina placentária humana, caracterizada pela ausência do domínio de ancoragem à membrana. Isso confere a propriedade de ser secretada pelas células e a vantagem de ser quantificada a partir de alíquotas do meio de cultura de células previamente transfectadas. O emprego da proteína SEAP oferece inúmeras vantagens: múltiplos tratamentos podem ser aplicados às células, uma vez que elas permanecem intactas após as medidas da atividade do gene repórter, pode-se acompanhar a cinética de expressão gênica a partir de uma mesma cultura e não é necessário preparar lisados de células (Naylor, 1999). Porém, o ensaio não deve ser realizado em tipos de células que expressam baixos níveis de fosfatase alcalina placentária (pulmão, testículo, epitélio do colo uterino). Ainda, espera-se que o desenho experimental não altere a capacidade secretora das células-alvo.

1.7.2 Sistemas luminescentes e fluorescentes

Os genes repórteres mais empregados nesta modalidade incluem: luciferase e a proteína verde fluorescente (GFP). A luciferase refere-se à família de enzimas que catalisam uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 .

Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase das células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina (i e ii) com emissão de um *flash* de luz que decai rapidamente que pode ser detectado por um luminômetro (Wood, 1995). A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflete a taxa de transcrição do gene repórter sob ação do promotor em estudo. Este sistema tem algumas vantagens quando comparado ao sistema CAT usualmente empregado: apresenta uma sensibilidade 10 a 100 vezes superior (Pazzagli, 1992), o processamento das amostras é bem mais rápido, não requer o uso de isótopos, é relativamente mais barato e, apresenta atividade endógena baixa em células de mamíferos. Por ser sensível à degradação por proteases, a meia-vida da enzima luciferase é de cerca de 3h em células de mamíferos. Essa característica favorece o emprego desse sistema quando pretende estudar sistemas indutíveis, em que os aumentos observados em relação aos níveis de expressão basal necessitam ser maximizados. Os ensaios de luciferase aplicam-se a estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A atividade da enzima pode ser detectada em células vivas, *in situ*, quando se usam substratos de luciferase solúveis (ésteres de luciferina) capazes de atravessar a membrana plasmática. (Thompson *et al.*, 1991).

A descoberta e clonagem do gene GFP em 1991 da água-viva *Aequorea Victoria* possibilitou a expressão desta proteína em sistemas heterólogos (Chalfie, 1995). A proteína GFP, quando expressa em células procarióticas ou eucarióticas, produz uma fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou UV (Misteli & Spector, 1997). Essa propriedade intrínseca da proteína permite que esse sistema seja bastante apreciado para avaliar a expressão de genes. GFP tem como característica principal ser uma proteína autofluorescente, propriedade que não requer a presença de nenhum co-fator ou substrato para a geração de luz (510 nm). A grande vantagem da GFP é que há ausência de lise celular, possibilitando o monitoramento não invasivo da expressão do gene em tecidos vivos.

Neste sentido, uma série de trabalhos produziu várias cepas de parasitos transfectados com genes repórteres. Dentre as espécies do Velho Mundo podemos destacar *L. infantum* e *L. donovani* transfectadas com luciferase episomal (Sereno *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005), *L. major* e *L. donovani* transfectadas com luciferase em plasmídeo de integração genômica (Roy *et al.*, 2000), *L. major* e *L. donovani* transfectadas com o gene GFP (Ha *et al.*, 1996), *L. donovani* e *L. infantum* com GFP episomal GFP (Singh & Dube, 2004; Kamau *et al.*, 2001). Dentre as espécies do Novo Mundo temos *L. amazonensis* episomal (Chan *et al.*, 2003; Okuno *et al.*, 2003).

É possível notar que a produção de cepas de *Leishmania* fluorescentes inclui em sua maioria espécies do Velho Mundo. Apenas *L. amazonensis* está disponível dentre as cepas do Novo Mundo. Aqui no Brasil, as espécies mais prevalentes além desta última incluem *L.*

chagasi, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A principal vantagem da metodologia de transfecção de integração genômica é que ela baseia-se na incorporação do gene repórter no DNA genômico do parasito, sendo, portanto, estável. Na transfecção episomal, a célula tende a expulsar o vetor, sendo necessária a manutenção do parasito sob constante pressão do antibiótico cujo gene de resistência está presente na seqüência do plasmídeo (Cruz *et al.*, 1991). Com a integração no genoma, isto não seria mais necessário o que é uma vantagem importante considerando a possibilidade de haver similaridade de moléculas a serem testadas com o antibiótico seletivo levando a resistência cruzada. Neste trabalho, utilizaremos uma metodologia de transfecção de integração genômica (Beverley & Clayton, 1993).

1.8 Justificativa

Devido às dificuldades de controlar as Leishmanioses, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de busca de novas drogas mais eficazes. A técnica de teste de drogas chamada de método tradicional, já vem sendo realizada desde a década de 80. Nesta, é realizada a avaliação da susceptibilidade de drogas contra o parasito intracelular *in vitro*. Até o momento não surgiu nenhuma outra metodologia que a superasse ou substituísse. Com o propósito de aplicar e aprimorar tais técnicas o presente projeto busca a criação de várias espécies de *Leishmania* fluorescentes através da inserção do gene da GFP. Para avaliar o sucesso da transfecção com este gene neste trabalho avaliou-se alguns parâmetros biológicos das cepas transfectadas comparando-as com as cepas selvagens. Já para *L. amazonensis* (cepa PH8), foi avaliado o impacto da transfecção na susceptibilidade às drogas padrões (SbV e AmB), bem como moléculas teste (derivados do propranolol).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Transfectar espécies de *Leishmania* com o gene da proteína verde fluorescente e avaliar o uso potencial de *L. amazonensis* GFP no teste quimioterápico tradicional.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Transfectar as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, e *L. guyanensis* com o gene da GFP;

2.2.2 Comparar os parasitos WT e GFP através da microscopia laser confocal e citometria de fluxo;

2.2.3 Avaliar a curva de crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* selvagem e GFP e sua infectividade para macrófagos murinos;

2.2.4 Avaliar a susceptibilidade de *L. amazonensis* selvagem e GFP frente aos agentes leishmanicidas de uso corrente (Anfotericina B e Glucantime®);

2.2.5 Avaliar a susceptibilidade de *L. amazonensis* selvagem e GFP frente a moléculas derivadas do propranolol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas e cultura de *Leishmania*

Os parasitos utilizados nesse trabalho são cepas de Referência da Organização Mundial de Saúde e pertencem às espécies de maior importância médica no Brasil:

- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8);
- *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2903);
- *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46);
- *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147).

Os parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab), penicilina (100U/ml) (Invitrogen), streptomomicina (100 µg/ml) (Invitrogen), glutamina (12,5 mM) (Sigma), Hepes (40 mM) (Amresco), adenina (0,1 mM) (Sigma) e 2,5 µg/ml hemina (Sigma) (Soares *et al.*, 2002). Os parasitos foram mantidos em garrafas para cultivo de células (em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 ml, estéril, com tampa de rosca e gargalo inclinado) em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 26°C. Para a manutenção dos parasitos eram realizados repiques semanais.

3.2 Transfecção dos parasitos

3.2.1 Plasmídeo B5793

O plasmídeo contendo o gene da GFP (piR1Phleo-GFP+(a)(sense) (Figura 7) foi cedido pelo Dr. Stephen M. Beverley da Washington University, St. Louis (USA). Este plasmídeo possui o tamanho de 9107 pares de base (pb). Nele existem dois sítios de restrição para a enzima *SwaI* que divide a sequência circular em dois fragmentos. O primeiro de aproximadamente 6000 pb contendo as sequências: SSU' (*small subunit RNA gene in rDNA locus* – subunidade pequena do gene no locus do DNA ribossomal) de *L. major*, GFP, CYS2 e LPG1R, o gene de resistência para a Fleomicina e finalmente a outra região SSU'. As duas regiões SSU' promoverão a integração no DNA genômico da *Leishmania* na região do rDNA por homologia. O segundo fragmento (≅3000 pb) contém a sequência do gene de resistência para a ampicilina e inicialmente utilizado para selecionar as bactérias transformadas.

eliminado durante a transfecção. Ambos os fragmentos serão colocados em contato com os parasitos, porém só o de 6000 pb possui a capacidade de integrar-se ao DNA.

3.2.3 Eletroporação de *Leishmania* spp

Formas promastigotas em fase logarítmica ($4-6 \times 10^6/\text{mL}$) foram centrifugadas a 2100g por 10 minutos. Posteriormente foram lavadas em PBS e centrifugadas. Foram ressuspendidas em tampão Cytomix (KCl a 120 mM, CaCl_2 a 0,15 mM, K_2HPO_4 a 10 mM, HEPES a 25 mM, EDTA a 2 mM e MgCl_2 a 5 mM, pH 7.6) (Segawa *et al.*, 2005). Cerca de 2×10^8 células foram utilizadas na transfecção para cada uma das quatro espécies sendo colocadas em cubetas BTX de $0,4 \text{ cm}^3$. Nestas cubetas foram adicionados 10 μg do plasmídeo B5793 digerido e os parasitos eletroporados a 1500 V por duas vezes com um intervalo de 10 seg. entre o primeiro e o segundo choque elétrico (Beverley & Clayton, 1993; Descoteaux *et al.*, 1994).

3.2.4 Clonagem de *Leishmania*

Após a transfecção os parasitos foram plaqueados em meio semi-sólido contendo ágar nobre (1%) em meio M199 contendo o antibiótico seletivo fleomicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma). Posteriormente, após o crescimento das colônias, os mesmos foram coletados e plantados em meio líquido M199 (Ha *et al.*, 1996).

3.3 Avaliação da produção de fluorescência por Microscopia laser confocal - MLC

Para verificar a produção da proteína GFP pelos parasitos transformados foi realizada a visualização no microscópio laser confocal. Os parasitos da cultura ($\cong 1 \times 10^6/\text{mL}$) foram centrifugados em microtubos (1,5 ml) e lavados 3 vezes em PBS. As promastigotas foram colocadas na câmara Attofluor Cell Chamber (Molecular Probes) devidamente montadas com lamínulas circulares de 25 mm (Fisher) e acopladas ao MLC Zeiss LSM 510. Para a detecção de fluorescência as amostras foram expostas ao laser 488 nm (Argônio) e a fluorescência captada em um filtro Band-Pass 505 e 530 nm. As imagens foram armazenadas em meio eletrônico.

3.4 Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo - FACS

Para comparar a fluorescência das promastigotas selvagens e GFPs, os parasitos (1×10^6 células/mL) foram lavados 1 X em PBS e levados ao citômetro de fluxo (Becton Dickinson). Os parâmetros de excitação e detecção foram de 488 e 520 nm, respectivamente. O número de eventos durante a contagem de células foi de 10.000, a medida da fluorescência determinada em unidades de fluorescência (FU) e gerados os índices médios de fluorescência (IFM) que foram comparados com os controles não transfectados (Ha *et al.*, 1996). Os dados gerados foram catalogados e analisados pelo programa CellQuest (Becton Dickinson).

3.5 Avaliação Biológica

3.5.1 Curvas de crescimento em meio M199

Para comparar o perfil de crescimento das formas promastigotas entre a cepa WT e GFP, os parasitos foram semeados em triplicata na concentração inicial de 1×10^5 parasitos/mL. As culturas foram contadas diariamente em câmara de Neubauer durante um período de 9 dias.

3.5.2 Obtenção de macrófagos murinos

O próximo passo foi avaliar se a fluorescência observada nas promastigotas permaneceria após a transformação em amastigotas intracelulares. Os macrófagos peritoneais (MØs) foram obtidos de camundongos BALB/C fêmeas de 6 semanas. Nestes, foram injetados 2 ml de tioglicolato de sódio (3%) via intraperitoneal. Após 72 horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, mergulhados em álcool 70% para desinfecção e imobilizados na posição decúbito dorsal. Após a exposição da cavidade peritoneal, os macrófagos foram coletados após injeção de 5 ml de Meio RPMI 1640 (Sigma) sem soro. A suspensão celular foi recolhida com seringa e centrifugada (10 min, 150g, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em RPMI com 10% de SFB. (Moraes-Teixeira *et al.*, 2008; Sereno *et al.*, 2005; Berman *et al.*, 1984). Os macrófagos foram então expostos às formas promastigotas de *L. amazonensis* (1:10) conforme descrito abaixo.

O procedimento de obtenção de macrófagos murinos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) segundo a licença L-004/08.

3.5.3 Infecção de macrófagos

Formas promastigotas oriundas de cultura de *L. amazonensis* WT e GFP em fase estacionária foram centrifugadas a 2100 g (25 °C, 10 min). Foram ressuspensas em meio RPMI com 10% SFB (2×10^6 células/mL) e aplicadas sobre os macrófagos (10:1). Após 5 horas de interação o sobrenadante contendo os parasitos livres foram removidos com meio RPMI sem soro.

3.6 Teste quimioterápico tradicional

3.6.1 Plaqueamento dos macrófagos

Os macrófagos peritoneais foram contados em câmara de Neubauer e sua viabilidade determinada por Azul de Trypan (1%). Foram plaqueados (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm. As células foram incubadas na estufa (ULTRASAFE, modelo HF212 UV) (37 °C, 5% CO₂) durante a noite para adesão das células.

3.6.2 Exposição à Anfotericina B e Glucantime

Para comparar as susceptibilidades dos parasitos GFP e WT foram utilizadas as duas drogas de uso corrente para o tratamento da leishmaniose: Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®-Aventis) e a Anfotericina B (Sigma). Para determinar a curva dose-resposta para posterior cálculo do IC₅₀ foram utilizadas 5 concentrações para cada droga. Para o Glucantime estas concentrações foram 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL e para a Anfotericina B foram 1; 0,5; 0,25; 0,12 e 0,06 µg/mL (Moraes-Teixeira *et al.*, 2008).

3.6.3 Exposição às moléculas derivadas do Propranolol

Para validar a utilização do clone GFP de *L. amazonensis* foram testadas as 10 moléculas sintetizadas a partir do Propranolol e identificadas por UFOP 1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 5c e 5d. As concentrações utilizadas para cada uma destas moléculas foram de 50; 25;

12,5; 6,25; e 3,1 µg/ml. Para avaliar as infecções, controles sem a adição de drogas foram utilizados.

Todas as amostras foram aplicadas em poços independentes durante 3 dias e acondicionados em estufa (ULTRASAFE, modelo HF212 UV) (37 °C, 5% de CO₂). Após 72 horas de exposição a estas moléculas, as lamínulas foram coletadas e coradas pelo método Panótico rápido (Laborclin) e posteriormente montada com Entellan® (Merck) sobre lâmina de vidro. Em cada ensaio era realizado o controle positivo (4 poços), no qual continha apenas os macrófagos infectados sem a adição de molécula. Para as drogas testadas cada concentração foi realizada em duplicata (2 poços independentes). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada através de análise em microscopia óptica (Moraes-Teixeira *et al.*, 2008).

Para a plotagem das curvas e cálculo dos valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) foi utilizado o programa Microcal, Origin Software (Northampton, MA, USA) (Soares *et al.*, 2006; Cunico *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2008).

3.7 Síntese dos derivados do propranolol

Esta parte foi realizada em colaboração com a Dra. Célia Maria Ferreira da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Na busca de novas drogas contra *T. cruzi* foi proposta a síntese de análogos do propranolol com o intuito de estudar a relação entre suas estruturas químicas e a atividade tripanosomicida. A síntese dos análogos baseou-se na metodologia utilizada para a obtenção de β-bloqueadores (Kaiser *et al.*, 1977). A síntese consistiu na reação do sal de potássio do naftol, gerado *in situ* seguido pela adição de epícloridrina. Na sequência, o epóxido I sofre abertura do anel oxirano com as seguintes aminas: isopropilamina, dimetilamina, piperidina e morfolina, como mostrado na Figura 8.

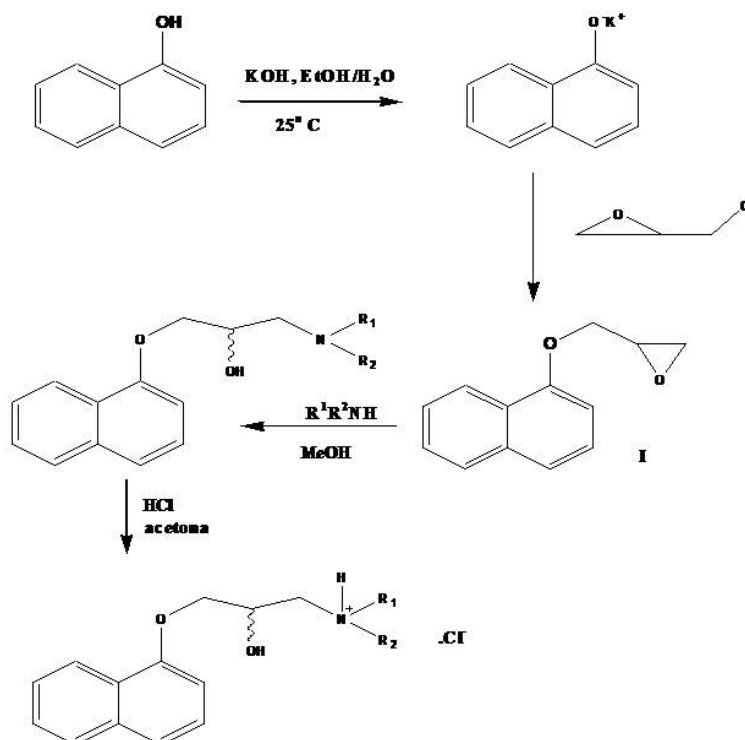


Figura 8: Obtenção de β -bloqueadores. Reação do sal de potássio do naftol, gerado *in situ* seguido pela adição de epicloridrina.

Foram sintetizadas 7 substâncias, sendo que os cloridratos de 1-naftiloxi-2-propanol-3-piperidina e 1-naftiloxi-2-propanol-morfolina apresentaram atividade *in vitro* contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, nas concentrações de 366 $\mu\text{g/ml}$ e 752 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2001).

Os análogos fenoxipropanolaminas foram sintetizados por estratégia de simplificação do anel naftol do propranolol e com a introdução de grupos doadores e retiradores de elétrons (X= H, Cl, OMe e NO₂) na posição *para* do anel variando-se o grupo N-isopropila pelas aminas: piperidina e morfolina, como mostrado na Figura 9.

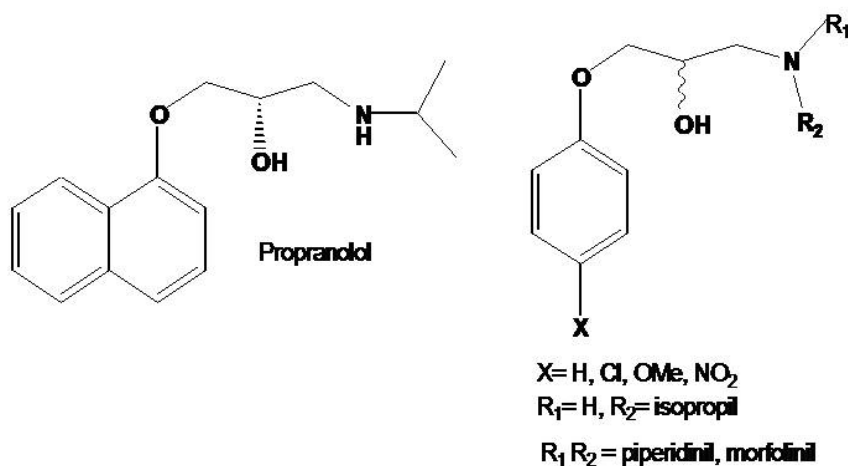


Figura 9: Estrutura química do Propranolol e síntese de análogos da fenoxipropanolaminas.

Os análogos e seus sais foram sintetizados e a elucidação estrutural confirmada por análise de RMN¹H e de ¹³C.

O propranolol e seu cloridrato, juntamente com os derivados *p*-cloro, metoxi e nitro-fenoxipropanol isopropilamina retêm a atividade antagonista adrenérgica β-bloqueador (Main & Tucker, 1985). A substituição do grupo isopropilamina do propranolol ou dos derivados fenoxi por grupos heterocíclicos, tais como, piperidina ou morfolina foram propostas com o intuito de avaliar se a introdução desses grupos provocam perda da atividade antagonista β-bloqueadora e conseqüentemente poderiam ser avaliados seus potenciais tripanosomicida e leishmanicida. As estruturas químicas de cada uma das moléculas testadas para avaliação de sua atividade leishmanicida estão apresentadas abaixo (Figuras 10 e 11).

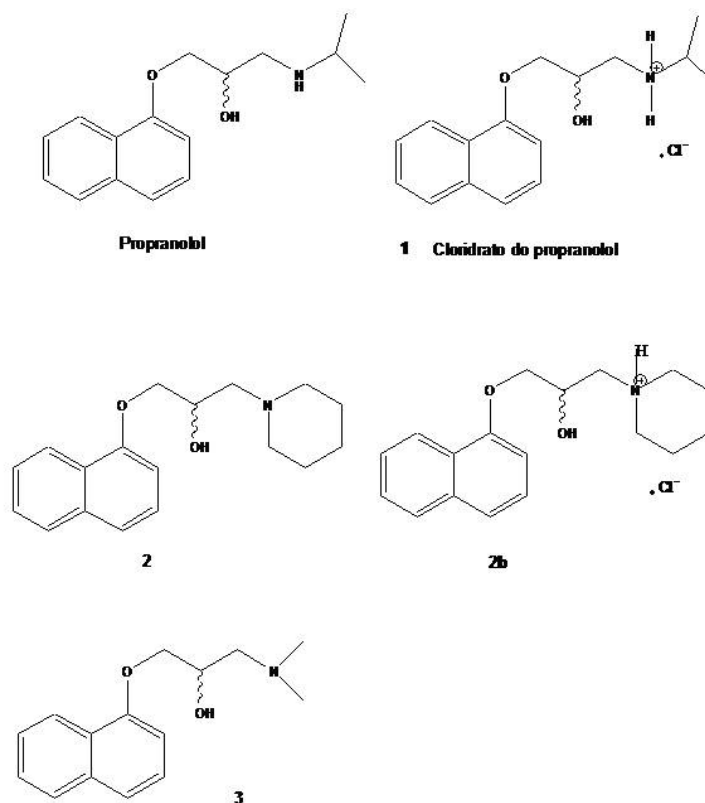


Figura 10: Substâncias sintetizadas a partir da modificação do propranolol.

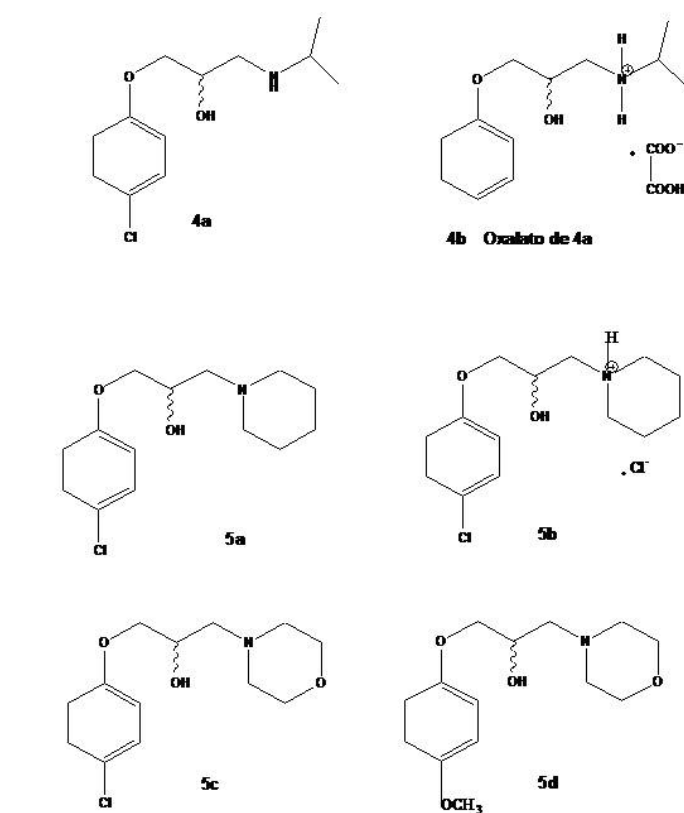


Figura 11: Derivados obtidos a partir da simplificação do anel naftaleno do propranolol.

3.8 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SAS (SAS System, 1999). Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade dos erros, sendo considerados com distribuição não normal, portanto foram utilizados testes não paramétricos para a comparação dos dados. O teste de Wilcoxon foi o escolhido para comparação de duas amostras independentes e utilizado em todo o trabalho. Foi considerado um nível de significância de 1% para amostras independentes. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Digestão do plasmídeo B5793

Para linearizar o plasmídeo B5793 foi realizada digestão com a enzima *SwaI*. Como pode ser observada na Figura 12 houve a divisão do fragmento como esperado, por este possuir dois sítios de restrição para esta enzima. Assim, após a corrida eletroforética de uma alíquota do material processado foram visualizados em gel de agarose 1% após ser corado com brometo de etídio os 2 fragmentos (≈ 3000 e 6000 pb). O fragmento maior de 6000 pb é o que contém as sequências dos genes da proteína verde fluorescente (GFP) e de resistência a Fleomicina.

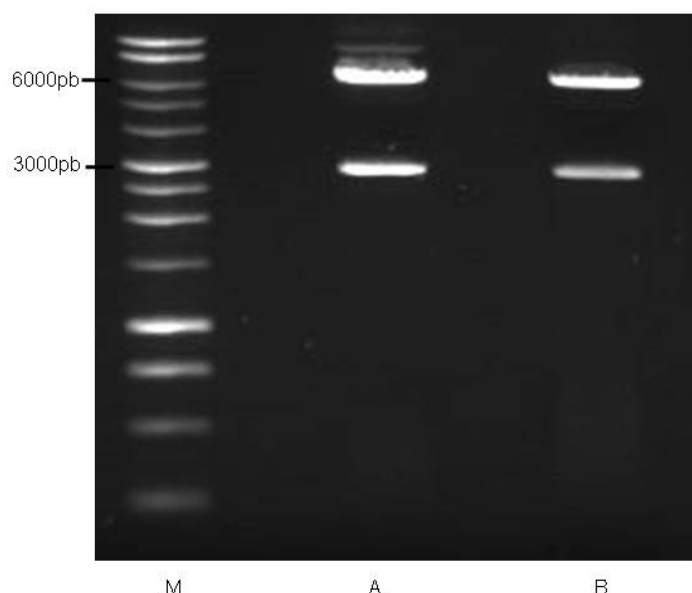


Figura 12: Digestão do plasmídeo B 5793 com a enzima *Swa I* em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) M- marcador de 1kb, A) amostra 1, B) amostra 2.

4.2 Detecção da expressão da proteína GFP nas formas promastigotas

A detecção da fluorescência das formas promastigotas foi avaliada ao MLC (488 nm). Foi possível observar a expressão da GFP nas quatro espécies transfectadas (Figuras 13 A-D). Como esperado nos parasitos selvagens não foi observada fluorescência (Figuras 13 E-F).

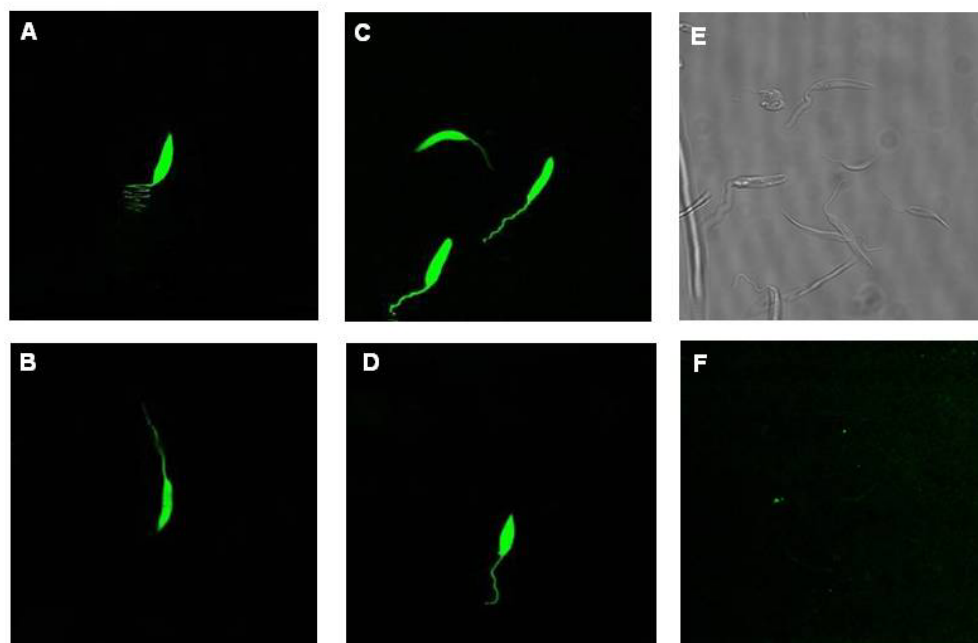


Figura 13: Visualização de promastigotas das quatro espécies de *Leishmania* transformadas com a Proteína verde fluorescente (GFP) no Microscópio Laser Confocal (488 nm) . A) *L. amazonensis* B) *L. chagasi*, C) *L. braziliensis*, D) *L. guyanensis*. Controle negativo *L. chagasi* WT: E) DIC (Contraste por Interferência Diferencial) e F) 488 nm.

4.3 Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo (FACS)

Os parâmetros de tamanho e granulosidade na citometria de fluxo foram utilizados para avaliação biológica da transfecção. Diante dos dados coletados foi observado que não houve alteração nestes parâmetros comparando as cepas WT e GFPs de cada espécie estudada (Figuras 14 e 15). A emissão de fluorescência das cepas WT e GFP foi comparada pela quantificação da fluorescência emitida no Citômetro de Fluxo. Ao comparar a emissão de fluorescência, todas as espécies apresentaram distribuição normal (Método Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,001$), cujos coeficientes de discriminação variaram de 62% para *L. braziliensis* a 89% para *L. amazonensis* (Figura 16). Os índices médios de fluorescência (IMF) foram 3,5 a 6,4 vezes maiores nas populações GFPs do que nas WT (Tabela 1). Estes resultados confirmam com sucesso a transfecção dos parasitos sem alteração de sua morfologia.

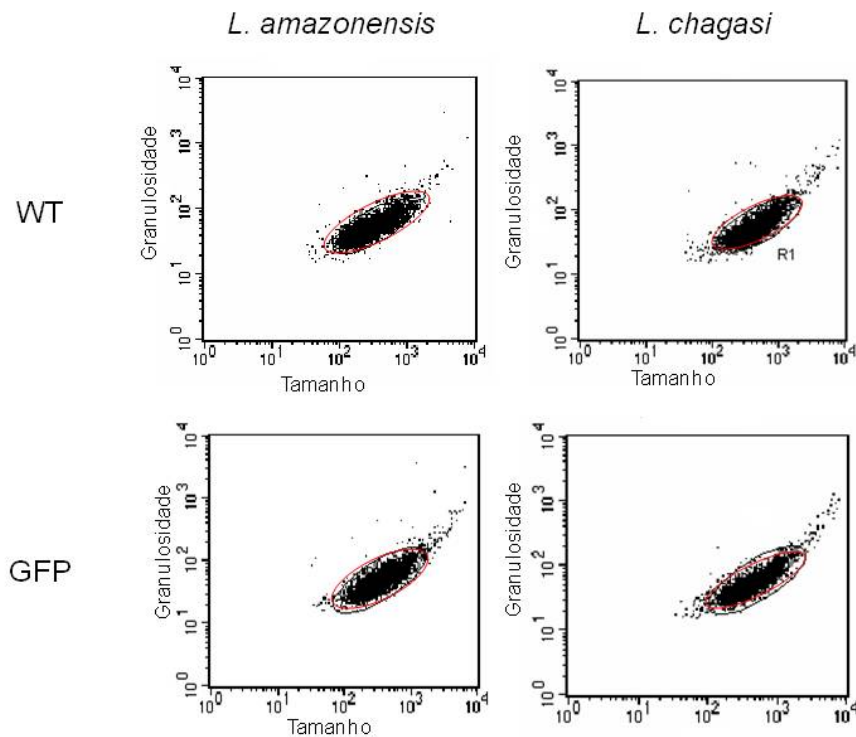


Figura 14: Avaliação dos parâmetros tamanho e granulosidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* pela citometria de fluxo. WT, tipo selvagem e GFP, transformada.

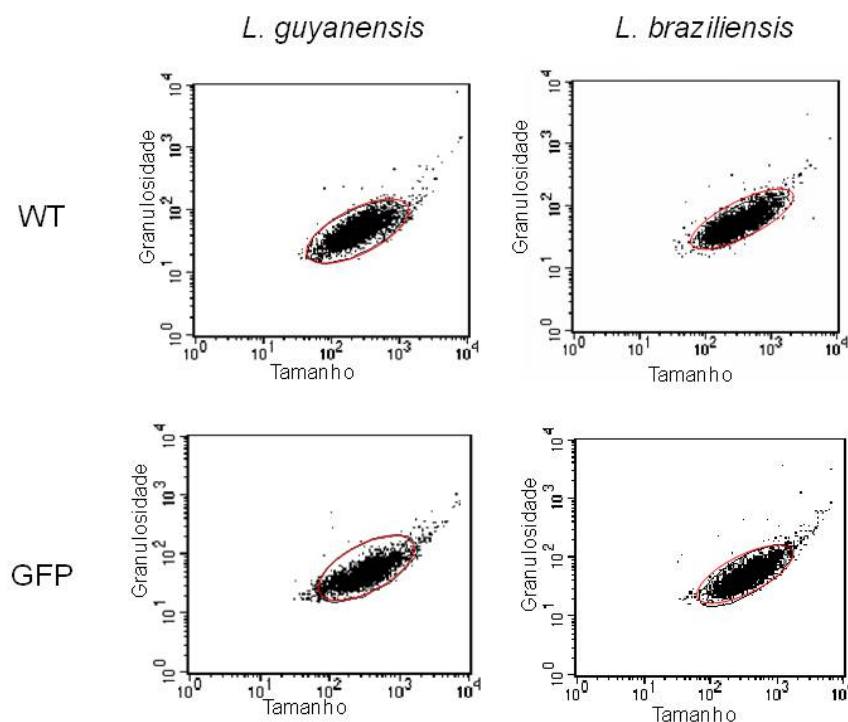


Figura 15: Avaliação dos parâmetros tamanho e granulosidade de formas promastigotas de *L. guyanensis* e *L. braziliensis* pela citometria de fluxo. WT, tipo selvagem e GFP, transformada.

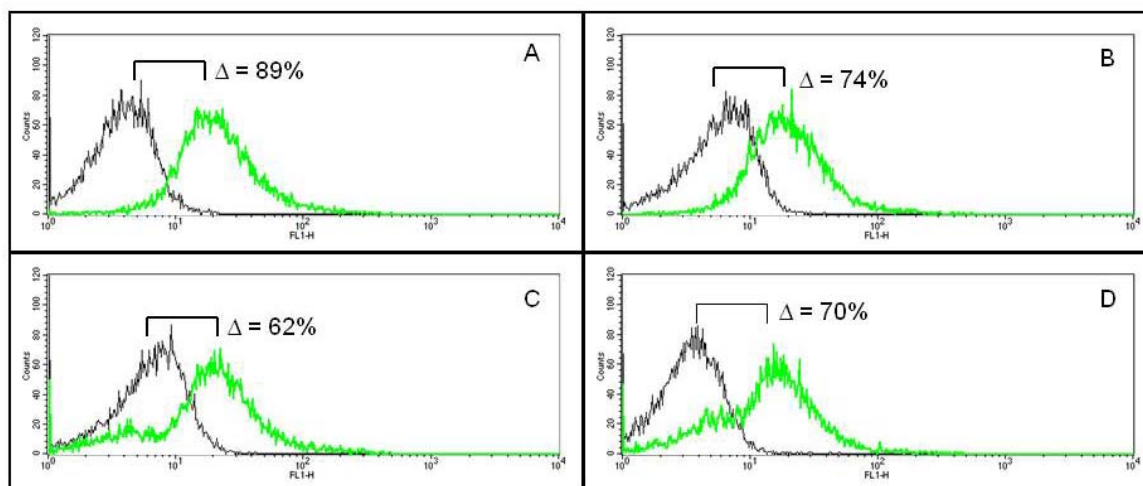


Figura 16: Análise comparativa da emissão de fluorescência de formas promastigotas WT (preto) e GFP (verde) no citômetro de fluxo. A) *L. amazonensis*, B) *L. chagasi*, C) *L. braziliensis* e D) *L. guyanensis*.

Tabela 1: Índices Médios de Fluorescência (IFM) observados para as quatro espécies de *Leishmania* selvagens (WT) e transfectadas (GFP).

	WT	GFP	Razão (GFP:WT)
<i>L. amazonensis</i>	4,19	26,69	6,36
<i>L. braziliensis</i>	7,14	25,1	3,51
<i>L. chagasi</i>	6,54	24,84	3,80
<i>L. guyanensis</i>	3,84	18,92	4,92

4.4 Avaliação da emissão de fluorescência por amastigostas intracelulares

Para verificar a permanência da emissão de fluorescência após diferenciação em amastigostas intracelulares, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram colocadas na presença de macrófagos murinos aderidos em lamínula. A mesma foi levada ao MLC (488nm) e a fluorescência das amastigostas confirmada como observado na Figura 17.

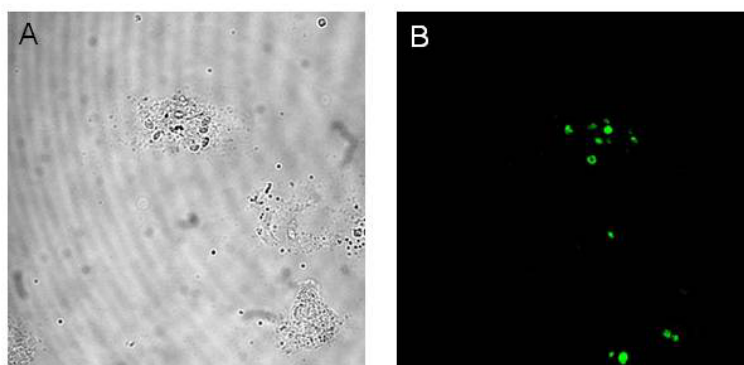


Figura 17: Visualização da fluorescência em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* GFP em macrófagos murinos (Balb/c) no Microscópio Laser Confocal (488 nm). A) DIC (Contraste por Interferência Diferencial) e B) 488 nm.

4.5 Avaliação biológica

4.5.1 Curva de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* WT e GFP

Como não foram observadas diferenças nos parâmetros tamanho e na granulidade dos parasitos (Figura 14), o próximo passo foi comparar o perfil de crescimento da cepa WT e GFP de *L. amazonensis*. Através da curva, foi determinado o dia para obtenção de um número máximo de parasitos viáveis para os experimentos. Similarmente, ambas as cepas alcançaram a fase estacionária em cerca de 7-8 dias com uma densidade máxima de $1,6 \times 10^7$ parasitos/mL. (Figura 18). Portanto, a transfecção com o gene da GFP também não alterou o perfil de divisão celular.

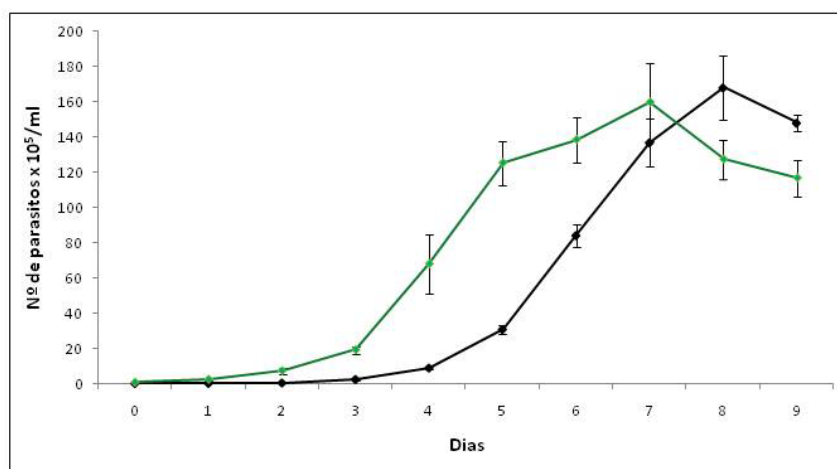


Figura 18: Curvas de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*. WT (verde) e GFP (preto).

4.5.2 Avaliação dos níveis de infectividade

A avaliação da infectividade dos macrófagos dos controles positivos, sem droga, gerou porcentagens médias de infecção para ambas as cepas. Foi observada a porcentagem de $66,46 \pm 9,81$ para a cepa WT e $65,13 \pm 7,93$ para a GFP. Esses dados mostram similaridade entre a cepa GFP e WT em termos de infectividade *in vitro* para macrófagos murinos.

4.6 Teste quimioterápico tradicional

A avaliação quimioterápica para comparação da susceptibilidade às drogas das cepas WT e GFP foi realizada somente para a espécie *L. amazonensis*.

O teste *in vitro* tradicional de drogas em *Leishmania* baseia-se na contagem de amastigotas intracelulares em 50-300 macrófagos corados após exposição às drogas (Serenó *et al.*, 2007). A representação visual de um dos experimentos é mostrada na Figura 19 após exposição à Anfotericina B frente a *L. amazonensis* WT. É possível observar que com a diminuição da concentração do fármaco (Figuras 19 B-F), ocorreu aumento do número de macrófagos infectados com amastigotas intracelulares em comparação com o controle sem drogas (Figura 19A). Deste modo, as porcentagens de infecção nos permitiu calcular o IC_{50} da droga. Este valor representa a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% dos parasitos (IC_{50}). Para este experimento o IC_{50} da Anfotericina B foi de 0,18 e 0,19 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas WT e GFP, respectivamente.

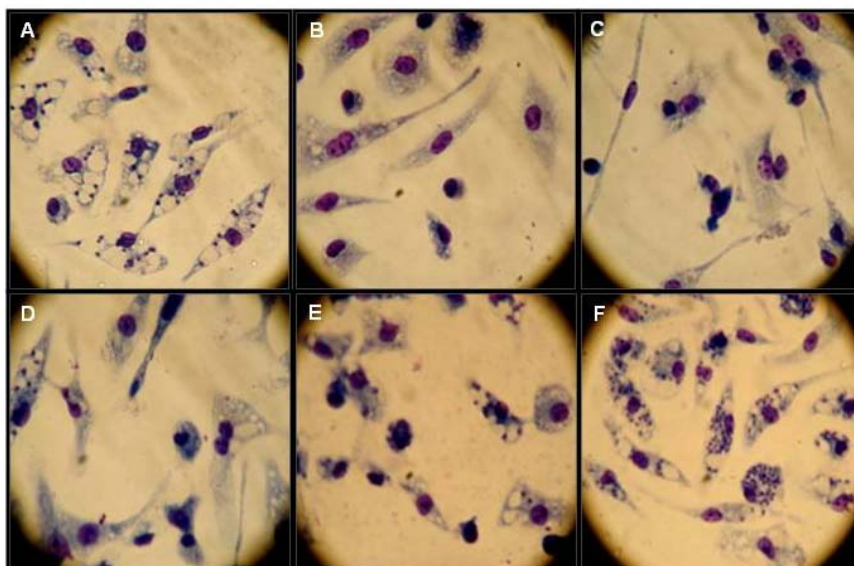


Figura 19: Teste quimioterápico tradicional *in vitro*. Susceptibilidade de *L. amazonensis* WT à Anfotericina B em macrófagos murinos (Balb/c) corados pelo método Panótipo Rápido. A) Controle positivo, B) 1µg/ml, C) 0,5µg/ml, D) 0,25µg/ml, E) 0,12µg/ml, F) 0,06µg/ml.

4.6.1 Tratamento com drogas tradicionais

4.6.1.1 Anfotericina B

Para avaliar o potencial uso das cepas geneticamente modificadas em futuros testes quimioterápicos, estes experimentos tiveram como objetivo comparar as médias das porcentagens de infecção nos macrófagos expostos às drogas. Estes valores foram comparados pelo teste estatístico de Wilcoxon e utilizados para a determinação dos IC₅₀s utilizando o programa Microcal Origin. Nos primeiros testes utilizamos dois fármacos de uso corrente no tratamento das Leishmanioses: anfotericina B e glucantime.

Os resultados representativos de 3 experimentos independentes foram utilizados para calcular as médias das porcentagens de infecção em macrófagos expostos à anfotericina B (Tabela 2). Os valores foram utilizados para plotar as curvas de IC₅₀ (Figura 20). Não foi observada diferença na susceptibilidade à esta droga entre as cepas WT e GFP, que apresentaram valores de IC₅₀ de 0,14 e 0,16 µg/mL, respectivamente (P=0,74).

Tabela 2: Porcentagens médias de células infectadas obtidas em diferentes doses de Anfotericina B ($\mu\text{g/ml}$) nas cepas selvagem (WT) e transformada (GFP).

Anfotericina ($\mu\text{g/ml}$)	Média \pm DP	
	WT	GFP
1	0 ± 0	0 ± 0
0,5	$0,63 \pm 0,64$	$2,75 \pm 1,58$
0,25	$14,99 \pm 1,81$	$29,15 \pm 1,58$
0,12	$62,50 \pm 13,13$	$65,27 \pm 1,58$
0,06	$81,87 \pm 8,33$	$85,69 \pm 8,78$

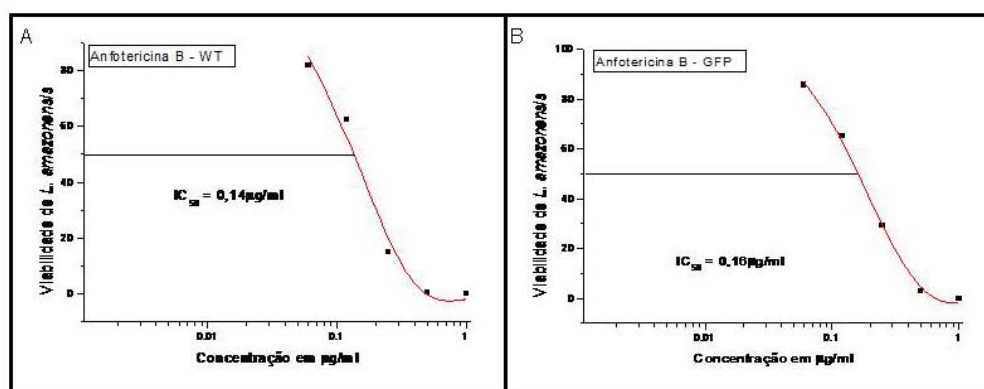


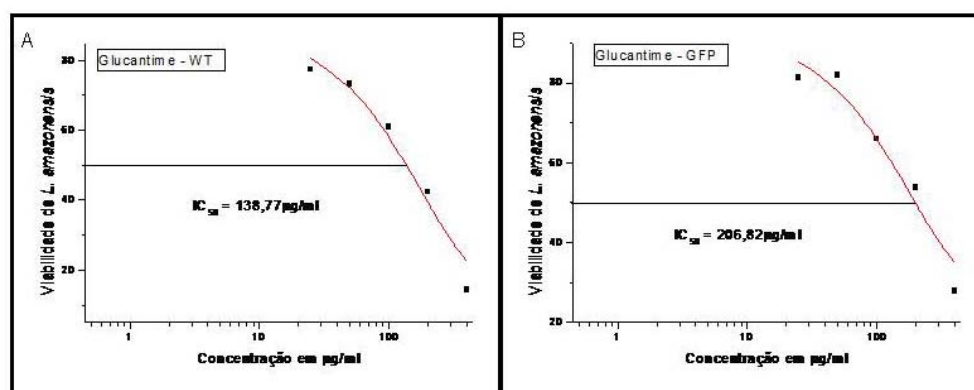
Figura 20: Curvas de IC_{50} de Anfotericina B frente *L. (L.) amazonensis*. A) Cepa WT, B) Cepa GFP.

4.6.1.2 Glucantime

De forma semelhante ao realizado para a Anfotericina B, as médias de 3 experimentos independentes (Tabela 3) foram utilizadas para plotar curvas de IC_{50} (Figura 21). Para o glucantime, não foram observadas diferenças estatísticas nas médias de infecção entre cepas WT e GFP de *L. amazonensis* ($P=0,41$). As mesmas apresentaram valores de IC_{50} de 138,77 e 206,82 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 3: Porcentagens médias de células infectadas obtidas em diferentes doses de Glucantime ($\mu\text{g/ml}$) nas cepas selvagem (WT) e transformada (GFP).

Glucantime ($\mu\text{g/ml}$)	Média \pm DP	
	WT	GFP
400	14,41 \pm 5,97	27,90 \pm 10,24
200	42,31 \pm 10,90	53,75 \pm 19,15
100	60,98 \pm 13,52	65,88 \pm 10,06
50	73,17 \pm 9,69	81,88 \pm 14,88
25	77,41 \pm 3,31	81,27 \pm 17,30

**Figura 21:** Curvas de IC_{50} de Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) frente *L. (L.) amazonensis*. A) Cepa WT, B) Cepa GFP.

4.6.2 Moléculas derivadas do Propranolol

Como não foi observada diferenças na susceptibilidade entre as cepas WT e GFP expostas às drogas tradicionais, o próximo passo foi avaliar se este mesmo padrão se repetiria utilizando moléculas teste. Para tanto, os derivados do propranolol foram testados. Os resultados abaixo são representativos de 2 experimentos independentes.

As médias das porcentagens de macrófagos infectados (cepas WT e GFP) e expostos à todas as drogas testes não foram estatisticamente significantes (Wilcoxon, $P > 0,05$). Aqui representaremos estas médias (Tabela 4) apenas para a molécula UFOP 1, que apresentou valores de IC_{50} de 5,60 e 7,54 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas WT e GFP, respectivamente (Figura 22), sendo estes valores bem menores do que os observados para o glucantime (Figura 21). Além desta, as moléculas UFOP 2a, 2b, 3 e 4b foram ativas contra as cepas WT e GFP sendo possível determinar os valores de IC_{50} . As demais drogas não foram ativas e apresentaram

IC₅₀ maior que 50 µg/mL (Tabela 5). Para confirmar se a estimativa através da porcentagem de infecção (Tabelas 2 e 4) refletia os valores médio de IC₅₀ dos experimentos outra forma de análise é apresentada na Tabela 5. Nesta, estão representados os valores de IC₅₀ (média±desvio-padrão) dos experimentos. Similarmente, os valores do IC₅₀ foram muito próximos entre as cepas WT e GFP (P>0,05).

Tabela 4: Porcentagens médias das células infectadas obtidas em diferentes doses da molécula UFOP 1 (µg/mL) nas cepas selvagem (WT) e transformada (GFP).

UFOP 1 (µg/ml)	Média ± DP	
	WT	GFP
50	0,30 ± 0,42	0,13 ± 0,18
25	2,79 ± 0,97	2,42 ± 2,34
12,5	26,46 ± 2,99	29,02 ± 20,14
6,25	48,69 ± 20,89	61,08 ± 10,18
3,12	61,73 ± 13,51	72,84 ± 3,20

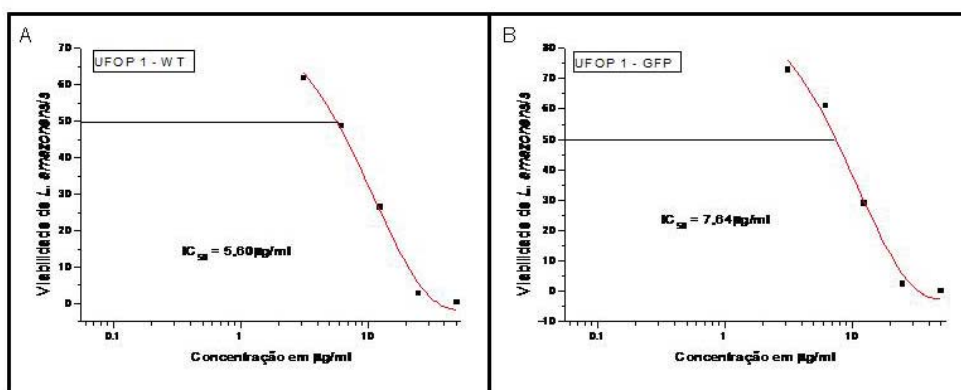


Figura 22: Curvas de IC₅₀ de UFOP 1 frente *L. (L.) amazonensis*. A) Cepa WT, B) Cepa GFP.

Tabela 5: Valores de IC₅₀ observados para *L. amazonensis* (WT e GFP) frente a drogas tradicionais e moléculas teste obtidos à partir da porcentagem de células infectadas (esquerda) e das médias dos valores de IC₅₀ (direita).

Droga	IC ₅₀ (µg/mL)***		IC ₅₀ (µg/mL)***	
	WT	GFP	WT	GFP
Anfotericina B*	0,14	0,16	0,14±0,02	0,16±0,006
Glucantime*	138,77	206,82	139,82±40,37	239,53±90,58
1**	5,60	7,54	5,38±2,74	7,67±0,95
2a ⁺	18,10	15,52	20,25	16,23
2b**	15,15	14,50	15,68±4,58	14,04±0,23
3**	15,52	20,68	15,50±3,15	23,15±2,18
4a**	>50	>50	>50	>50
4b**	12,70	9,31	12,67±3,53	9,98±2,32
5a**	>50	>50	>50	>50
5b**	>50	>50	>50	>50
5c**	>50	>50	>50	>50
5d**	>50	>50	>50	>50

⁺ Resultados representativos de 1 experimento.

* Resultados representativos de 4 experimentos.

** Resultados representativos de 2 experimentos.

*** Não foi observada diferença estatística entre os valores de IC₅₀ para as cepas GFP e WT (p>0,05).

Com base nos resultados observados a transfeção de *L. amazonensis* com o plasmídeo B5739 resultou na expressão do fenótipo fluorescente sem alterar sua susceptibilidade à infecção pelo parasito e às drogas tradicionais e moléculas teste.

5 DISCUSSÃO

A incidência das Leishmanioses no Brasil vem aumentando a cada ano, sendo observado um aumento progressivo nos casos tanto de LC quanto de LV (Brasil, 2005). Vários fatores são implicados neste aumento incluindo as modificações ambientais (Gontijo & Carvalho, 2003), adaptação dos vetores e reservatórios aos ambientes modificados pelo homem (Gontijo & Melo, 2004), ausência de uma vacina eficaz (Fernandes *et al.*, 2008), drogas extremamente tóxicas (Ouellette *et al.*, 2004) e cepas resistentes ao tratamento (Croft *et al.*, 2006).

O aparecimento de resistência tanto natural quanto adquirida aos antimoniais tem sido observada em várias partes do mundo, incluindo a América do Sul (Jackson *et al.*, 1990), Europa (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997) e na Índia, onde o fenômeno é bem mais estudado (Sundar *et al.*, 2000). Neste país, a resistência parece ter ocorrido devido ao uso indiscriminado e descontínuo do fármaco muitas vezes em doses sub-terapêuticas. Em Bihar, região endêmica, cerca de 60% dos casos não são responsivos ao tratamento com SbV (Yardley *et al.*, 2006). Há algumas drogas alternativas, incluindo anfotericina B e pentamidina, classificadas como segunda escolha. Entretanto, o uso destas também requer atenção, principalmente por apresentarem toxicidade e alto custo. Recentemente, um fármaco oral, a miltefosina, foi aprovado para o tratamento de casos humanos de Leishmaniose visceral (Quellette *et al.*, 2004) e cutânea (Soto *et al.*, 2004). Entretanto esta possui um tempo de meia-vida longo e o efeito teratogênico ainda requer estudos mais detalhados. Diante dos problemas de resistência, baixa efetividade no tratamento e a pequena lista de medicamentos disponíveis contra as Leishmanioses são necessárias a busca racional por novos fármacos com atividade leishmanicida. Os esquemas terapêuticos atuais estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses (Fonte: Croft *et al.*, 2006).

Tipo de Leishmaniose	Status das drogas	Drogas
Visceral	Primeira linha	Estibogluconato de sódio (Pentostan®), antimoniato de meglumina (Glucantime®) Anfotericina B (Fungizone®) Pentamidina
	Ensaio clínico	Miltefosina (oral fase IV) Paromomicina (fase III) Sitamaquina (oral, fase II) Anfotericina B outras formulações
Cutâneas	Primeira linha	Estibogluconato de sódio (Pentostan®), antimoniato de meglumina (Glucantime®) Anfotericina B (Fungizone®) Pentamidina Paromomicina
	Ensaio clínico	Miltefosina (oral fase III, registrado na Colômbia em 2005) Paromomicina (formulação tópica com gentamicina e surfactantes, fase II) Imiquimod (imunomodulador tópico, fase II) Antifúngicos azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol)

Devido ao pequeno número de drogas disponíveis para o tratamento das Leishmanioses e o inconveniente da maioria delas ser administrada por via parenteral, a busca por novas formulações tem sido objeto de vários grupos de pesquisa no mundo inteiro. Para o *screening* de novas moléculas são utilizadas várias metodologias. Dentre elas o teste tradicional, que se baseia na contagem manual das células pela microscopia óptica (Callahan *et al.*, 1997). Apesar de a microscopia óptica ser sensível, demanda muito tempo e é muito trabalhosa, além de necessitar de um profissional bem treinado. Assim, a reprodutibilidade experimental fica comprometida devido ao fator humano inserida na leitura do teste (Sanches *et al.*, 2007).

A busca por métodos alternativos para a etapa de leitura vem sendo adicionados automatizando o processo. Um destes métodos consiste na avaliação da viabilidade populacional celular pelo método MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Serenio *et al.*, 1997). Esta substância é um corante vital que permite avaliar a morte celular. Um segundo método utiliza a determinação da atividade da ornitina descarboxilase (ODC) (Assaraf *et al.*, 1994). Por ação da enzima ODC a L-ornitina é convertida em putrescina que é precursora de poliaminas. Essa síntese é essencial para o crescimento de protozoários como a *Leishmania*. Com os avanços da citometria de fluxo (Fouchet *et al.*, 1993) vários marcadores fluorescentes vem sendo desenvolvidos para os mais diversos estudos biológicos. O principal marcador utilizado em testes de drogas contra *Leishmania* é o Iodeto de propídeo (PI) (Serenio *et al.*, 2005). Este composto fluorescente liga-se ao DNA do

microorganismo intercalando-se inespecificamente entre as bases, e normalmente ele não atravessa a membrana celular por ser pouco lipossolúvel. Portanto, quando isso ocorre é indício de perda de viabilidade. Todos estes métodos descritos acima requerem, de alguma forma, a inclusão de mais uma etapa seja ela uma reação ou marcação.

Genes repórteres incluindo luciferase, β -galactosidase, CAT, SEAP e a GFP de *Aequorea* vem sendo utilizados na transfecção de várias espécies de *Leishmania* para as mais diversas finalidades (Serenio *et al.*, 2007). Dentre as espécies do Velho Mundo são destacadas *L. infantum* e *L. donovani* transfectadas com luciferase episomal (Serenio *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005), *L. major* e *L. donovani* transfectadas com luciferase em plasmídeo de integração genômica (Roy *et al.*, 2000), *L. donovani* e *L. infantum* com GFP episomal (Singh & Dube, 2004; Dube *et al.*, 2005; Kamau *et al.*, 2001). Dentre as espécies do Novo Mundo existe apenas *L. amazonensis* episomal (Chan *et al.*, 2003; Okuno *et al.*, 2003). A transfecção episomal tem como principal desvantagem a manutenção constante do parasito sob pressão de antibiótico para que não haja a expulsão do plasmídeo (Ha *et al.*, 1996). Em nosso trabalho, produzimos com sucesso as cepas GFPs com integração do plasmídeo no DNA genômico, e clonamos por seleção de colônias uma população homogênea. Isto garante a característica clonal e evita contaminação com parasitos não transfectados (Beverley & Clayton, 1993). Além de não ser necessária a manutenção contínua em presença da droga de seleção, no caso a fleomicina.

Neste trabalho, foi demonstrado que a transfecção permitiu separar com sucesso as populações GFPs das selvagens. O forte sinal observado permitiu a análise pela citometria de fluxo com separação completa entre as duas populações. Resultados semelhantes foram observados por Ha *et al.*, (1996) e Chan *et al.*, (2003) utilizando *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis* episomal. Produzimos pela primeira vez uma cepa de *L. amazonensis* GFP com integração no DNA e outras espécies do Brasil incluindo *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Nossos resultados demonstram que a transfecção não alterou o tamanho e a granulidade dos parasitos, bem como o perfil de divisão celular. Dispomos atualmente das quatro espécies GFPs de maior importância epidemiológica no Brasil (Tabela 7).

Tabela 7: Espécies de *Leishmania* expressando gene repórter.

Espécie	Gene Reporter	Expressão	Autores
Espécies do Velho Mundo			
<i>L. donovani</i>	Luciferase	Episomal	Gupta <i>et al.</i> , 2005
<i>L. infantum</i>	Luciferase	Episomal	Sereno <i>et al.</i> , 2001
<i>L. major</i> e <i>L. donovani</i>	Luciferase	Integração no DNA	Roy <i>et al.</i> , 2000
<i>L. donovani</i>	GFP	Episomal	Singh, Dube 2004
<i>L. infantum</i>	GFP	Episomal	Kamau <i>et al.</i> , 2001
Espécies do Novo Mundo			
<i>L. amazonensis</i>	GFP	Episomal	Okuno <i>et al.</i> , 2003
<i>L. amazonensis</i> (pH8)	GFP	Integração no DNA	Rocha <i>et al.</i> , 2009 (não publicado)
<i>L. braziliensis</i> (M2903)	GFP	Integração no DNA	Rocha <i>et al.</i> , 2009 (não publicado)
<i>L. chagasi</i> (BH46)	GFP	Integração no DNA	Rocha <i>et al.</i> , 2009 (não publicado)
<i>L. guyanensis</i> (M4147)	GFP	Integração no DNA	Rocha <i>et al.</i> , 2009 (não publicado)

Segundo Wood, (1995) e Ha *et al.*, (1996) o rápido progresso da genética molecular e a utilização dos genes repórteres têm permitido a manipulação e o monitoramento de eventos celulares. Este progresso também levou ao desenvolvimento de equipamentos que pudessem detectar determinado fenótipo de interesse. É importante salientar que a disponibilidade de métodos colorimétricos, luminescentes e fluorescentes deve ser levada em conta na escolha do melhor modelo e hipótese de trabalho. Cada método possui vantagens e desvantagens específicas (Naylor, 1999). No caso da GFP, justificamos nossa escolha devido ao fato desta proteína não possuir atividade endógena e ser auto-fluorescente em *Leishmania* não necessitando, portanto, de substrato. Ela pode ser facilmente detectada em um fluorímetro ou citômetro de fluxo (Fouchet *et al.*, 1993) e os mutantes não alteram suas características morfológicas básicas (Chalfie, 1995).

A produção de espécies de *Leishmania* GFPs em nosso trabalho tem a finalidade de utilizá-las na quimioterapia, uma vez que há necessidade de testes mais rápidos e sensíveis que ajudaria na identificação de novas moléculas leishmanicidas. Com a detecção do fenótipo de tais genes repórteres é possível verificar a viabilidade do parasito indiretamente através da medida em um aparelho, o que removeria o sistema manual de análise, aumentando a sensibilidade, confiabilidade, conveniência e possibilitando a triagem em larga escala de novas moléculas (Sereno *et al.*, 2007).

Como as formas promastigotas foram biologicamente semelhantes nos parâmetros morfológicos, nosso próximo interesse foi avaliar a permanência da expressão da proteína GFP nas formas amastigotas intracelulares. Para isso, macrófagos murinos foram infectados com o clone fluorescente de *L. amazonensis* e levados no MLC. Foi verificada a manutenção

da emissão de fluorescência e este resultado reforça a utilização do modelo para a semi-automatização do método de *screening* de drogas.

A maioria dos testes de drogas relatados na literatura quando não utilizam apenas a avaliação sobre as formas promastigotas (Chan *et al.*, 2003) avaliam a atividade sobre as amastigotas axênicas, cultivadas *in vitro* (Shimony & Jaffe, 2008). Estes dois modelos de *screening in vitro* são válidos, mas não representam a realidade enfrentada pelo parasito, seja no hospedeiro humano ou animal.

Existem outros estudos que avaliam a atividade de uma substância diretamente no modelo animal (Sinagra *et al.*, 2007). Embora a avaliação *in vivo* seja uma etapa crucial, nem sempre há correlação entre o teste *in vitro* e *in vivo*. O uso excessivo de animais não é recomendado pelos princípios éticos da experimentação animal, além de aumentar muito o custo do projeto. Por isso, o ideal é a identificação primária utilizando um método *in vitro* eficiente para posterior avaliação *in vivo*.

O citômetro de fluxo é amplamente utilizado no *screening* de drogas para avaliação de morte parasitária intracelular, contudo são utilizados os métodos que necessitam a adição de um marcador como o iodeto de propídeo (Kram *et al.*, 2008). A utilização de parasitos fluorescentes no teste de drogas, na sua maioria, é realizada sobre as formas promastigotas, que no ambiente estão presentes no inseto vetor, ou amastigotas axênicas, cultivadas *in vitro*. Até o momento, observa-se a ausência de metodologias que empreguem parasitos fluorescentes infectando macrófagos.

Para permitir os futuros testes de *screening* utilizando os parasitos fluorescentes foi necessário avaliar se a susceptibilidade aos medicamentos utilizados no tratamento da Leishmaniose (Glucantime e Anfotericina B) não havia sido alterada. Para isso, foi realizado o ensaio tradicional comparando a cepa GFP com a WT. Após análises estatísticas dos dados obtidos ficou comprovado que a susceptibilidade era semelhante. Em nenhum outro estudo da literatura tal comparação havia sido realizada até o momento. De acordo com Croft *et al.*, (2006) é necessário avaliar se a susceptibilidade de organismos geneticamente relacionados à determinado fármaco se altera devido a expansão clonal. No nosso caso, utilizamos parasitos provenientes de uma única colônia, o que diminui em muito esta possibilidade.

Uma dinâmica interessante na busca de drogas é aproveitamento máximo de uma molécula. Com esta finalidade, químicos trabalham em alterações estruturais das moléculas na busca da melhor condição de solubilidade e potencial atividade contra determinado microorganismo. As mais diversas mudanças podem ser realizadas como a troca de radicais, a mudança na polaridade, substituição, inserção ou deleção de uma estrutura. Com este objetivo, as moléculas testadas neste trabalho sofreram modificações no intuito de melhorar a

atividade leishmanicida das mesmas. O propranolol foi à molécula original utilizada por ter demonstrado atividade prévia contra *T. cruzi* (Hamond *et al.*, 1984). Este já é um medicamento comercializado e utilizado no tratamento da hipertensão arterial, profilaxia e tratamento de arritmias cardíacas, profilaxia do reinfarcto do miocárdio, entre outras. A atividade se deve a propriedades antagonistas dos receptores β -adrenérgicos. (Rang *et al.*, 2005). Entretanto, ela pode provocar vários efeitos colaterais como insuficiência cardíaca congestiva, agravamento dos distúrbios de condução atrioventricular, bradicardia intensa e hipotensão, sobretudo em aplicação intravenosa, infarcto do miocárdio ou cardiotoxicose em consequência do rebote causado pela supressão brusca do tratamento. Além de broncoespasmo e bloquear o efeito broncodilatador da epinefrina em pacientes que sofrem de alergia, asma brônquica, enfisema pulmonar ou bronquite não alérgica. Por estes fatores o propranolol não poderia ser utilizado no tratamento da Leishmaniose sem que a estrutura química responsável por tal ligação fosse inativada. Neste estudo o propranolol e seu cloridrato foram modificados a partir da substituição do grupo isopropilamina por grupos heterocíclicos, tais como, piperidina ou morfina para que tal atividade fosse eliminada.

Após o teste de susceptibilidade das 10 moléculas derivadas do propranolol verificamos que 5 delas mostraram uma atividade quando comparadas ao Glucantime uma das drogas de referência. A principal característica comum em 4 das 5 moléculas ativas é a presença do anel naftaleno, fazendo desta estrutura candidata a ser responsável pela atividade observada. Similar ao que foi observada para as drogas padrões, a susceptibilidade tanto da *Leishmania* transformada quanto da selvagem não se alterou frente aos derivados do propranolol, reforçando a utilização destes parasitos como modelo para a semi-automatização da técnica.

Este trabalho abre perspectivas para a semi-automatização da técnica de *screening* de drogas em *Leishmania* utilizando as quatro espécies mais importantes epidemiologicamente no Brasil. Pretendemos como perspectivas futuras para este trabalho avaliar a susceptibilidade às drogas tradicionais e aos derivados do propranolol para *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Com a recente aquisição de um fluorímetro pela Instituição iremos partir para a padronização e semi-automatização do método. Isto possibilitará uma maior eficiência na identificação de compostos e abre perspectivas de colaboração com grupos de pesquisa não só do Brasil como também do exterior. Esperamos identificar compostos que sejam menos tóxicos, de administração oral, com menos efeitos colaterais que ajudem a controlar estas enfermidades tão mórbidas causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*.

6 CONCLUSÕES

Foi possível obter as quatro espécies de *Leishmania* transfectadas com o gene da proteína verde fluorescente;

A transfecção não alterou o tamanho e a granulosidade dos parasitos para as quatro espécies estudadas;

A inserção da GFP não alterou a infectividade de *L. amazonensis* para macrófagos murinos;

A susceptibilidade das cepas selvagem e GFP de *L. amazonensis* frente às drogas tradicionais (Glucantime e Anfotericina B) e moléculas testes não foi alterada após a transfecção;

Os derivados do propranolol 1, 2a, 2b, 3 e 4b apresentaram atividade *in vitro* contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;

A cepa de *L. amazonensis* GFP poderá ser utilizada para o desenvolvimento de uma metodologia semi-automatizada para testes quimioterápicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALRAJHI AA, IBRAHIM EA, DE VOL EB, KHAIRAT M, FARIS RM, MAGUIRE JH (2002). Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *New England Journal Medical*, 346 (12): 891-895.

AMATO VS, PADILHA ARS, NICODEMO AC, DUARTE MIS, VALENTINI M, UIP DE, BOULOS M, AMATO VN (2000). Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study. *International Journal of Infectious Diseases*, 4 (3): 153-157.

ANDERSEN EM, CRUZ-SALDARRIAGA M, LLANOS-CUENTAS A, LUZ-CJUNO M, ECHEVARRIA J, MIRANDA-VERASTEGUI C, COLINA O, BERMAN JD (2005). Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (2):133-137.

ANDRADE AS, GOMES RF, FERNANDES O, MELO MN (2001). Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica*, 78 (3): 261-267.

ANTOINE J, PRINA E, LANG T, COURRET N (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, 7 (10) 392-401.

ARMIJOS RX, WEIGEL MM, CALVOPÍÑA M, MANCHENO M, RODRIGUEZ R (2004). Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 91 (2): 153-160.

ASHFORD RW (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30: 1269-1281.

ASSARAF YG, DRORI S, BACHRACH U, SHAUGAN-LABAY V (1994). Determination of multidrug resistance levels in cultured mammalian cells using ornithine decarboxylase activity. *Analytical Biochemistry*, 216: 97-109.

BAHAMDAN KA, TALLAB TM, JOHARGI H, NOURAD MM, IBRAHIM K, EL SHERBINI AH, KARKASHAN E, KHARE AK, NAURI MM (1997). Terbinafine in the treatment of cutaneous leishmaniasis: a pilot study. *International Journal Dermatology*, 36 (1): 59-60.

BALANÑA-FOUCE R, REGUERA RM, CUBRÍA JC, ORDÓÑEZ D (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, 30(4):435-443.

BAÑULS AL, HIDE M, PRUGNOLLE F (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 7 (64): 1-109.

BASSELIN M, COOMBS GH, BARRETT MP (2000). Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109 (1): 37-46.

BATES PA (1994). The development biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 79: 215-218.

BATES PA, ROGERS ME (2004). New insights into developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4: 601-609.

BECKER I, VOLKOW P, VELASCO-CASTREJON O, SALAIZA-SUAZO N, BERZUNZA-CRUZ M, DOMINGUEZ JS, MORALES-VARGAS A, RUIZ-REMIGIO A, PEREZ-MONTFORT R (1999). The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research*, 85 (3): 165-170.

BERHE N, WOLDAY D, HAILU A, ABRAHAM Y, ALI A, GEBRE-MICHAEL T, DESJEUX P, SÖNNERBORG A, AKUFFO H, BRITTON S (1999). HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS*, 3(14):1921-1925.

BERGMANN BR, COSTA SS, MORAES VLG (1997). Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science*, 49: 395-402.

BERMAN JD (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*, 24 (4): 684-703.

BERMAN JD, LEE LS (1984). Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *Journal Parasitology*, 70 (2): 220-225.

BEVERLEY SM, CLAYTON CE (1993). Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by eletroporation. *Methods in Molecular Parasitology*, 333-348.

BHATTACHARYA S, GHASH S, SHANT J, GANGULY NK, MAJUMDAR S. (2004). Effect of W07-toxin on gut physiological response in mice. *Microbial Pathogenesis*, 37 (1): 1-9.

BORJA-CABRERA GP, CORREIA PONTES NN, DA SILVA VO, PARAGUAI DE SOUZA E, SANTOS WR, GOMES EM (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-Quil-A saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20: 3277-3284).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6. ed. Brasília: MS, 2005. 806 p. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf > Acesso em: 27 dez. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Coefficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2006*. Brasília: MS, 2007. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_lv_incid.pdf. > Acesso em: 10 dez. 2008.

CALLAHAN HL, PORTAL AC, DEVEREAUX R, GROGL M (1997). An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 818-822.

CHALFIE M (1995). Green Fluorescent Protein. *Photochemistry and Photobiology*, 62: 651-656.

- CHAN MMY, BULINSKI JC, CHANG KP, FONG DA (2003). Microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric Green fluorescent protein. *Parasitology Research*, 89: 266–271.
- CHUNGE CN, NGIGE S, BWIBO CR, MULEGA PC, KILONZO JF, KIBATI F, OWATE J (1989). A rapid staining technique for *Leishmania* parasites in splenic aspirate smears. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 83(4):361-364.
- COLOMBO AL, MATTA D, ALMEIDA LP (2002). Fluconazole susceptibility of brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Brazilian Journal Infect Disease*, 6:118-23.
- CROFT SL, BARRETT MP, URBINA JA (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis *Trends in Parasitology*, 21 (11): 508-512.
- CROFT SL, NEAL RA, PENDERGAST W, CHAN JH (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36, 2633–2636.
- CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB, AH (2006). Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Review*, 119 (1): 111-126.
- CRUZ A, COBURN CM, BEVERLEY SM. (1991) Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Genetics*, 88: 7170-7174.
- CUNICO W, CECHINEL CA, BONACORSO HG, MARTINS MA, ZANATTA N, DE SOUZA MV, FREITAS IO, SOARES RP, KRETTLI AU (2006). Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16 (3): 649-653.
- DAVIES CR, KAYE P, CROFT SL, SUNDAR S (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326, 377-382.
- DAVIS AJ, MURRAY HW, HANDMANN E (2004). Drugs against leishmaniasis synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, 20: 73-76.

DESCOTEAUX A, GARRAWAY LA, RYAN KA, GARRITY LK, TURCO SJ, BEVERLEY SM (1994). Identification of genes by functional complementation in protozoan parasite *Leishmania*. *Methods in Molecular Genetics*, 3: 22-48.

DESCOTEAUX A, TURCO SJ (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1455: 341-352.

DESJARDINS RE, CANFIELD CJ, HAYNES JD, CHULAY JD (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 16, 710–718.

DESJEUX P & ALVAR J (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97 (1): 3–15.

DESJEUX P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious diseases*, 27:305-318.

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

DIETZE R, BARROS GB, TEIXEIRA L, HARRIS J, MICHELSON K, FALQUETO A (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral Leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 1240-1242.

DONKOR IO, ASSEFA H, RATTENDI D, LANE S, VARGAS M, GOLDBERG B, BACCHI C (2001). Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36 (6): 531-538.

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

ERCOLI N (1966). Drug responsiveness in experimental cutaneous leishmaniosis. *Experimental Parasitology*, 19 (3): 320-326.

ESFANDIARPOUR I, ALAVI A (2002). Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal Dermatology*, 41 (8): 521-524.

FARAUT-GAMBARELLI F, PIARROUX R, DENIAU M, GIUSIANO B, MARTY P, MICHEL G, FAUGÈRE B, DUMON H (1997). *In Vitro* and *In Vivo* Resistance of *Leishmania infantum* to Meglumine Antimoniate: a Study of 37 Strains Collected from Patients with Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 41 (4): 827–830.

FERNANDES AP, COSTA MM, COELHO EA, MICHALICK MS, DE FREITAS E, MELO MN, LUIZ TAFURI W, RESENDE DM, HERMONT V, ABRANTES CF, GAZZINELLI RT (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26 (46): 5888-5895.

FONG D, CHAN MM, RODRIGUEZ R, GATELY LJ, BERMAN JD, GROGL M (1994). Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51 (6): 758-766.

FOUCHET P, JAYAT C, HECHARD Y, RATINAUD MH, FRELAT G (1993). Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. *Biology of the Cell*, 78: 95-109.

FUMAROLA L, SPINELLI R, BRANDONISIO O (2004). *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, 155: 224–230.

GANGULY NK, BANO R, SETH SD (2001). Human genome project: pharmacogenomics and drug development. *Indian Journal of Experimental Biology* 39 (10): 955-961.

GARNIER T, MÄNTYLÄ A, JÄRVINEN T, LAWRENCE J, BROWN M, CROFT S (2007). *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (4): 802-810.

GONÇALVES R, VIEIRA ER, MELO MN, GOLLOB KJ, MOSSER DM, TAFURI WL (2005). A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infectious Diseases*, 5 (1): 39.

GONTIJO B, CARVALHO MLR (2003). American cutaneous leishmaniasis *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.

GONTIJO CMF, MELO MN (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7: 338-349.

GRIMALDI GJ, TESH RB, MCMAHON-PRATT D (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41 (6):687-725.

GUPTA AS, SUNDAR RS, GOYAL N (2005). Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene *in vitro* drug screening. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 3776–3783.

GUERIN PJ, OLLIARO P, SUNDAR S, BOELAERT M, CROFT SL, DESJEUX P, WASUNNA MK, BRYCESON AD (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Disease*, 2(8):494-501.

HA DS, SCHWARZ JK, TURCO SJ, BEVERLEY SM (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 77: 57-64.

HAMMOND DJ, COVER B, GUTTERIDGE WE (1984). A novel series of chemical structures active *in vitro* against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 91-51.

HERWALDT BL (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191–1199.

HOLLON T, YOSHIMURA FK (1989). Variation in enzymatic transient gene expression assays. *Analytical Biochemistry*, 182 (2): 411-418.

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

JACKSON JE, TALLY JD, ELLIS WY, MEBRAHTU YB, LAWYER PG, WERE JB, REED SG, PANISKO DM, LIMMER BL (1990). Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43 (5): 464-480.

JHA TK (1983). Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (2): 167-170.

KAFETZIS DA, VELISSARIOU IM, STABOULI S, MAVRIKOU M, DELIS D, LIAPI G (2005). Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *International Journal Antimicrobial Agents*, 25(1):26-30.

KAISER C, JEN T, GARVEY E, BOWEN WD, COLELLA DF, WARDELL JR (1977). Adrenergic agents. 4. Substituted phenoxypropanolamine derivatives as potential beta-adrenergic agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 20 (5): 687-692.

KAMAU SW, GRIMM F, HEHL AB (2001). Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds *in vitro* *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45 (12): 3654–3656.

KAMHAWI S, ORTIGÃO MR, PHAM VM, KUMAR S, LAWYER PG, TURCO SJ, MURY CB, SACKS DL, VELENZUELA JG (2004). A Role for Insect Galectins in Parasite survival. *Cell*, 119 (3): 329-341.

KAMHAWI, S (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22 (9): 439-444.

KHALIL EA, NUR NM, ZIJLSTRA EE, EL-HASSAN AM, DAVIDSON RN (1996). Failure of a combination of two antifungal drugs, terbinafine plus itraconazole, in Sudanese post kala-azar dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90 (2):187-188.

KILLICK-KENDRICK R (1979). Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: Biology of the kinetoplastida. Academic Press, London, New York & San Francisco, 2: 395-460.

KILLICK-KENDRICK R (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 1-24.

KRAM D, THALE C, KOLODZIEJ H, KIDERLEN AF (2008). Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *Journal of Immunological Methods* 333: 79–88.

KRAMP KL, DEWITT K, FLORA JW, MUDDIMAN DC, SLUNT KM, HOUSTON TA (2005). Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, 46: 695-698.

LAINSON R (1997). *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*; 11 (1): 29-40.

LAINSON R, SHAW JJ (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. v.1, Academic Press, London. 120p.

LAINSON R, e SHAW JJ (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, 273(5664): 595-600.

LAWYER PG, NGUMBI PM, ANJILI CO, ODONGO SO, MEBRAHTU YB, GITHURE JI, KOECH DK, ROBERTS CR (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 43(1): 31-43.

LIN CJ & BARBOSA AS (2002). Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46(4): 330-340.

LIRA R, CONTRERAS LM, RITA RM, URBINA JA (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47 (5): 537-546.

LIRA R, MÉNDEZ S, CARRERA L, JAFFE C, NEVA F, SACKS D (1998). *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Experimental Parasitology*, 89 (3): 331-342.

LUX H, HEISE N, KLENNER T, HART D, OPPERDOES FR (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 111: 1-14.

LYNN MA, MCMASTER WR (2008). *Leishmania*: conserved evolution--diverse diseases. *Trends Parasitology*, 24(3):103-105

MAAROUF M, ADELIN MT, SOLIGNAC M, VAUTRIN D, ROBERT-GERO M. (1998). Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite*, 5 (2): 167-173.

MAAROUF M, DE KOUCHKOVSKY Y, BROWN S, PETIT PX, ROBERT-GERO M (1997). *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232 (2): 339-348.

MAIN BG, TUCKER H (1985). Recent advances in beta-adrenergic blocking agents. *Progress in Medicinal Chemistry*, 22: 121-164.

MARTINEZ S, GONZALEZ M, VERNAZA ME (1997). Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate. *Chinese Infect Disease*, 24: 165-169.

- MARTINEZ S, MARR JJ (1992). Allopurinol in the treatment of american cutaneous *leishmaniasis*. *New England Journal of Medicine*, 326: 741-744.
- MBONGO N, LOISEAU PM, LAWRENCE F, CRACIUNESCU DG, ROBERT-GERO M (1998). Uptake into *Leishmania donovani* promastigotes and antileishmanial action of an organometallic complex derived from pentamidine. *Arzneimittelforschung*, 48 (8): 850-855.
- MIMORI T, SASAKI J, NAKATA M, GOMEZ EA, UEZATO H, NONAKA S, HASHIGUCHI Y, FURUYA M, SAYA H (1998). Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*, 210 (2): 179-186.
- MISTELI T, SPECTOR DL (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology*, 15: 961-964
- MOMENI AZ, AMINJAVAHARI M (2003). Successful treatment of non-healing cases of cutaneous *leishmaniasis*, using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. *European Journal Dermatology*, 13: 40-43.
- MORAIS-TEIXEIRA E, CARVALHO AS, COSTA JCS, DUARTE SL, MENDONÇA JS, BOECHAT N, RABELLO A (2008). *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania)amazonensis*, *L (L.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103 (4): 358-362.
- MOREIRA ES, ANACLETO C, PETRILLO-PEIXOTO ML (1998). Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitology Research*, 84 (9): 720-726.
- MOREIRA ES, SOARES RM, PETRILLO-PEIXOTO ML (1995). Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitology Research*, 81 (4): 291-295.

MUKHERJEE A, PADMANABHAN PK, SAHAMI MH, BARRETT MP, MADHUBALA R (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145: 1-10.

MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*; 366: 1561–1577.

NADERER T, MCCONVILLE, MJ (2008). The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, 10 (2): 301-308.

NAYLOR LH (1999). Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright. *Biochemical Pharmacology*, 58: 749-757.

NEAL RA & CROFT SL (1984). An in-vitro for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 14: 463-475.

NISHIMURA A, MORITA M, NISHIMURA Y, SUGINO Y (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18: (20) 6169

OKUNO T, GOTO Y, MATSUMOTO Y, OTSUKA H, MATSUMOTO Y (2003). Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the B-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Experimental Animals*, 52 (2): 109-118.

OLIVEIRA RB, SOUZA-FAGUNDES EM, SOARES RP, ANDRADE AA, KRETTLI AU, ZANI CL (2008). Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (9): 1983-1988.

OUELLETTE M, DRUMMELSMITH J, PAPADOPOULOU B (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 7: 257–266.

PASA S, TOZ SO, VOYVODA H, OZBEL Y (2005). Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate *Veterinary Parasitology*, 128: 243-249.

PAZZAGLI M (1992). Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, 204 (2): 315-323.

PECHÈRE JC (2001). Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing. *Japanese Journal of Antibiotics* 54: 87-89.

PEREZ-VICTORIA FJ, GAMARRO F, OUELLETTE M, CASTANYS S (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 49965–49971.

PEREZ-VICTORIA JM, PEREZ-VICTORIA FJ, PARODI-TALICE A, JIMENEZ IA, RAVELO AG, CASTANYS S, GAMARRO F (2001). Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2468–2474.

PETERS NS, EGEN JG, SECUNDINO N, DEBRABANT A, KILING N, KAMHAWI S, LAWYER P, FAY MP, GERMAIN RN, SACKS D (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321: 970-974.

PIMENTA PFP, MODI GB, PEREIRA ST, SHAHABUDDIN M, SACKS D (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology*, 115: 359-369.

POLI A, SOZZI S, GUIDI G, BANDINELLI P, MANCIANTI F (1997). Comparison of amanosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 71: 263-271.

PRATA A, SILVA-VERGARA ML, COSTA L, ROCHA A, KROLEWIECKI A, SILVA JC, DE PAULA EV, PIMENTA JUNIOR FG, GIRALDO LE (2003). Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 65-69.

RANG. H. P. DALE. M. M., RITTER, J.M. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001, 703.

RATH S, TRIVELIN LA, IMBRUNITO TR, TOMAZELA DM, JESÚS MN, MARZAL, PC (2003). Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. *Química nova*, 26 (4): 550-555.

REGUERA MR, TEKWANI BL, BALAÑA-FOUCE R (2005). Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology*, 140 (2): 151-64.

RIECKMANN KH, SAX LJ, CAMPBELL GH, MREMA JE, (1978). Drug sensitivity of *P. falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *Lancet*, 1: 22-23.

ROY G, DUMAS C, SERENO D, WU Y, SINGH AK, TREMBLAY MJ, OUELLETTE M, OLIVIER M, PAPADOPOULOU B (2000). Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110(2):195-206.

SACKS DL, PERKINS PV (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223 (4643):1417-1419.

SAMPAIO RNR, MARSDEN PD (1997). Mucosal *leishmaniasis* unresponsive to pentavalent antimonial therapy successfully treated with ambisome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91: 77-87

SANCHES BAM, VAROTTI FP, RODRIGUES FG, CARVALHO LHC (2007). Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 518-522.

- SANT'ANA PL, MILAN EP, MARTINEZ R (2002). Multicenter brazilian of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97:253-7.
- SEGAWA H, SOARES RP, KAWAKITA M, BEVERLEY SM, TURCO SJ (2005). Reconstitution of GDP-mannose Transport Activity with Purified *Leishmania* LPG2 Protein in Liposomes *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3) 2028–2035.
- SEN R, BANDYOPADHYAY S, DUTTA A, MANDAL G, GANGULY S, SAHA P, CHATTERJEE M (2007) Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal Medical Microbiology*. 56(9):1213-1218.
- SERENO D, ALEGRE AM, SILVESTRE R, VERGNES B, OUAISSI A (2005). *In vitro* antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 808–812.
- SERENO D, CORDEIRO DA SILVA A, MATHIEU-DAUDE F, OUAISSI A (2007). Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International* 56: 3–7.
- SERENO D, GUILVARD E, MAQUAIRE S, CAVALEYRA M, HOLZ,ULLER P, OUAISSI A, LEMESRE JL (2001). Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the *in vitro* life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas *Acta Tropica* 80: 195–205.
- SERENO D, LEMESRE JL (1997). Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 972–976.
- SHERLOCK IA, MIRANDA JC, SADIGURSKY M, GRIMALDI JG (1984). Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4): 511.
- SHIMONY O, JAFFE CL (2008). Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2): 196-200.

SILVA-VERGARA ML, SILVA LDE A, MANEIRA FR, DA SILVA AG, PRATA A (2004). Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Revista do Instituto Medicina Tropical*, 46(3): 175-177.

SILVEIRA FT, LAINSON R, BRITO AC, OLIVEIRA MRF, PAES MG, SOUZA AAA, SILVA BM (1997). Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. Doenças Infeciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP, 619-630.

SINAGRA A, LUNA C, ABRAHAM D, IANNELLA MC, RIARTE A, KROLEWIECKI AJ (2007). The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(6): 627-630.

SINGH N & DUBE A (2004). Fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 400–402.

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

SOARES RP, KRETTLI AU, DE SOUZA MV, VASCONCELOS TR, BOECHAT N (2006). Evaluation of antimalarial and fluoroquinolone combinations against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(3): 271-272.

SOARES RPP; MACEDO ME; ROPERT C; GONTIJO NF; ALMEIDA IC; GAZZINELLI RT; PIMENTA PFP; TURCO SJ (2002). *Leishmania chagasi*: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121: 213-224.

SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEGA JC, DIAZ A, LUZ M, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, BERMAN JD, JUNGE K, ENGEL J, SINDERMAN H (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 1266–1272.

SUNDAR S, JHA TK, THAKUR CP, ENGEL J, SINDERMAN H, FISCHER C, JUNGE K, BRYCESON A, BERMAN J (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 347: 1739–1746.

SUNDAR S (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, 6(11): 849-854.

SUNDAR S, MORE DK, SINGH MK, SINGH VP, SHARMA S, MAKHARIA A, KUMAR PCK, MURRAY H W (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 1104-1107.

SUNDAR S, THAKUR BB, TANDON AK, AGRAWAL NR, MISHRA CP, MAHAPATRA TM, SINGH VP (1994). Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. *BMJ*, 308: 307.

TAVARES J, OUAISSI M, OUAISSI A, CORDEIRO-DA-SILVA A (2007). Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. *Acta Tropica*, 103(2): 133-141.

TEIXEIRA GR, MENDES MA, CHIARI E OLIVEIRA AB, CORRÊA, CM (2001). Síntese de naftiloxipropanolaminas com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. 24^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MD010-MD010.

THAKUR CP, DEDET JP, NARAIN S, PRATLONG F (2001). *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2): 187-189.

THOMPSON JF, HAYES LS, LLOYD DB (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 103(2): 171-177.

URBINA JA (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(1): 9-16.

VAN ZANDBERGEN G, KLINGER M, MUELLER A, DANNENBERG S, GEBERT A,

SOLBACH W, LASKAY T (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*, 173: 6521-6525.

WEINRAUCH L, LIVSHIN R, EL-ON J (1987). Ketoconazole in cutaneous *leishmaniasis*. *British Journal of Dermatology*, 117: 666-668.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. *Leishmania/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases* World. 2000. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/strategic/en/leish_00_42.pdf> Acesso em: 20 jan. 2009.

WOOD KV (1995). Marker proteins for gene expression. *Current opinion in Biotechnology*, 6: 50-58.

YAMEY G, TORREELE E (2002). The world's most neglected diseases. *BMJ*, 325: 176-177.

YARDLEY V, ORTUÑO N, LLANOS-CUENTAS A, CHAPPUIS F, DONCKER S, RAMIREZ L, CROFT S, AREVALO J, ADAUI V, BERMUDEZ H, DECUYPERE S, DUJARDIN JC (2006). American Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? *The Journal of Infectious Diseases*, 194: 1168-75.