

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

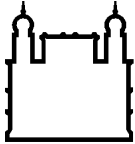
KAREN DOS SANTOS CHARRET

**EFEITOS DOS COMPOSTOS ACILHIDRAZONAS PIRAZÓLICAS SOBRE AS
FORMAS EVOLUTIVAS DA *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS CBA.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Biologia Parasitária.

Orientador: Dra. Leonor Leon

RIO DE JANEIRO
2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

KAREN DOS SANTOS CHARRET

**EFEITOS DOS COMPOSTOS ACILHIDRAZONAS PIRAZÓLICAS SOBRE AS
FORMAS EVOLUTIVAS DA *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS CBA**

ORIENTADOR : Dra. Leonor Leon

Aprovada em: ___/___/___

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves -IOC/Fiocruz -Revisor

Prof. Dra. Eliana Bergter - UFRJ

Prof. Dra. Alda Maria da Cruz – IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 25 de julho de 2011

À minha mãe e ao meu marido pelo carinho e apoio durante essa caminhada.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

“DAS UTOPIAS
Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e momentos da minha vida.

Agradeço a minha querida mãe (Marizete), meu marido (Laércio) e meus irmãos (Jorge Luiz e Wagner), por acreditarem em mim, incentivarem e ajudarem durante todo esse tempo. Amo todos vocês!

Agradeço a Dr^a Leonor Leon por me acolher mais uma vez como aluna, por todo apoio, cuidado e atenção que me foi dado e principalmente pelo precioso aprendizado.

Agradeço, a prof. Dr^a Veronica Figueiredo Do Amaral, por ter me iniciado na carreira científica, e pelo respeito e carinho com que sempre me tratou.

Agradeço a Dr Carlos Roberto Alves por aceitar ser revisor desta tese e pela sua atenção e cuidado.

Muitíssimo obrigada à amiga e companheira de bancada Raquel Rodrigues, pelas proveitosas discussões científicas e não científicas e por nossa amizade. Conseguimos chegar!

Agradeço a Dr^a Marilene Canto-Cavalheiro sua generosidade em ensinar, por todo apoio como chefe de laboratório e toda preciosa ajuda na realização desta tese.

Obrigada às Doutoradas Denise, Renata e Daniela, pelo apoio e carinho e aos Doutores Caio e Elmo, pelo auxílio científico e pelas conversas bem humoradas.

Obrigada aos companheiros de laboratório (LBqT): Gérzia, , Liliane, Marilela, Fernanda, Ludmila, Edézio, Válter, Viviane, Larissa, Juliana, Solange, que nesse período me deram valiosas contribuições científicas, além da adorável companhia. Em especial aos divertidíssimos Job e Mônica, pela amizade e companheirismo.

Agradeço a prof^a Dr^a Alice Bernardino, que ao ceder os compostos, nos proporcionou novos caminhos na pesquisa científica.

Muito obrigada a todos que fazem parte do departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio ao meu trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos professores e funcionários do departamento de Imunobiologia da Universidade Federal Fluminense, pela valorosa colaboração.

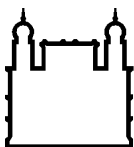
SUMÁRIO

• LISTA DE ABREVIATURAS	X
• RESUMO	XI
1 ABSTRACT	XIII
• 1 INTRODUÇÃO	01
• 1.1 ORDEM KINETOPLASTIDA	02
• 1.2 LEISHMANIOSE	05
• 1.3 CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO PARASITO CAUSADOR DA LEISHMANIOSE	09
• 1.4 CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA SP</i>	11
• 1.5 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i>	14
• 1.6 <i>LEISHMANIA SP.</i> E O SISTEMA IMUNITÁRIO DO HOSPEDEIRO	15
• 1.7 QUIMIOTERAPIA USADA NA LEISHMANIOSE	19
• 1.8 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS PARA A LEISHMANIOSE	27
• 1.9 ALVOS MOLECULARES EM ESTUDO	28
• 1.10 AS ACIL-HIDRAZONAS PIRAZÓLICAS	29
• 2 OBJETIVOS	32
• 3 DOCUMENTOS	35
1 3.1 DOCUMENTO 1	36
2 3.2 DOCUMENTO 2	44
3 3.3 DOCUMENTO 3	66

• 4 DISCUSSÃO	98
• 5 CONCLUSÕES	
108	
• 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
111	
• 8 ANEXO I	
134	
• 9 ANEXO II	
145	

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido aracdônico
CD – “Cluster of differentiation”
COX – Ciclooxygenase
DNA – Ácido desoxiribonucleico.
FC – Composto final
IFN- γ – Interferon gama
Ig – Imunoglobulina.
IL - Interleucina
iNOS – Óxido Nítrico sintase induzida
LC – Leishmaniose cutânea
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LMC – Leishmaniose mucosa
LCD – Leishmaniose cutâneo difusa
LTA - Leishmaniose tegumentar americana
LV – Leishmaniose visceral
LPG - lipofosfoglicanas
NO – Óxido nítrico (do Inglês nitric oxide)
OMS – Organização Mundial da Saúde
P – Precursor
PGs - Prostaglandinas
PKC – Proteína quinase C
RNA – Ácido ribonucleico.
TGF- β - Fator de crescimento transformador beta
Th – T auxiliar (“helper”)
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
5-LO – 5- Lipooxygenase



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

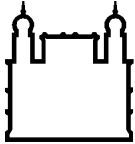
EFEITOS DOS COMPOSTOS ACILHIDRAZONAS PIRAZÓLICAS SOBRE AS FORMAS EVOLUTIVAS DA *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS CBA.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

KAREN DOS SANTOS CHARRET

Atualmente, não há vacina eficaz e o controle das leishmanioses depende principalmente da quimioterapia. Recentemente, novos compostos sintéticos os derivados carbohidrazidas pirazólicas apresentaram atividade em *Leishmania amazonensis in vitro* e quando testadas em modelo experimental murino de infecção de *L. amazonensis* mostraram um efeito terapêutico significativo. Um estudo com compostos intermediários da síntese das carbohidrazidas poderia ser interessante, pois estes possuem uma potencial atividade leishmanicida e ajudaria a compreender os mecanismos de ação dos compostos finais. Por outro lado, é necessário conhecer o comportamento do sistema imune frente a estes compostos na infecção por leishmaniose. Os compostos precursores não foram ativos em formas promastigotas de *L. amazonensis*. No entanto, todos os compostos apresentaram atividade sobre formas amastigotas e sem citotoxicidade em célula de mamíferos. Aqui, foi sugerida a contribuição farmacofórica do anel N-heteroaromático para a atividade leishmanicida e do grupamento hidrazina para o composto intermediário. Além disso, foi mostrado que todos os compostos podem induzir um aumento da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados ou não. Em camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* e tratados por via oral com os derivados carbohidrazidas, o estudo histopatológico revelou que mudanças na derme foram correlacionadas com o tamanho macroscópico da lesão. Camundongos CBA infectados e tratados tinham lesões cutâneas menores, e as estruturas da epiderme e derme tinham níveis mais baixos de infiltrado inflamatório, comparadas com as de camundongos controles infectados e não tratados. Também foi observado um infiltrado inflamatório misto contendo linfócitos e neutrófilos. Além disso, expressão de IL-4 RNAm foi menor no grupo tratado. Um aumento dos níveis de anticorpos da subclasse específica anti-*Leishmania* IgG2a/IgG3 foi observado nos grupos tratados com as pirazol carbohidrazidas. Um aumento dos níveis de anticorpos das subclasses específicas anti-*Leishmania* IgG2a e IgG3 foi observado nos grupos tratados com as pirozol carbohidrazidas. De modo geral, os resultados experimentais com os derivados carbohidrazidas exercem efeitos terapêuticos significativos, podendo agir diretamente sobre o parasito e/ou sobre as células dos sistemas imune do hospedeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

KAREN DO SANTOS CHARRET

There is no vaccine in clinical use, and the control of leishmaniasis relies mainly on chemotherapy. Recently, new synthetic pyrazole carbohydrazide compounds presented activity against *L. amazonensis in vitro* and when tested in an experimental murine infection model with *L. amazonensis* showed a significant therapeutic effect. Study with intermediary carbohydrazide compounds could be interesting because of its potential leishmanicidal activity and will help to understand the mechanism of action of the compounds. In another hand, it is necessary to know the immune system behavior with these compounds on leishmanial infection. The precursor compounds did not present activity on promastigote forms. However, all the compounds exhibited activity on amastigote forms and without cytotoxicity to the mammalian cell. Herein, it is suggested the pharmacophoric contributions for the leishmanicidal activity of the groups N-heteroaromatic ring and hydrazine in intermediary compound. Moreover, this study demonstrates that all compounds might increase NO production by stimulated or not macrophages. In CBA mice infected with *L. amazonensis* and orally treated with pyrazole carbohydrazides, the histopathological study revealed that changes in the dermis were correlated with the macroscopic size of the lesion. Infected CBA mice treated with pyrazole carbohydrazides had smaller skin lesions, and the structures of the epidermis and dermis had lower levels of inflammatory infiltration compared with the untreated infected control mice. It was also observed a mixed inflammatory infiltrate containing lymphocytes and neutrophils. In addition, IL-4 mRNA expression was at a lower level in the treated group. Increased levels of the specific anti-*Leishmania* IgG2a/IgG3 antibody subclasses were observed in the pyrazole carbohydrazide-treated group. Overall, the experimental findings suggest that carbohydrazide derivatives exert significant therapeutic effects with leishmanicidal activity and/or on cell from immune system host.

INTRODUÇÃO

1 - Introdução

1.1 Ordem Kinetoplastida

Os kinetoplastidas são uma ordem de protozoários flagelados (Davila e Styler, 2002), pertencentes ao filo dos Englenozoa, juntamente com Euglenoidea e os Diplonemea (Preisfeld e cols. 2001; Moreira e cols. 2001, Busse & Preisfeld, 2003). Os kinetoplastidas divergem dos outros protozoários de seu filo principalmente pela presença de uma estrutura única, o cinetoplasto (Hannaert e cols. 2003; Leander, 2004), uma massa de DNA em uma mitocôndria única, que tem sua função, estrutura e modo de replicação diferenciada.

O cinetoplasto consiste em uma rede complexa de numerosos anéis encadeados de duas diferentes formas: algumas centenas de anéis de DNA duplo, chamados minicírculos, e a segunda, com poucas dúzias de anéis muito maiores, chamados maxicírculos, os quais respectivamente participam da edição de genes transcritos; e codificam proteínas e RNA típicos da mitocôndria (Morris e cols. 2001; Klingbeil e cols. 2004). De acordo com a fase do ciclo de vida do microorganismo, o cinetoplasto pode ser observado em diferentes posições em relação ao núcleo (Vickerman 1985).

Outra característica peculiar a esta ordem é a presença de um peroxissomo diferenciado chamado glicosomo, que desempenha papel central no seu metabolismo. Esta organela armazena algumas enzimas que fazem parte de vias anabólicas e catalíticas, incluindo as principais reações da via glicolítica e da via das pentoses. Esses organismos realizam reedição de DNA e usam a bolsa flagelar para tráfico de moléculas entre células (Opperdoes & Borst, 1977; Opperdoes, 1987; Vickerman, 1994; Michels e cols., 2000).

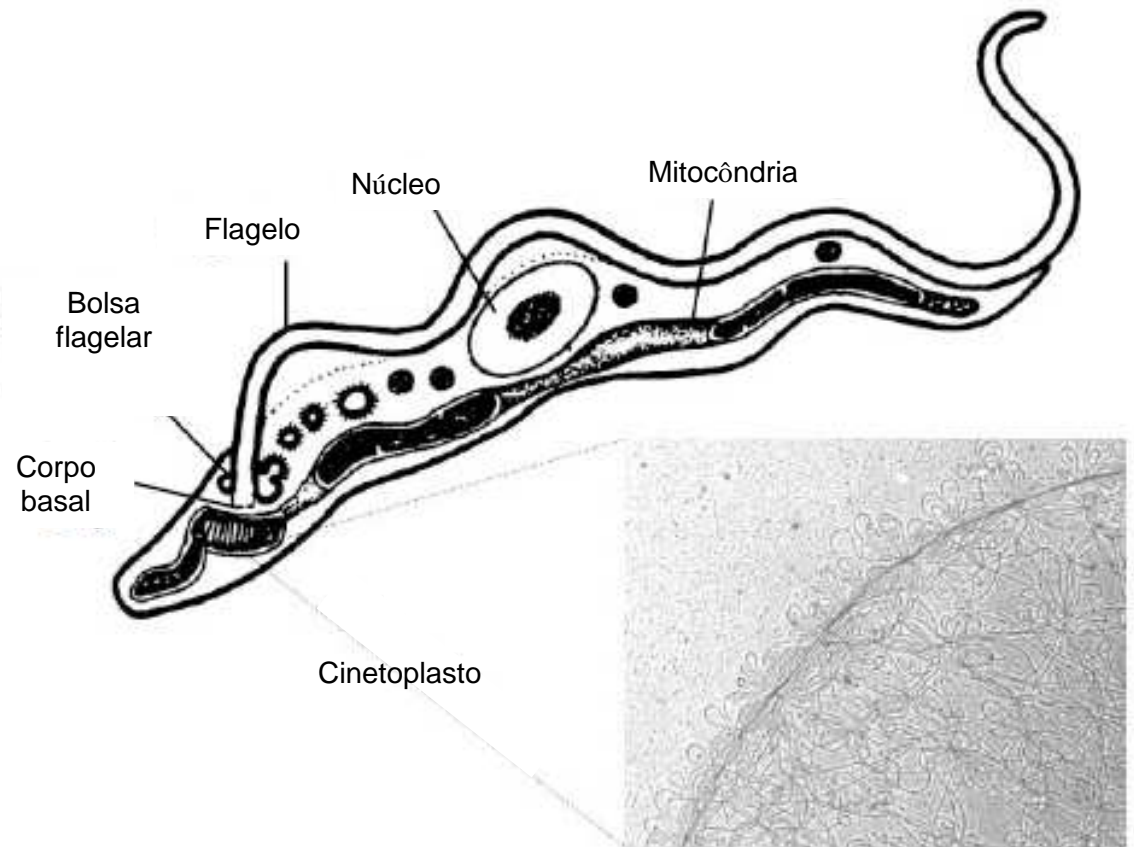


Figura 1- Desenho esquemático da estrutura de um organismo kinetoplastida, no detalhe, em aumento, se observa um corte do cinetoplasto, evidenciando os minicírculos. Adaptado de Vickerman 1985; Hannaert e cols. 2003; Klingbeil e cols. 2004)

Entre os seres pertencentes à ordem Kinetoplastida, podem ser encontrados organismos causadores de enfermidades humanas e veterinárias, assim como seres de vida livre (Simpson & Roger, 2004). Os organismos pertencentes à ordem Kinetoplastida estão divididos em duas subordens, a Trypanosomatina, que compreende os parasitos obrigatórios e a Bodonina, a qual pertencem os microorganismos de vida livre (Hoare, 1972).

Os tripanosomatídeos possuem uma morfologia relativamente uniforme e possuem a capacidade de parasitar uma grande diversidade de hospedeiros, incluindo animais, plantas e outros protistas. Estes protozoários adaptam com facilidade o seu metabolismo energético com a disponibilidade de substratos e oxigênio, e isso pode dar-lhes a capacidade de instituir novos ciclos de vida de acordo com os padrões de comportamento (Vickerman, 1994). O *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Leishmania spp.* (leishmanioses), o *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* (doença do sono humana) são os maiores patógenos humanos (Davila & Tyler, 2002). *T. congolense*, *T. vivax* e *T. b. brucei*, *T. evansi* causam doenças economicamente importantes em rebanhos e animais domésticos.

1.2 – LEISHMANIOSE

As doenças parasitárias, ainda hoje, denotam grandes preocupações relacionadas à saúde pública (OMS, 2010). Dentre estas destacamos a leishmaniose, doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esta doença apresenta duas formas clínicas principais: i) leishmaniose tegumentar, que inclui as formas cutânea (LC), muco-cutânea (LM), difuso cutânea (LDC) e cutânea disseminada (LD); ii) leishmaniose visceral (LV), que incidem em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Ashford e cols, 1992).

Segundo a OMS (2007), as leishmanioses atingem cerca de 10 milhões de pessoas no mundo e 350 milhões de indivíduos vivem em área de risco. O número de países afetados pela leishmaniose chega a 82 (Figura 1, 2), porém em apenas 32 destes países, a notificação é compulsória, fato que pode estar subestimando o número de casos. De acordo com Reithinger e colaboradores (2010), o número de novos casos a cada ano é de cerca de 2 milhões de pessoas e o número de mortes decorrentes da evolução da doença é de 59.000. Foram relatados casos de leishmaniose em países europeus em virtude da co-infecção com o vírus HIV (Agostoni e cols. 1998; Marty & Rosenthal, 2002; Cruz e cols., 2006), constituindo um grave problema, inclusive pela dificuldade na escolha do tipo de tratamento (Alvar e cols., 1997; Desjeux e cols., 2004). Os casos de co-infecção *Leishmania*/HIV já foram relatados em 34 países na África, Ásia, Europa e América Latina (Desjeux & Alvar, 2003; Rabello e cols., 2003).

Na América Latina, a endemia em expansão é alvo de grande preocupação em vários países, especialmente no Brasil, onde são registradas as maiores incidências de leishmaniose visceral e tegumentar americana (Grimaldi e cols., 1989). Somente no ano de 2002 cerca de 40.000 doentes com LC foram notificados (Desjeux, 2004).

No Brasil a LV está em franca expansão geográfica, distribuída em 19 estados, em 1551 municípios registrados entre os períodos de 1994 a 2002. Tem sido observado no país, aproximadamente, 3.000 casos/ano com letalidade média de 8% (Funasa, 2006).

A leishmaniose cutânea ocorre em todos os estados brasileiros. Estima-se que na região da Amazônia grande parte dos habitantes (51,8 %) já teve contato com o parasito (Fonseca e cols., 1973). Há um grande interesse na pesquisa e controle das leishmanioses, visto o notável aumento no número de casos. O que também desperta atenção é o fato desta doença, característica de regiões florestais, ocorrer notavelmente em regiões peri-urbanas e urbanas. Acredita-se que este fato está relacionado à migração de indivíduos do campo à cidade e ao avanço da construção de casas em áreas florestais (Passos e cols., 1993; Luz e cols., 2001).

A situação torna-se ainda mais grave sabendo-se que, apenas em junho de 2003, quase 100 casos de co-infecção *Leishmania*/HIV foram notificados no Brasil. Neste estudo, foi observado que cerca de 37% destes casos são de LV e 63% de LC (Rabello e cols., 2003, Nascimento e cols., 2011).

Em 1911, o médico brasileiro Gaspar Vianna, que também descreveu pela primeira vez a infecção por *Leishmania braziliensis*, propôs o tratamento da LC com o tártaro emético, um antimônio trivalente, que mas tarde devido a sua toxicidade foi substituído pelos antimônios pentavalentes. Ainda hoje, antimônios pentavalentes são usados como drogas de primeira escolha, porém sob duas formulações: antimônio de meglumina (glucantime) e estibogluconato de sódio (pentostan).

O tratamento com as drogas convencionais não tem demonstrado bons resultados em pacientes imunossuprimidos (Balaña-Fouce e cols., 1998). Além disso, são altos os índices de casos de resistência adquirida às drogas de primeira escolha, o que tem colocado como obsoleto o uso dos antimônios pentavalentes na Índia (Sudar, 2001). Porém essas drogas ainda são bastante usadas em outros países.

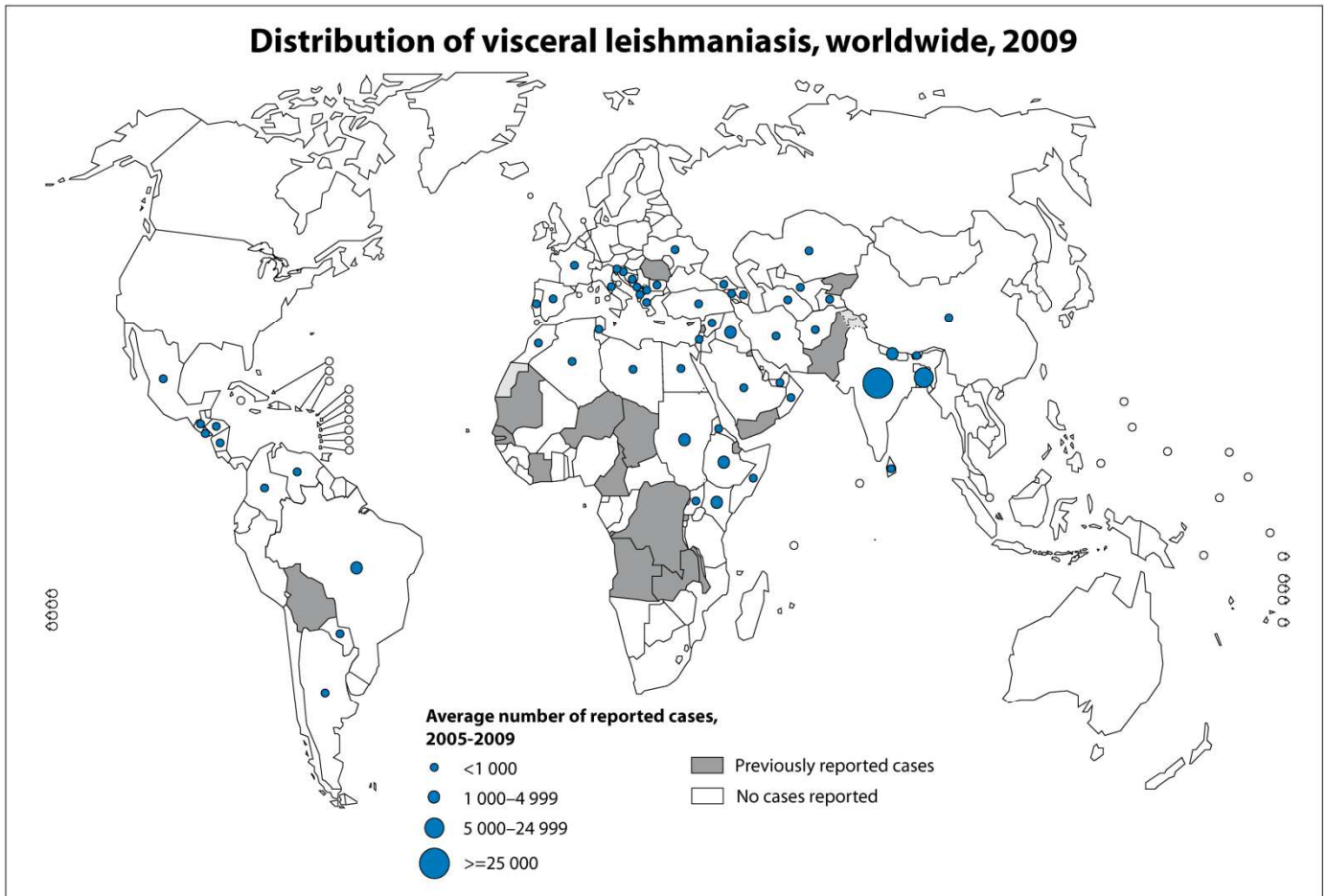
A redução no número de casos de leishmaniose humana poderia ser feita através da adoção de medidas profiláticas, interrompendo os ciclos de transmissão natural e o tratamento de pacientes infectados por diminuir o tempo de exposição de parasitos aos vetores. Porém, há diversos fatores que se interpõem a este objetivo:

- A diversidade de espécies de *Leishmania* patogênicas;
- O quadro epidemiológico complexo das infecções, dos reservatórios e

dos vetores envolvidos na transmissão;

- Ausência de uma vacina eficaz e, conseqüentemente, de programas de vacinação em áreas endêmicas;
- Crescente resistência dos parasitos às drogas utilizadas e seus diversos efeitos colaterais.

Os métodos atuais de profilaxia e controle do vetor, que envolvem pulverização de residências com inseticidas residuais e a exterminação de cães, são ineficazes e caros. Há novas alternativas, como o uso de coleiras repelentes para cães, que podem render bons resultados.

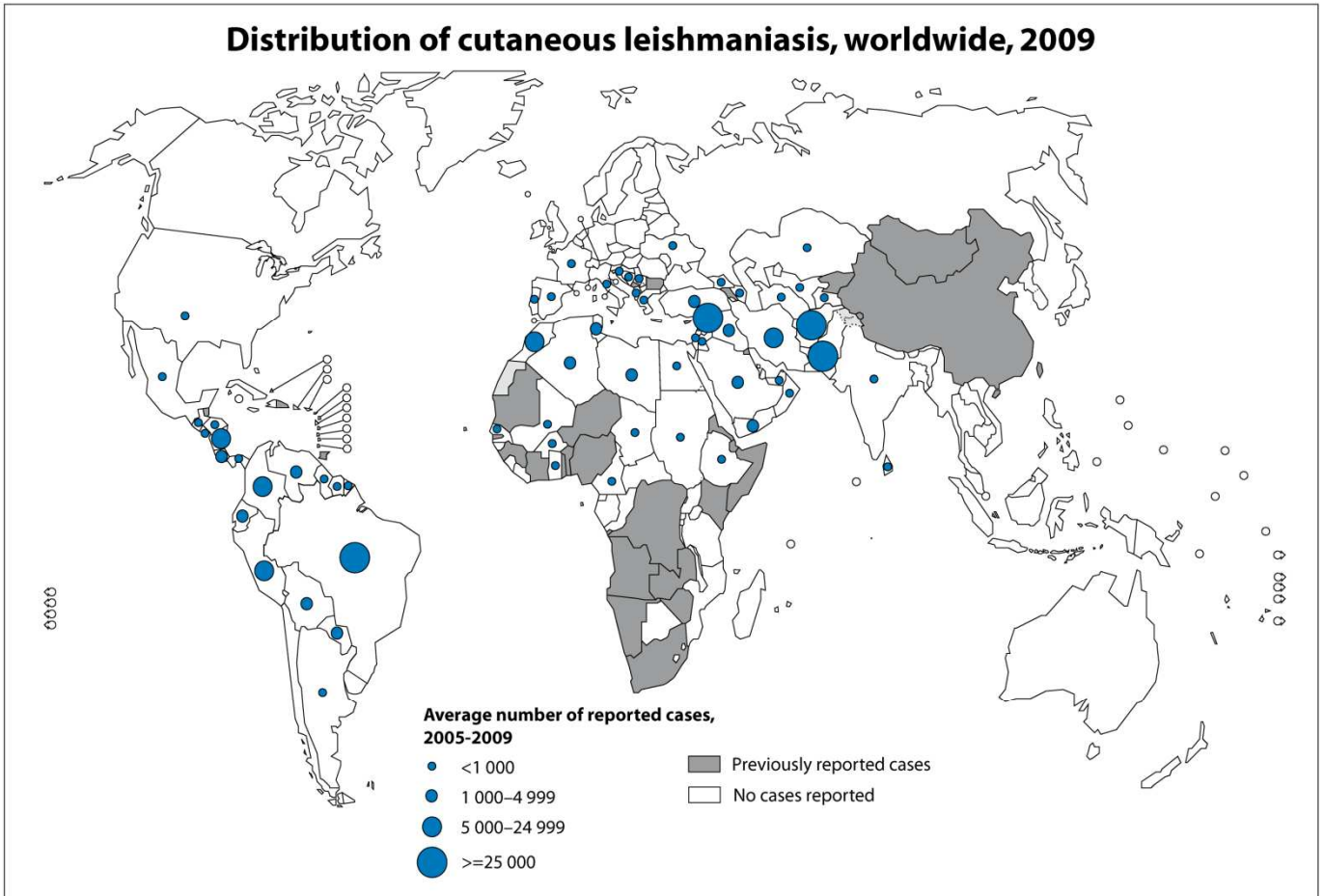


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
 Map Production: Control of Neglected
 Tropical Diseases (NTD)
 World Health Organization



Figura 1 – Mapas demonstrativos dos países com casos de leishmaniose visceral. Os países com casos de LV estão indicados com um círculo azul, o tamanho deste está correlacionado com o número de casos notificados (OMS, 2009, capturado em 10/07/11).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 2 – Mapas demonstrativos dos países com casos de leishmaniose cutânea. Os países com casos de LC estão indicados com um círculo azul, o tamanho deste está correlacionado com o número de casos notificados (OMS, 2009, capturado em 10/07/11).

1.3. CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO PARASITO CAUSADOR DA LEISHMANIOSE

O parasito do gênero *Leishmania* é um protozoário da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Os protozoários desta ordem apresentam uma única mitocôndria bem desenvolvida próxima ao flagelo, também chamada de cinetoplasto e contendo DNA (kDNA). As leishmânias são organismos flagelados, apresentando duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo biológico:

- Promastigota (Figura 3a), forma alongada fusiforme, extracelular, tem um flagelo livre e é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Bates & Rogers, 2004);
- Amastigota (Figura 3b), arredondada, seu flagelo é rudimentar, intracelular, parasita seletivamente células do sistema fagocítico mononuclear de seus hospedeiros vertebrados. Contudo, já se observou a forma amastigota em outros tipos celulares, como neutrófilos, fibroblastos e células dendríticas (Chang e cols., 1981; Ritting & Bogdan, 2000; Laufs e cols. 2002).

As diferenças entre estas duas formas, não são só morfológicas, existem diferenças moleculares e bioquímicas importantes. Estas incluem catabolismo de glicose e utilização de ácidos graxos (Coombs e cols. 1982; Hart & Coombs, 1982; Mottran & Coombs, 1985; Meade e cols. 1984), nucleases (Bates & Rogers, 1993), cisteína proteinases (Coombs & Mottran, 1997), metabolismo de purinas (Hassan e cols. 1985), fosforilação de proteínas (Dell & Engel 1994) e expressão gênica (Charest & Matlashewski, 1994).

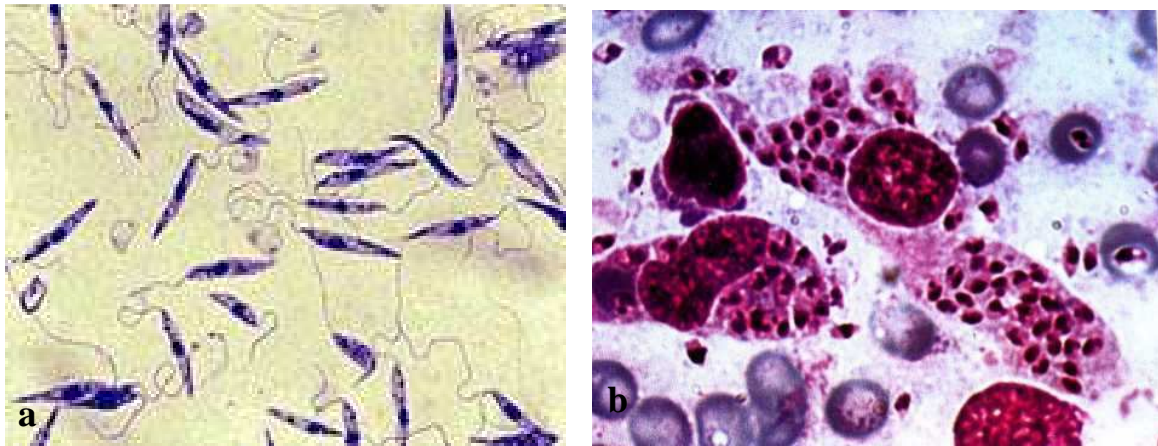


Figura 3 – (a) forma promastigota; (b) forma amastigota do gênero *Leishmania*.

Retirado das paginas da web: www.qir.com; www.turso.terra.com.br.

Cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* são patogênicas ao homem (Desjeux, 2004). A classificação e a nomenclatura das leishmânias oferecem grandes dificuldades por serem as espécies, morfologicamente muito parecidas, até mesmo indistinguíveis, sendo necessário o uso de métodos moleculares e de análise enzimática para esta distinção. Logo, a taxonomia de *Leishmania* é também muito complexa e diversos esquemas foram propostos para sua classificação. A divisão proposta por Lainson & Shaw (1987) considera o desenvolvimento do parasito no trato digestivo do inseto e sua importância evolucionária e biológica. Mais tarde, surge a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia*, Lainson & Shaw, 1987 e *Leishmania*, Saf'janova 1982 (Lainson & Shaw, 1987). De acordo com essa divisão o último subgênero inclui os agentes etiológicos desta doença no Velho Mundo (complexos *L. tropica*, *L. major* e *L. donovani*), e também parasitos do Novo Mundo, tais como as espécies do complexo *L. mexicana* (agentes da leishmaniose tegumentar Americana). Entretanto, o subgênero *Viannia* agrupa unicamente *Leishmania* do Novo Mundo (complexos *L. braziliensis*, *L. naiffi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. shawi*). Atualmente, as técnicas de biologia molecular representam uma importante ferramenta para o estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies e podem ter grande aplicabilidade, servindo de critério a uma distinção taxonômica (Cupolillo e cols., 2001). Conseqüentemente, as técnicas de biologia molecular contribuem para estudos epidemiológicos e de desenvolvimento de vacinas (Grimaldi & Tesh, 1993).

1.4 CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMÂNIA

A leishmaniose é uma doença zoonótica e antropozoonótica, que incide em áreas rurais e periurbanas. O parasito causador desta doença necessita de hospedeiros vertebrados e invertebrados para completar seu ciclo de vida. Há um grande número de animais vertebrados que servem de reservatório e que são mamíferos das seguintes ordens: Rodentia, Carnivora, Primata, Marsupialia, Endentata, e Equidae (Gramicci & Gradone, 2005). Porém, os roedores são os principais hospedeiros vertebrados.

O hospedeiro invertebrado, vetor da leishmaniose é um inseto, ordem Díptera da família Psychodidae e sub-família Phlebotominae (Figura 4). Os flebotomíneos são holometabólicos, presentes em locais úmidos e suas larvas são muito ativas, deslocando-se rapidamente e se disseminando facilmente. Os flebotomíneos são encontrados em quase todas as partes do mundo, contudo são mais presentes nas regiões neotropicais. Dois gêneros estão diretamente envolvidos na transmissão das leishmanioses (Magill e cols. 1993): no Velho Mundo os transmissores da leishmaniose são do gênero *Phlebotomus*, enquanto no Novo Mundo são do gênero *Lutzomyia*.



Figura 4 – Desenho ilustrativo do inseto flebotomíneo, vetor da leishmaniose.
(cassilandiajornal.com.br, capturada em 12/07/2011)

As leishmanias são transmitidas ao homem e outros vertebrados, através picada do inseto flebotomíneo, que durante o ato de hematofagia regurgita formas promastigotas metacíclicas infectantes no hospedeiro vertebrado. A adesão do promastigota à célula hospedeira é mediada por interações do tipo ligante/receptor e culminando na fagocitose. O parasito se liga a receptores, assim como o receptor de complemento C3 (Kane & Mosser, 2000; Mosser & Brittingham, 1997), de fibronectina (Peter e cols. 1995) e receptores de açúcares como o receptor de manose-fucose (Chang e cols. 1990), e outros (Mosser e cols. 1983). Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasito irá infectar células do sistema fagocítico mononuclear e com a formação do fagolisossoma e a acidificação do meio, vai se diferenciar na forma amastigota, que é capaz de resistir às hidrolases ácidas, sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos por divisão binária (Zilberstein & Shapira, 1994). A célula infectada e repleta de parasitos se rompe, liberando as formas amastigotas, que irão infectar outras células se disseminando no organismo (Figura 5).

Ao realizar o repasto sanguíneo, o flebotomíneo pode adquirir o parasito. No tubo digestório do inseto vetor, o parasito, na forma promastigota sofre varias etapas de diferenciação até a forma metacíclica na região da probóscida, Paralelamente as modificações morfológicas ocorrem mudanças predominantemente nas macromoléculas de superfície, que lhe conferem maior infecciosidade (Sacks e cols., 1994, Kaye & Scott, 2011).

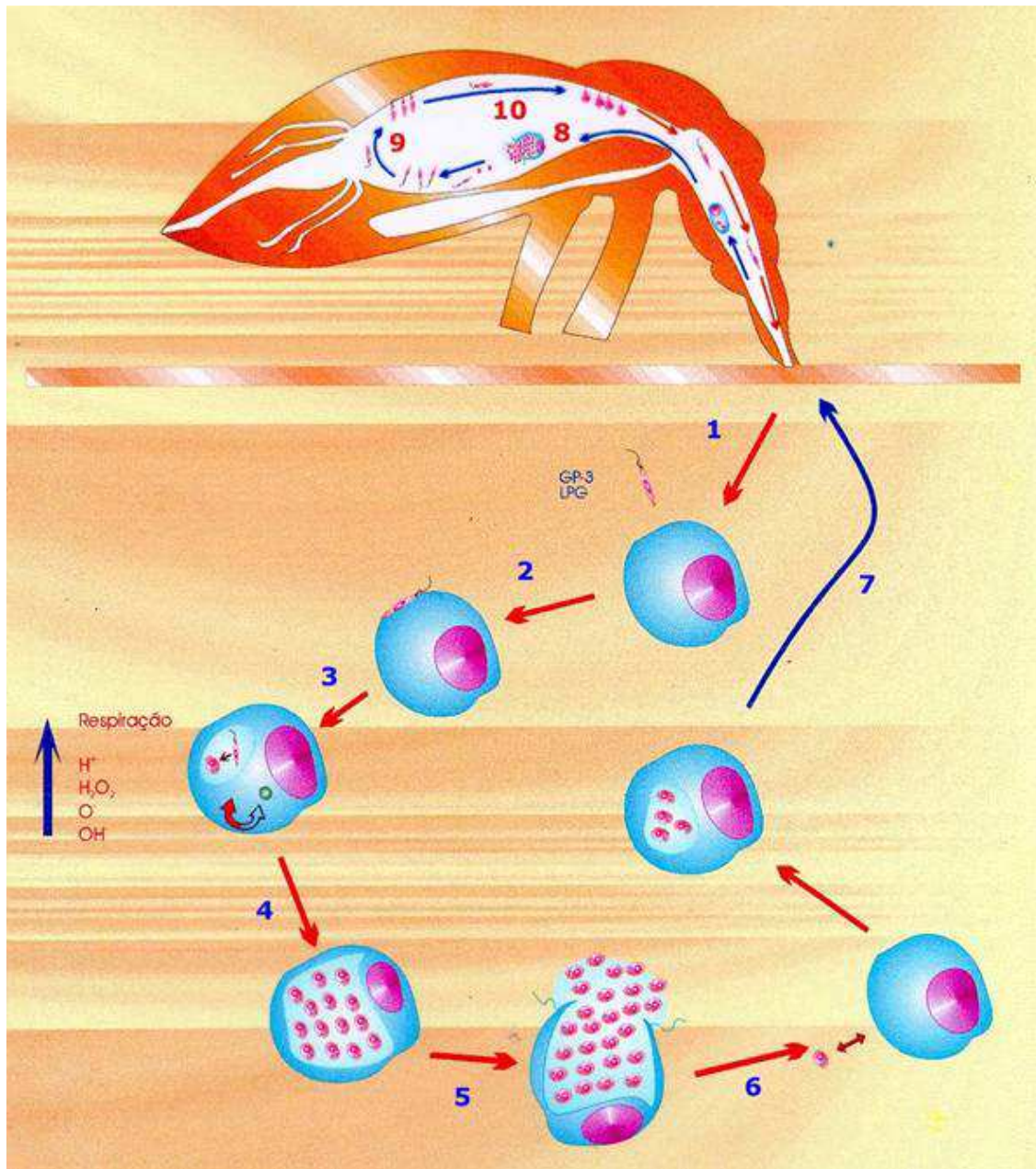


FIGURA 5 – Ciclo biológico da *Leishmania sp.* Insetos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo, adquirem formas intracelulares de *Leishmania* (7), quando vão para o tubo digestório (8), sofrendo modificações, até se transformarem em formas promastigotas metacíclicas (9-10). Estas migram para a probóscida do vetor, que transmite ao hospedeiro vertebrado em um novo repasto sanguíneo do inseto. No hospedeiro vertebrado (1), o parasito desenvolve-se no interior do macrófago, diferenciando-se em amastigota (2-4), que após intensa multiplicação do parasito rompe-se (5) liberando amastogotas (6) que vão infectar outras células. Ciclo biológico da leishmânia (modificado de www.parasitologia.com.br; capturado em 28/03/11)

1.5 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

As infecções por leishmânia, de maneira geral, se iniciam com uma pequena lesão característica. O curso desta infecção está intrinsecamente relacionado com a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da espécie de parasito envolvida. As características da doença podem variar de acordo com a espécie de leishmânia envolvida na infecção (Reithinger e cols., 2007). Essa infecção apresenta-se bastante diversa e complexa, variando de casos benignos de lesões cutâneas com cura espontânea a casos fatais de infecção visceralizada (Herwaldt, 1999). Desta forma, as leishmanioses podem ser organizadas em cinco grupos de acordo com a evolução da doença, sinais clínicos durante a infecção (Grimaldi & McMahon-Pratt, 1991, Reithinger e cols. 2007):

- Leishmaniose cutânea (LC), seus principais agentes etiológicos são: *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major* que apresentam lesão de pele única, ulcerada ou não, de extensão variada. Pode estar presente em várias partes do corpo e em geral, a lesão regride espontaneamente. A *L. amazonensis* é o agente etiológico da forma cutânea da doença principalmente no norte e nordeste do Brasil. Esta espécie foi descrita como também responsável por outras formas clínicas: mucocutânea, cutânea difusa e visceral (Barral e cols. 1991, Leon e cols., 1992; Sherlock, 1996).
- Leishmaniose mucosa (LM) causada principalmente pela *L. braziliensis*. É geralmente uma forma progressiva da leishmaniose cutânea. Caracteriza-se como lesão em mucosas (do nariz, boca e faringe), que levam à destruição do tecido, gerando deformidades, que segregam suas vítimas do convívio social. Pode estar associada ou não à lesão cutânea contígua;
- Leishmaniose cutânea difusa (LCD) é a forma anérgica de leishmaniose tegumentar, relacionada com sinais de imunossupressão específica;

caracterizada por lesões cutâneas metastáticas. No Brasil esta doença está associada à *L. amazonensis* (Grimaldi & Tesh, 1993).

- Leishmaniose disseminada (LD) é caracterizada pela presença de múltiplas lesões pleomórficas, em duas ou mais áreas, não contíguas do corpo (Reithinger e cols., 2007). Em estudos no nordeste do Brasil, mostraram que em 29% dos casos de LD, uma lesão da mucosa é também encontrada e nestes casos, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram as únicas espécies encontradas como causadoras deste tipo de Leishmaniose.
- Leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar é causada principalmente por *L. donovani* e *L. infantum* e determina a forma sistêmica da leishmaniose, com o comprometimento de tecidos e órgãos. Sintomaticamente caracterizado por febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia e, quando não tratada, leva à morte em 100% dos casos. As complicações da infecção e as hemorragias são os principais fatores de risco para a morte na leishmaniose visceral (Carvalho e cols. 2000).

1.6 A LEISHMANIA E O SISTEMA IMUNITÁRIO DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Geralmente a proteção conferida pelo sistema imunitário contra a leishmaniose está associada a uma resposta mediada por células. Os organismos deste gênero têm a capacidade de conviver, inibir e burlar a atividade antimicrobiana dos macrófagos do hospedeiro, além de subverter a indução de respostas do sistema imune inato e adaptativo (Sacks & Sher, 2002; McMahon-Pratt e cols., 2004). Desta forma, é válida a afirmativa de que estes parasitos são organismos bem sucedidos evolutivamente para viverem no hospedeiro (Sacks & Sher, 2002).

A caracterização funcional de duas populações distintas de linfócitos T CD4+ (Th1 e Th2) em camundongos (Mosman e cols. 1986) permitiu definir alguns dos mecanismos associados com resistência ou suscetibilidade do hospedeiro vertebrado a *Leishmania*. Alguns dados, obtidos na clínica, mostram que na doença humana ocorre uma dicotomia semelhante à atividade funcional de linfócitos T descrita em outros modelos da doença, ou seja, existe uma resposta do tipo 1 que está associada a infecções intracelulares, e uma resposta do tipo 2, predominante em indivíduos infectados com parasitos extracelulares, assim como helmintos; ou que apresentem sensibilidade alérgica (Romagnani 1991).

A resposta Th1 está relacionada com a produção de citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- α), com papel importante na ativação de macrófagos, e auxiliar na produção de anticorpos citofílicos e na reação de hipersensibilidade tardia na imunidade protetora contra patógenos intracelulares (Trinchieri, 1993). Entretanto, a resposta Th2 está associada com atividade funcional de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β e IL-13, estimulando assim a produção de anticorpos neutralizantes e inibindo várias funções em macrófagos (Coffman e cols. 1988, Fiorentino e cols. 1991). Um desequilíbrio eventual nos mecanismos de regulação das respostas Th1 e Th2 pode induzir alterações teciduais de natureza imunopatológica (Romagnani 1994).

De modo geral, os estudos em animais têm claramente mostrado para *L. major* uma relação de suscetibilidade e resistência relacionada com o padrão Th1/Th2. Camundongos BALB/c que apresentam uma resposta imune do tipo Th2, tem lesões progressivas e culminam com a sua morte. Porém camundongos C57BL / 6 e C3H, que desenvolvem o perfil Th1 de resposta, obtêm a cura de suas lesões naturalmente.

Entretanto, a infecção por *L. amazonensis*, causa lesões progressivas e não resolutivas em todas essas linhagens de camundongos (McMahon-Pratt & Alexander, 2004). Camundongos CBA são menos susceptíveis a infecção por *L. amazonensis* e apresentam o desenvolvimento da lesão lento e com persistente carga parasitária (Barral e cols., 1983; Neal & Hale, 1983; Afonso & Scott, 1993). Nas infecções em camundongos CBA foi constatada a produção de IL-4 e IL-10,

porém não de IFN- γ , em contraste com camundongos da mesma linhagem infectados com *L. major* que produzem IFN- γ e IL-10, mas não IL-4 (Lemos de Souza e cols, 2000).

Os mecanismos celulares responsáveis por esta suscetibilidade em camundongos à infecção por *L. amazonensis* ainda não são claros, foi mostrado que linfócitos T CD4+ desempenham papel importante na patogênese da doença (Soong e cols., 1997; Jones e cols, 2000), camundongos deficientes em T CD4+ funcional não desenvolvem lesões de tamanho considerável, mesmo em estágios tardios da infecção (Soong e cols, 1997). Outros tipos celulares também contribuem para o desenvolvimento da doença, assim como os linfócitos B e os anticorpos produzidos por estas (Kima e cols, 2000). Wanasen e colaboradores (2008) observaram que os linfócitos B desempenham um papel significativo na patogênese da doença, induzindo o recrutamento de linfócitos T para o tecido infectado e fazendo o “priming” do antígeno específico de linfócitos T CD4+ .

Alguns fatores relacionados à progressão da infecção são semelhantes aos envolvidos na patogênese de outras espécies. O TNF- α , durante a infecção por *L. amazonensis*, atua de forma geral, ativando macrófagos para matar parasitos e direcionando os linfócitos B para a produção de imunoglobulinas do tipo IgG2a, juntamente com IFN- γ , levando a resolução da lesão, assim como em outras espécies (Hernández-Ruiz e Becker, 2006). A citocina IL-13, relacionada ao perfil Th2, semelhante à IL-4 e IL-5 pode ter um papel importante na infecção promovendo a produção de IgE e regulando a reação de hipersensibilidade imediata (Matthews e cols. 2000; Hernández-Ruiz & Becker, 2006). Entretanto, a patogênese causada por esta espécie é independente da produção de citocinas IL-4/IL-10 (Ji e cols., 2003; Jones e cols., 2002).

Em termos gerais, a resolução da doença depende do sistema imunitário, cujo papel é basicamente ativar macrófagos infectados para eliminarem os parasitos intracelulares. Os macrófagos produzem uma série de compostos oxigenados, incluindo o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, além de radicais nitrogenados como o óxido nítrico (NO), que são

altamente tóxicos para patógenos intracelulares, como as leishmânias (Murray, 1981; Murray e cols., 1985, Titus e cols. 1984).

O NO é uma substância com diversas propriedades biológicas. Este é um potente vasodilatador (Vallance e cols. 1989), desempenha papel de neurotransmissor (Snyder & Bredt, 1992) e atua em processos inflamatórios (Tayeh & Marletta, 1989), além de diversas outras funções. Nos macrófagos e outras células fagocíticas, é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em resposta a processos patológicos (Green e cols, 1993; Mollace e cols., 2002). O NO reage com o peróxido de hidrogênio, dando origem ao peroxinitrito, composto relativamente estável e altamente microbicida (Panaro e cols., 1999; Bertholet & Mael, 2000).

Contudo, a *Leishmania* é capaz de resistir ao mecanismo microbicida do macrófago ativado, porque o parasito possui sistemas de detoxificação através da produção de enzimas como a superóxido dismutase e tripanotona redutase (Taylor e cols. 1994, Ghosh e cols. 2003). A leishmânia também atuaria alterando a sinalização intracelular, através da ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) (Moore e cols. 1993), pelo aumento do nível de cálcio intracelular, inibindo enzimas que estão relacionadas à produção de radicais oxigenados. A PKC também pode ser inibida por moléculas de LPG (Descoteaux e cols., 1992).

O modelo experimental murino de infecção por *L. amazonensis*, embora não completamente semelhante ao humano, é capaz de mimetizar muitas características fisiológicas deste (Awasthi e cols., 2004), sendo portanto, adequado para produzir dados que podem ser posteriormente utilizados como base para a compreensão da doença humana (Pereira & Alves, 2008).

1.7 QUIMIOTERAPIA USADA NA LEISHMANIOSE

O tratamento da leishmaniose enfrenta hoje muitas dificuldades. A quimioterapia atual é cara e muitas vezes ineficaz. A droga de primeira escolha têm sido os antimoniais pentavalentes por mais de 60 anos, apesar de apresentarem diversos efeitos colaterais, além dos crescentes casos de resistência ao tratamento (Ouellette e cols., 2004, Seifert, 2011). Poucos compostos foram desenvolvidos desde então. Em casos de imunossupressão, os índices de resistência adquirida a essas drogas são altos, como observado no tratamento da LV em pacientes com HIV (Balaña-Fouce e cols., 1998). Este fato demonstra a importância da participação do sistema imunológico no tratamento da leishmaniose (Berger & Fairlamb, 1992; Croft & Coombs, 2003; Cota e cols., 2011).

Apesar das diferenças na suscetibilidade entre as leishmanioses do Velho Mundo e do Novo Mundo, os mesmos medicamentos são utilizados para o tratamento (Quadro 1). Existem diferentes orientações terapêuticas em diversos países e regiões do mundo o que demonstra a complexidade na abordagem terapêutica das leishmanioses (Goto & Lindoso, 2010).

A pentamidina, a anfotericina e o cetoconazol são alternativas quimioterápicas, entretanto, também são tóxicos, produzem diversos efeitos colaterais e são dispendiosas. Recentemente, têm surgido novas propostas de tratamento combinando dois compostos diferentes, o que tem aumentado a eficácia (Seifert, 2011).

Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos no tratamento das leishmanioses desde a década de 40 do século passado e ainda são utilizados como drogas de primeira escolha, a despeito de seus diversos efeitos colaterais. As suas duas formulações, antimoniato de meglumina (glucantime) e estibogluconato de sódio (pentostan), são amplamente usados na clínica. Segundo Korolkovas (1988), os antimoniais pentavalentes tanto *in vivo* e *in vitro* (Frézard e cols., 2009), podem ser reduzidos à forma trivalente, a forma ativa do composto. Porém seu mecanismo de ação permanece pouco compreendido. Alguns dados sugerem o comprometimento do potencial redox de membrana da *Leishmania sp* (Willie e cols. 2004) e inibição da atividade da vias glicolítica e de β -oxidação de ácidos graxos em amastigotas (Croft e cols., 2006). Seus efeitos

colaterais incluem náuseas, vômitos, diarreia, flebite, convulsões, alterações cardiológicas e renais, entre outros (Korolkovas, 1999; Carvalho e cols. 2000). A hepatotoxicidade é um dos mais sérios efeitos colaterais deste tratamento, demonstrada pelo aumento dos níveis de transaminases hepáticas no plasma (Rodrigues,1999).

A pentamidina é uma diamidina aromática geralmente utilizada quando o tratamento com os antimoniais não surte efeito, entretanto em alguns casos de LC causada por *L. guyanensis* é utilizada como primeira escolha (Minodier e cols., 2005). Esta é bastante eficaz no tratamento da LVA, porém seus diversos efeitos tóxicos, a colocam como uma segunda escolha (Gadelha e cols. 1990). A resistência a essa droga também tem apresentado alta porcentagem, principalmente na Índia, Quênia e China (Thakur e cols., 1995; Dietze e cols.; 1995). Nas Américas, há poucos estudos sobre o seu uso (Gontijo & Carvalho, 2003).

O mecanismo de ação anti-*Leishmania* da pentamidina ainda não é bem compreendido. Provalvemente envolve vários alvos, como biossíntese de poliaminas (Basselin e cols., 1997), alteração do potencial de membrana mitocondrial (Vercesi & Docampo, 1992) e mais recentemente foi mostrado que este composto interfere com a síntese de DNA da *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto, e promovendo a fragmentação da membrana da mitocôndria, matando o parasito (Tufon e cols. 2008).

Como efeitos colaterais da droga observa-se: dor de cabeça, sensação de queimação, enrijecimento do tórax, tontura, náusea, vômito e hipotensão. A hiperglicemia e a pancreatite podem ocorrer levando a diabetes (Costa e cols., 1995)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico derivado do *Streptomyces nodosus*, com atividade anti-*Leishmania* (McMillan 1960) e usada inicialmente para LM (Furtado, 1960). Hoje em dia é uma droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose (Korolkovas, 1988, 1999; Olliaro & Bryceson, 1993, Manandhar e col., 2008). Quatro formulações de drogas estão disponíveis: anfotericina B, anfotericina B lipossomal, anfotericina conjugada com colesterol e anfotericina em complexo lipídico. A anfotericina B age ligando-se aos esteróis da membrana celular do parasito, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares. Essa molécula

também se liga ao colesterol do hospedeiro, porém com menor afinidade (Croft & Yardley, 2002).

Esta droga apresenta efeitos colaterais como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, febre, anemia, convulsões, anorexia, vermelhidão, calafrios, diminuição da função renal tubular e glomerular (Korolkovas, 1999). Recentemente, tem se administrado uma formulação da anfotericina B encapsulada em lipossomas. Esta forma é bem menos tóxica e eficaz, porém muito dispendiosa (Robinson & Nahata, 1999).

A miltefosina é a primeira droga oral eficaz no tratamento da leishmaniose visceral (Sundar e cols., 1998). Inicialmente foi desenvolvida para o tratamento de neoplasias e sua atividade anti-*Leishmania* foi descoberta no início dos anos 80 (Croft e cols., 1987). O mecanismo de ação da miltefosina é pouco conhecido e envolve alterações no metabolismo de lipídios. Esta atua também junto ao sistema imunitário, ativando linfócitos T e macrófagos, aumentando a produção de radicais oxigenados e nitrogenados (Murray & Delph-Etienne, 2000).

Esta droga está em fase de triagem clínica na Índia para LV desde março de 2002, na Colômbia para LC desde 2005 (Croft e cols., 2006), e também no Brasil (Chrusciak-Talhari e cols., 2011, Morais-Teixeira e cols., 2011). Entretanto, a miltefosina tem apresentado efeitos teratogênicos, além de apresentar uma longa meia vida, o que pode levar ao desenvolvimento de resistência (Bryceson, 2001). Em experimentos *in vitro*, observou-se que pode ocorrer a seleção de cepas resistentes de promastigotas de *L. donovani* (Seifert e cols., 2003).

A paromomicina é um antibiotico aminoglicosídeo cuja atividade leishmanicida foi descoberta em 1960 e tem sido utilizada em triagem clínica para LC e LV (Sudar e cols., 2009) e para tratamento tópico em Israel (Davison e cols., 2009). Esta droga é usada também em combinação com outros compostos como glucantime a pentamidina, aumentando a eficácia destes (Thakur e cols 1995., Chung e cols., 1990). Em tratamento das leishmanioses no Novo Mundo esse composto mostrou eficácia similar ao Sb^V em tratamento parenteral para LCL (Kim e cols., 2009). Dados recentes indicam sua eficácia em tratamentos combinados com outros compostos (Kulshrestha e cols., 2011).

O mecanismo de ação desta droga, envolve a ligação com pequenas subunidades ribossomais, levando a uma leitura errônea do RNAm, afetando a

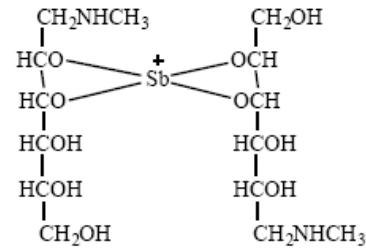
síntese de proteínas. Tal como a miltefosina pode induzir resistência em *L. donovani* experimentalmente *in vitro* (Maarouf e cols., 1998).

O cetoconazol é um agente antifúngico da classe dos azóis, que tem sido testado para leishmaniose (Rashid e cols., 1994). Este possui em sua estrutura o anel imidazol, análogo ao pirazol, que atua inibindo a enzima 14- α desmetilase, impedindo a produção do ergosterol (Navin e cols., 1992; Croft & Coombs, 2003), uns dos principais lipídeos de membrana protozoários e de fungos. Entretanto, a *Leishmania* possui a capacidade de captar moléculas de colesterol do organismo hospedeiro, reestabilizando a membrana e conseqüentemente tornando ineficaz o tratamento (Balaña-Fouce e cols. 1998).

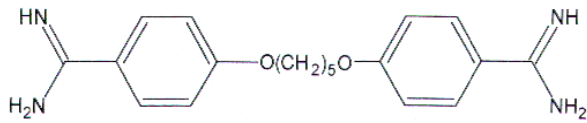
Estudos têm demonstrado uma maior atividade *in vitro* dos compostos da classe dos azóis sobre formas promastigotas de *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, quando comparados com as formas de *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica* e *L. mexicana* (Beach e cols., 1988). O cetoconazol foi considerado eficiente no tratamento de pacientes com LC infectados com *L. panamensis* (Saenz e cols., 1990), *L. major* (Salmanpour e cols. 2001) e *L. mexicana*, embora não apresente efeito satisfatório em infecção por *L. braziliensis* (Navin e cols., 1992). Outro fator que limita a utilização do cetoconazol são seus efeitos colaterais como hepatotoxicidade e distúrbios hormonais (Vidal-Puig e cols., 1994).

Quadro 1 – Estrutura química de compostos usados na quimioterapia anti leishmaniose.

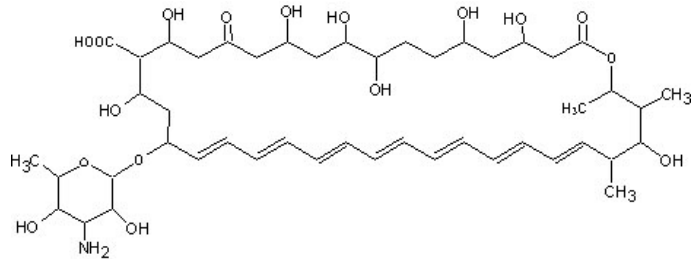
Antimoniato de meglumina



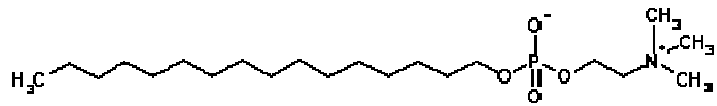
Pentamidina



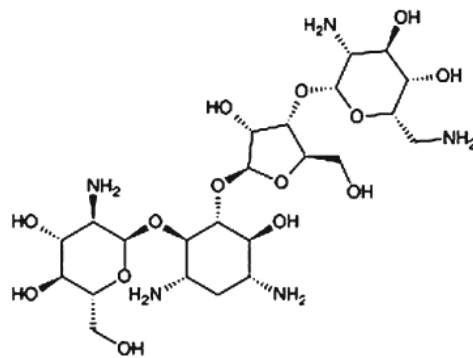
Anfotericina B



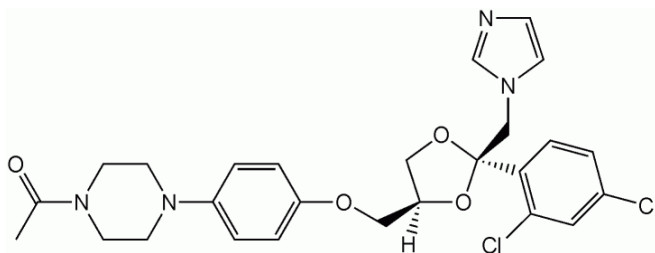
Miltefosina



Paramomicina



Cetoconazol.



1.8 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS PARA A LEISHMANIOSE

Introduzidos há décadas, os antimoniais permanecem como drogas de primeira escolha. Entretanto, novas propostas terapêuticas vêm surgindo e têm sido registrados para o uso em alguns países ou estão em fase de triagem clínica (Croft e cols. 2006, Seifert, 2011).

As drogas que hoje estão em fase de triagem clínica (quadro 1) para LV são: a mitelfosina (fase IV, registrada na Índia), a paromomicina (fase III) e a sitamaquine (fase II), que é uma aminoquinolina, desenvolvida pela Glaxo Smith Kline, em uso no Brasil, Kênia e Índia. Para o tratamento da LC, estão na fase de triagem clínica: a mitelfosina (fase III e registrada na Colômbia), paramomicina (fase II), Imiquimod, um antiviral com propriedades imunomoduladoras (fase II), e azóis (Croft & Yardley, 2002; Croft e Coombs, 2003).

Há um grande número de estudos em torno de produtos naturais, que podem ter propriedades anti-*Leishmania*. Parte desses estudos se concentram em extratos ou compostos derivados de plantas. A licochalcona A, produto da planta chinesa *Glycyrrhiza* tem mostrado considerável eficácia em modelo experimental, tanto para LC como para LV (Zhai e cols., 1999). As isopropilquinolinas isoladas de *Galipea longiflora* na Bolívia, também mostraram atividade em modelos de LC e LV (Fournet e cols., 1996). Outros produtos têm sido avaliados e testes *in vitro* e *in vivo*, quanto a sua atividade anti-*Leishmania*, tais como: a amarogentina na Índia, glicosídeo extraído da planta *Swertia chirata* (Medda e cols. 1999); o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* em Cuba (Monzote, 2006), o extrato etanólico de própolis do Brasil e Bulgária (Machado e cols., 2007, e diversos produtos naturais marinhos (Tempone e cols., 2011). Alguns estudos, mostram substâncias extraídas de produtos naturais, que apresentaram efeito leishmanicida sendo modificadas para melhorar sua eficácia, como as chalconas extraídas da *Piper aduncum* (Torres-Santos e cols., 1999; Boeck e cols., 2006).

Diversos outros compostos vêm sendo testados no modelo murino com bons resultados. Os flavonóides mostraram bons resultados *in vitro* e *in vivo* para *L. donovani* (Tasdemir e cols. 2006). Em testes com *L. amazonensis*, flavonóides extraídos de *Kalanchoe pinnata*, mostraram importante atividade *in vitro* (Muzitano e cols.; 2006, Gomes e cols., 2009) e potencial atividade em leishmaniose cutânea humana (Torres-Santos e cols.; 2003). Em modelo murino, foi observada a eficácia da 8-bromoguanosina na infecção por *L. amazonensis* (Barão e Giorgio, 2003), e das quinolinas na infecção por *L. infantum* e *L. amazonensis* (Nakayama e cols., 2005).

Apesar de um grande número de estudos com o objetivo de definir uma droga com alta atividade e baixa toxicidade, os resultados encontrados até agora não são promissores, incentivando a continuação das pesquisas neste sentido.

1.9 ALVOS MOLECULARES EM ESTUDO

Alguns alvos moleculares têm sido identificados e mostram importância na pesquisa de novos fármacos. Esses alvos são moléculas biologicamente importantes ao parasito, que no hospedeiro são expressos de forma diferenciada ou são ausentes. Atendendo a esses íntens, podemos citar: a) microtúbulos do parasito, o composto trifluralin tem mostrado atividade, por romper estruturas do microtúbulo e inibir a proliferação de *Leishmania* sp. (Croft e Coombs, 2003); b) dihidrofolato redutase, enzima que participa do metabolismo de folatos e é diferente no hospedeiro. Porém muitos inibidores *in vitro*, não foram eficazes *in vivo* (Croft e Coombs, 2003); c) cisteína proteinases, enzimas que estão relacionadas com a multiplicação e virulência de algumas espécies do parasito (Coombs & Mottram, 1997), muitos compostos tem sido testados *in vitro* e mostram alguns resultados (Ponte-Sucre e cols., 2006; Croft e Coombs, 2003); d) tripanotiona redutase, enzima envolvida na sobrevivência do parasito, atuando como um sistema de detoxificação (Fairlamb e cols., 1985; Castro-Pinto e cols., 2007). Estudos mostraram que derivados dibenzazepinas e fenotiazinas são eficazes em inibir a tripanotiona redutase (Chan e cols., 1998), além e mono

amidinas aromáticas (Castro-Pinto e cols, 2004); e) proteína quinases específicas que atuam no estabelecimento da infecção e sobrevivência do parasito no macrófago (Wiese e cols., 2007).

1.10 AS ACIL- HIDRAZONAS PIRAZÓLICAS

O bioisosterismo é uma metodologia racional de se tentar a obtenção de novos fármacos, realizada pela modificação molecular de uma substância com estrutura química conhecida e ação biológica caracterizada, considerada substância protótipo e a partir daí sintetizar e avaliar novos compostos homólogos estruturais do fármaco modelo (Anexo 1). As acil-hidrazonas são uma classe de moléculas que vêm sendo estudadas com afinco devido às suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas, antiinflamatórias, anti-trombóticas, antitumoral e antiviral destes compostos (Barreiro e cols. 2002; Rostom e cols., 2003). Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas pro-inflamatórias como as ciclooxigenases (COX) e 5-lipoxigenase (5-LO) (Higgs & Vane, 1983).

O protótipo 1-(4-X-fenil)-N'-[(4-Y-fenil)metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazidas (Figura 10) foi planejado para verificação da atividade antiprotozoários, visando a simplificação dos fármacos em questão, mantendo subunidades estruturais, usando-se a hibridação molecular. Foi mantida a relação isostérica do anel pirazol e características estruturais dos modelos. As acil-hidrazonas pirazólicas são compostos heterocíclicos que apresentam um anel pirazol e um grupamento acilhidrazona. O anel pirazol análogo ao imidazol, que tem conhecida atividade na inibição de enzimas que atuam na síntese do ergosterol (Navin e cols., 1992).

Os compostos em estudo foram sintetizados pela técnica do bioisosterismo e reúnem moléculas com potencial atividade anti-tripanosomatídeos (Gomes, 2001, Bernardino e cols., 2006). Os compostos protótipos principais foram o cetoconazol, alopurinol, pentamidina e benzonidazol. O novo composto-protótipo pode ter sua eficácia otimizada por modificações moleculares subseqüentes,

planejadas de maneira a preservar ou aprimorar as propriedades farmacológicas identificadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Os trinta derivados 1-(4-X-fenil)-N'-[(4-Y-fenil) metileno]-1H-pirazol-4-carbohidrazidas inéditos, apresentam diferentes substituintes, designados como X e Y. A combinação destes substituintes, para X podem ser: OCH₃, NO₂ e Br, e para Y: OCH₃, OEt, H, Br, OH, Cl, N(CH₃)₂, CN, CH₃, F, SCH₃, NO₂, (Figura 11). A síntese dos trinta compostos e seus intermediários está descrita na literatura (Bernardino e cols. 2006).

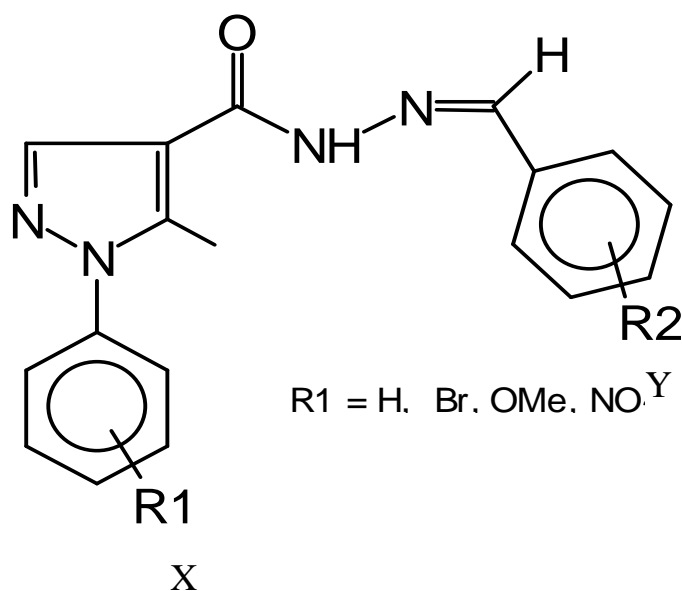


Figura 11 – Estrutura química das acil-hidrazonas pirazólicas, X e Y são radicais da molécula, variáveis de acordo com os substituintes acima, onde X pode ser: OCH₃, NO₂ e Br, e Y pode ser: OCH₃, OEt, H, Br, OH, Cl, N(CH₃)₂, CN, CH₃, F, SCH₃, NO₂.

Um composto que pudesse reunir características imunomoduladoras e atividade leishmanicida seria ideal para o tratamento dessa doença. As propriedades anti-inflamatórias, da classe das acil-hidrazonas pirazólicas (Barreiro e cols., 2002), seria mais um aspecto positivo na resolução da doença, pois esta é dependente de uma resposta direcionada do sistema imunitário. Um composto inibidor da síntese de prostaglandinas (PGs) poderia ajudar na resolução da doença, uma vez que esta molécula está relacionada com a resposta Th2 e estudos indicam a indução de PGs como mecanismo de escape do parasito (Guimarães e cols., 2005). Testes *in vitro* mostraram que esta classe de compostos apresenta atividade em promastigotas de *L. amazonensis* e com menor intensidade em *L. braziliensis* e *L. chagasi* (*L. infantum*) (Bernardino e cols., 2006). Os compostos com substituintes Br/NO₂ e NO₂/Cl não foram tóxicos aos macrófagos murinos e tiveram maior eficácia contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (Bernardino e cols., 2006).

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os compostos 1-(4-X-fenil)-N'-[(4-Y-fenil) metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazida *in vitro* e seus efeitos terapêutico, toxicológico e imunomodulatório no tratamento da leishmaniose experimental murina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito terapêutico e toxicológico dos derivados acilhidrazonas pirazólicas sobre a infecção experimental de camundongos CBA por *L. amazonensis*.
- Avaliar o efeito inibitório dos derivados 1-(4-X-fenil)-N'-[(4-Y-fenil) metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazida e seus precursores nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.
- Observar os efeitos do tratamento oral pelos derivados 1-(4-X-fenil)-N'-[(4-Y-fenil) metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazida, avaliando o status de cura por parâmetros histológicos e imunológicos.

DOCUMENTOS

DOCUMENTO 1

Documento 1

Nesta primeira parte do estudo os compostos recém-sintetizados com atividade leishmanicida *in vitro*, foram avaliados quanto a sua eficácia terapêutica e sua toxicidade frente a leishmaniose murina. Os derivados pirazol carbohidrazida com substituintes $X = \text{Br} / Y = \text{NO}_2$ e $X = \text{NO}_2 / Y = \text{Cl}$ foram investigados no modelo murino de infecção de leishmaniose cutânea. Animais foram infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados por via oral, duas semanas após a infecção parasitária com os derivados carbohidrazidas pirazólicas por 45 dias. A evolução das lesões cutâneas e a disseminação de parasitas para os linfonodos de drenagem foram observadas. A produção de óxido nítrico foi observada em sobrenadantes de células de linfonodo de camundongos infectados CBA que foram tratados com estes compostos. Os tratamentos com os derivados carboidrazidas pirazólicas não apresentaram qualquer toxicidade ou causam alterações no peso corporal e nas concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, e nos níveis urinários de creatinina, mas promoveram uma pequena diminuição dos neutrófilos do sangue periférico. Estes resultados proporcionaram novas perspectivas sobre o desenvolvimento de fármacos com atividades contra a leishmaniose. E estimularam a continuidade dos estudos para a observação do mecanismo de ação e efeitos sobre o organismo hospedeiro. Estes dados foram publicados em 2009 - "Charret KS et al. 2009. Effect of oral treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives against murine infection by *Leishmania amazonensis*. AmJ Trop Med Hyg. 80:568-573 "

Effect of Oral Treatment with Pyrazole Carbohydrazide Derivatives against Murine Infection by *Leishmania amazonensis*

Karen S. Charret, Raquel F. Rodrigues, Alice M. R. Bernardino, Adriana O. Gomes, Adriana V. Carvalho, Marilene M. Canto-Cavalheiro, Leonor Leon, and Veronica F. Amaral*

Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Niterói, Brazil; Instituto de Biologia, Departamento de Imunobiologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil

Abstract. Newly synthesized pyrazole carbohydrazide derivatives with substituents X = Br/Y = NO₂ and X = NO₂/Y = Cl were independently investigated in the CBA mouse model of cutaneous leishmaniasis. Animals were infected with *Leishmania amazonensis* and treated two weeks after the parasitic infection with the pyrazole carbohydrazides for 45 days. Oral treatment with both compounds controlled evolution of footpad cutaneous lesions and dissemination of parasites to draining lymph nodes. Nitric oxide generation was observed in supernatants of lymph node cells from infected CBA mice that were treated with these compounds. The pyrazole carbohydrazide derivatives did not show any toxicity or cause alterations in body weight, plasma concentrations of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, and urinary creatinine levels, but promoted a small decrease in blood neutrophils. These results provide new perspectives on the development of drugs with activities against leishmaniasis.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an important parasitic disease that affects approximately two million persons per year, with approximately 350 million persons at risk of infection.¹ It is caused by protozoans of the genus *Leishmania* and the bite of phlebotomine sand flies. In Brazil, *Leishmania amazonensis* is responsible for most cases reported, which include cutaneous, mucosal, diffuse cutaneous, and visceral leishmaniasis, and is considered a species of epidemiologic importance.^{2–4}

Since 1960, chemotherapy for leishmaniasis has relied on administration of pentavalent antimonials compounds such as sodium stibogluconate (Pentostam; Glaxo Wellcome; Brentford, United Kingdom) and meglumine antimoniate (Glucantime; Aventis, Paris, France) as first-line agents.^{5,6} However, these compounds show serious toxic effects and resistance to these drugs is increasing. Amphotericin B, pentamidine, and nonparenteral miltefosine are alternative chemotherapy that has been introduced in recent decades. However, these drugs also show complications such as side effects and high costs.^{7,8} Thus, there is an urgency for development of affordable and less-toxic alternative drugs. Development of a single drug or formulation for the treatment of several clinical forms of leishmaniasis must address the issue that each infection imposes different pharmacokinetic requirements for the drugs to be used. Other aspects, such as variation in sensitivity of different *Leishmania* species and increased resistance of parasites to drugs, must also be considered.⁹ Successful treatment depends on compounds with activity against *Leishmania* species and an immunomodulatory effect.

Pyrazole carbohydrazides are compounds with anti-inflammatory, analgesic, and anti-thrombotic effects¹⁰ and anti-viral and anti-tumor activities.¹¹ We have previously demonstrated the anti-*Leishmania in vitro* activity of 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazide derivatives.¹²

In the present study, we evaluated pyrazolic carbohydrazide (Figure 1) compounds with X = Br/Y = NO₂ (compound 1) and X = NO₂/Y = Cl (compound 2) substituents in experimental infection of CBA mice with *Leishmania amazonensis* and assessed drug effectiveness by lesion size and parasite burden. We also analyzed toxic effects in infected and non-infected CBA mice by body weight, leukocyte counts, and levels of aminotransferases and creatinine. Nitric oxide production by these compounds was also investigated in draining lymph nodes and spleen cells for an association with disease evolution.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77LTB 0016 strain) was maintained by animal passage and cryopreserved in liquid nitrogen. Promastigotes were cultured in Schneider's *Drosophila* medium, pH 7.2 (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. Characterization of strains was made by using molecular techniques such as isoenzyme electrophoresis.¹³

Animals. Mice (males, eight weeks of age) were acquired from the Nucleus for Laboratory Animals—Universidade Federal Fluminense and the Center for Biological Evaluation and Care of Research Animals—FIOCRUZ. Each experimental group contained eight animals. Experiments were conducted using a protocol (P0020-00) reviewed and approved by the Institutional Committee of CEUA/FIOCRUZ.

Chemicals. The 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides with substituents X = Br/Y = NO₂ and X = NO₂/Y = Cl were synthesized by using a molecular hybridization approach. Structures (Figure 1) of these stable crystalline compounds were characterized by standard methods (infrared spectroscopy, ¹H analysis, ¹³C-nuclear magnetic resonance).¹² Ketoconazole (Galena Química e Farmacêutica Ltda, Campinas, SP, Brazil) was used as a reference drug.

Evaluation of *in vivo* activity. Mice were inoculated in the left hind footpad with 1 × 10⁶ promastigotes of *L. amazonensis*. Animals were treated orally with pyrazole carbohydrazide

* Address correspondence to Veronica F. Amaral, Instituto Biologia, Departamento de Imunobiologia, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil. E-mail: vfa@vm.uff.br

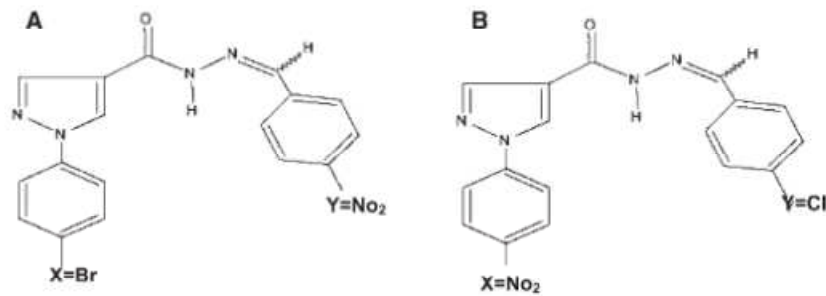


FIGURE 1. Chemical structure of A, 1 and B, 2 pyrazole carbohydrazide derivatives.

compounds (1.7 mg/kg/day for Br- NO_2 and 1.5 mg/kg/day for NO_2 -Cl) and ketoconazole (50 mg/kg/day) from the second week after infection continuously up to 45 days after infection. Lesion thickness was evaluated weekly by measuring diameters of both rear feet with a direct-reading dial caliper (Mitutoyo, Yokohama, Japan). Size of lesions in millimeters was calculated by subtracting the measurement of the uninfected foot from that of the infected foot.

Parasite quantification. Number of parasites in lymph nodes was estimated by a modified limiting-dilution assay.¹⁴ Popliteal lymph nodes of infected footpads were removed and used to prepare a cell suspension in phosphate-buffered saline. After centrifugation of the suspension at 1,500 rpm for 10 minutes, the pellet was resuspended in Schneider's *Drosophila* medium, pH 7.2. The suspension was then serially diluted in eight-fold dilutions, incubated at 26°C for 7 days, and monitored in an inverted microscope for presence or absence of promastigotes. Analyses were by using the L-calc shortcut program (StemSoft Software, Inc., Vancouver, British Columbia, Canada).

Toxicologic study. Body weight, leukocyte counts, and levels of aminotransferases and creatinine were monitored in infected and non-infected and treated and non-treated groups. The treatment schedule for the non-infected groups was the same as that for the infected groups. To assay body weight, mice were weighed during and at the end of the experiment to compare the treated and non-treated mice. To assay aminotransferase levels, blood was drawn from the tail vein during and at the end of treatment. Plasma concentration of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) was detected by using a commercial assay (LabTest; Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). To assay creatinine levels, urine was collected from mice during and at the end of treatment and tested by using a commercial assay (LabTest). To measure leukocyte counts, total blood leukocytes were counted in a hemocytometer after addition of Turk's solution at a dilution of 1:50, and specific populations of leukocytes were identified by optical microscopy after samples were stained with May-Grunwald reagent.

Nitric oxide dosage. Cells were obtained from spleen or popliteal lymph nodes of infected and non-infected mice and cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) without stimulation for 48 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . The culture supernatant was analyzed for nitric oxide by using a Griess reaction on a 96-well plate and read at 510 nm in a spectrophotometer.¹⁵

Statistical analysis. Data were analyzed by the Student's *t*-test. *P* values ≤ 0.05 were considered significant. The InStat program (Graph Pad Software, San Diego, CA) was used for these tests. All experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Therapeutic effects of pyrazole carbohydrazide derivatives on a murine model of infection by *L. amazonensis*. In preliminary studies, leishmanicidal activity and cytotoxicity screening tests were used *in vitro* assays with pyrazole carbohydrazide derivatives. Compounds 1 (X = Br, Y = NO_2) and 2 (X = NO_2 , Y = Cl) showed better leishmanicidal activity, as demonstrated by mild toxicity in mammalian cells. This study confirmed the marked leishmanicidal activity of new pyrazole carbohydrazides on *L. amazonensis*.¹² Thus, these derivatives were selected for chemotherapeutic experiments in the murine model of leishmaniasis.

The CBA mice were subcutaneously infected with 1×10^6 *L. amazonensis* promastigotes and orally treated with the compounds 1 and 2 (Figure 1) two weeks after of infection for 45 days continuously. All animals had skin lesions of an erythematous papular nature by the fifth week after infection. Treated animals showed a significant reduction in the size of skin lesions ($P \leq 0.05$) during the sixth and 23rd weeks post-infection (Figure 2). Results with these new compounds were similar to those with ketoconazole. Although cutaneous lesions in treated animals were smaller than those in untreated animals, the presence of edema and erythema indicated establishment of an inflammatory process with reduced severity of lesions. None of the lesions healed completely.

To better understand the effects of compounds 1 and 2 on the spread of the parasite in the host, we analyzed parasite burden in the spleen and lymph nodes of infected animals. These compounds reduced approximately 98% of the parasite burden from popliteal lymph nodes. The reference drug ketoconazole eliminated 99% of the parasites. Thus, at the 16th week post-infection, treatment with pyrazole carbohydrazides showed a significant decrease in parasite burden compared with the untreated control ($P \leq 0.05$) (Figure 3). At 16th week post-infection, parasites were not isolated from spleens of all groups of animals. Additionally, weights of the lymph node and spleen measured at the 16th week post-infection showed weights comparable to those in non-treated infected mice.

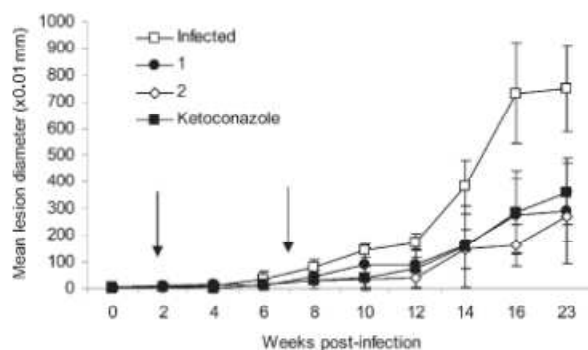


FIGURE 2. Mean lesion diameter of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77LTB0016) and treated with pyrazole carbohydrazide derivatives 1 and 2, ketoconazole as a control, or not treated. Treatment (arrows) started at the second week post-infection and continued up to 45 days post-infection ($n = 8$ per group).

Toxicologic effects of pyrazole carbohydrazide derivatives in the murine model. During the treatment period with the two pyrazole carbohydrazide derivatives, we conducted a toxicologic evaluation of healthy animals and those infected with *L. amazonensis*. Body weight was used as an indicator of systemic toxicity. Compounds 1 or 2 did not show an effect on body weight in infected and uninfected animals (Table 1). Possible alterations of renal and hepatic functions in healthy animals or those infected with *L. amazonensis* and treated with these compounds were detected by analysis of urine creatinine and hepatic aminotransferase levels. No significant increase in plasma ALT and AST levels was observed in non-infected and infected mice (Table 1) after 42 days of treatment compared with the levels in healthy animals that did not receive treatment. When compared with control animals, non-infected animals and those infected with *L. amazonensis* did not show any changes in urine creatinine levels 14 and 42 days after treatment (Table 1).

Potential hematologic changes were also used as a measure of toxicity. During the period of infection with *L. amazonensis*, there was a moderate variation in the leukocyte count of total peripheral blood. Mice treated with the compound 1 showed a slight decrease in total number of leukocytes during the second week of treatment. However, there was no significant change in leukocyte counts in treated animals relative

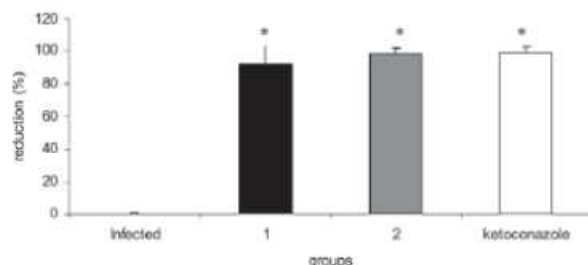


FIGURE 3. Reduction of parasite burden 16 weeks post-infection with *Leishmania amazonensis* in popliteal lymph nodes of mice orally treated with pyrazole carbohydrazide derivatives up to 45 days post-infection compared with untreated mice ($n = 8$ per group). Significance levels comparing treatment compounds and infected mice are indicated. * $P \leq 0.05$.

to those in untreated animals in the absence of infection. At the end of treatment with both compounds, we observed a decrease in neutrophils in mice infected with *L. amazonensis* compared with infected animals that were not treated (Figure 4).

Effect of pyrazole carbohydrazide derivatives on production of nitric oxide. Compounds 1 and 2 were further examined for their effects on generation of nitric oxide by spleen and lymph node cells of non-infected mice after 42 days of treatment. Administration of compound 1 clearly increased production of nitric oxide 24 hours after cell culture in lymph node cells, but not in spleen cells. In addition, treatment with compound 2 did affect production of nitric oxide 24 hours after cell culture in lymph node cells or spleen cells. There was no significant difference in production of nitric oxide after 48 hours of lymph node and spleen cell culture of cells from mice treated with both compounds. Treatment with compounds 1 or 2 induced production of nitric oxide 48 hours after cell culture in lymph node cells, but not in spleen cells, from animals at 16 weeks post-infection (Figure 5).

DISCUSSION

Our data highlight new insights for therapy of murine experimental cutaneous leishmaniasis and make use of oral administration of two independent pyrazole carbohydrazides derivatives. Results verify their capacity to control cutaneous lesion evolution in CBA mice infected with *L. amazonensis*.

In an earlier report,¹² we evaluated the *in vitro* leishmanicidal activity and cytotoxic effect of these compounds. This study showed that these compounds had strong activities against promastigotes of *L. amazonensis* and lower activities against those of *L. braziliensis* and *L. chagasi*. Additionally, the *in vitro* assay with murine peritoneal macrophage showed a low cytotoxic effect of these compounds. When compared with reference drugs such as pentamidine or ketoconazole, *in vitro* results showed that these reference drugs were more toxic to cells than pyrazole carbohydrazide derivatives.

In this study, CBA mice infected with *L. amazonensis* and orally treated with pyrazole carbohydrazide derivatives (Figure 1) controlled development of skin lesions. The CBA mice were chosen because they are susceptible to infection with *L. amazonensis* and develop cutaneous lesions, but do not show metastasis, as do BALB/c mice.^{16,17} The dose used in this experiment was the same used in a previous anti-inflammatory assay with acylhydrazone compounds.¹⁸ In our study, treatment with these compounds was started in the second week after *L. amazonensis* infection and continued for 45 days without interruption. Effects of treatment on progression of skin injury were observed between the sixth and 23rd weeks after infection (Figure 2). The dosing scheme of compounds used in this investigation was lower than that used with ketoconazole. Thus, it may be possible to increase the dose of pyrazole carbohydrazides to induce a better therapeutic effect without risks to the animals because these compounds showed less cytotoxicity¹² when tested in murine macrophages.

A key goal in pharmaceutical development is a good understanding of *in vitro* and *in vivo* performance. In a previous *in vitro* report,¹² positions of substituents on compound 1

TABLE 1

Effect of treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives 1 and 2 for 45 days in CBA mice (n = 8 per group) infected with *Leishmania amazonensis**

Mouse group	AST (U/mL)	ALT (U/mL)	Creatinine (mg/dL)	Body weight (g)	Leukocytes, $\times 10^9/\mu\text{L}$
Infected					
Control	145 \pm 26	100 \pm 11	3.2 \pm 0.8	25.2 \pm 2.1	9.3 \pm 2.02
Compound 1	100 \pm 24	145 \pm 42	2.58 \pm 0.55	25.2 \pm 1.5	12.5 \pm 2.3
Compound 2	133 \pm 32	80 \pm 36	2.86 \pm 0.6	25.9 \pm 0.7	10.5 \pm 1.6
Non-infected					
Control	105 \pm 30	114 \pm 16	3.4 \pm 0.9	25.58 \pm 2	ND
Compound 1	110.5 \pm 21	82 \pm 10	2.7 \pm 1.4	26.6 \pm 2.8	ND
Compound 2	106.66 \pm 24	78 \pm 46	3.4 \pm 0.5	27 \pm 1.8	ND

* All values correspond to the 42nd day of treatment. AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; ND = not determined.

(Figure 1) showed that X = Br, Y = NO₂ was more leishmanicidal than that observed for molecule 2 (X = NO₂, Y = Cl). However, in our *in vivo* experiment with the new pyrazole carbohydrazides, compounds 1 and 2 showed similar inhibition of the progression of cutaneous lesions in CBA mice infected with *L. amazonensis*. Thus, in the *in vivo* system, it appeared that different positions of substituents on molecules 1 or 2 did not interfere with therapeutic effectiveness.

Currently, the recommended drugs for the treatment of leishmaniasis are administered parenterally, which complicates their use. Solubilization of pyrazole carbohydrazides is a prerequisite for drug absorption and *in vivo* effectiveness. Oral treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives showed apparently good absorption in the gastrointestinal tract because these compounds effected the evolution of lesions. Recently, miltefosine, an orally used drug that has shown parasite resistance and teratogenicity,¹⁹ has been used for treatment of cutaneous^{9,20} and visceral leishmaniasis.²¹ Moreover, ketoconazole has been used as an alternative oral treatment for cutaneous leishmaniasis, and has shown effectiveness comparable to that of pentavalent antimonials.^{22,23} Ketoconazole treatment outcome could be influenced by *Leishmania* species.²⁴ Azoles can inhibit a key enzyme of sterol synthesis.²⁵ However, the mechanism of action of pyrazole carbohydrazide is not known.

Parasite burden was investigated in CBA mice infected and treated with these compounds. In draining lymph nodes, parasite burden showed a consistent decrease in both groups of

treated mice. Oral administration of compounds 1 and 2 was effective in reducing the number of parasites (98%). Both compounds were as effective as ketoconazole in reducing parasite burden. In draining lymph nodes (Figure 3), parasite burden was significantly higher in non-treated mice 16 weeks post-infection. Furthermore, BALB/c mice treated with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin E₂ synthesis, developed smaller cutaneous lesions and lower parasitic burdens compared with the control group.²⁶ However, other studies showed that footpad thickness does not always reflect parasite burden and may be influenced by leukocyte infiltration at the infection site.^{27,28} The anti-inflammatory effects on evolution of skin lesions and anti-*Leishmania* activity of pyrazole carbohydrazide derivatives should be investigated.

CBA mice infected with *L. amazonensis* had an increase in levels of neutrophils in peripheral blood, which was not observed when animals were infected and treated with pyrazole carbohydrazide derivatives. Levels in treated animals were similar to those in healthy animals. Studies with pyrazole carbohydrazide derivatives have shown several biological activities for these compounds.^{29,30} Some of these pharmacologic properties may be caused by the hydrazone group in this molecule, which determines analgesic, anti-inflammatory, and anti-thrombotic activities.^{10,31,32} Moreover, pyrazole carbohydrazide derivatives also have the pyrazole group and show a variety of pharmacologic properties. In experimental studies, the pyrazoles have shown antimicrobial,^{33,34} antiviral,³⁵ and antitumor activities.^{36,37} The pyrazole ring present in some

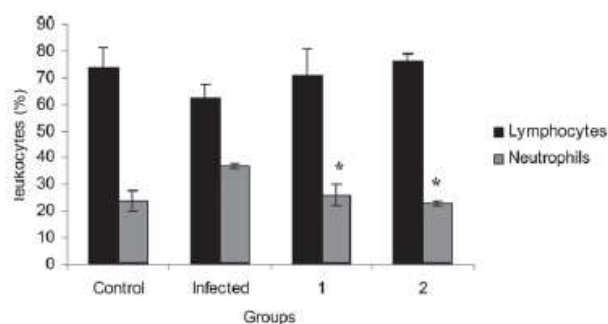


FIGURE 4. Percentage of specific blood leukocyte populations from CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* and treated with pyrazole carbohydrazides for 45 days. All data correspond to the 42nd day of treatment (n = 8 per group). Cells were counted in by microscopy (1,000 \times) after staining with May-Grünwald reagent. Significance levels comparing treatment compounds and infected mice are indicated. * $P \leq 0.05$.

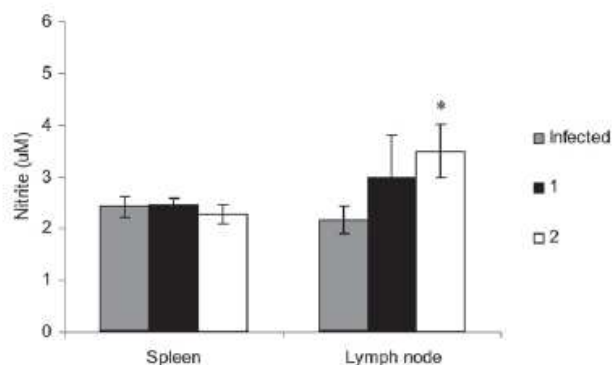


FIGURE 5. Nitric oxide production in mice 16 weeks post-infection with *Leishmania amazonensis* and treated with pyrazole carbohydrazide derivatives. Nitric oxide was measured in supernatants from unstimulated lymph node cells after culture for 48 hours (n = 8 per group). Significance levels comparing treatment compounds and infected mice are indicated. * $P \leq 0.05$.

anti-inflammatory drugs could be responsible for selective inhibition of the cyclooxygenase 2.³⁸

The proposed mechanism of action for the biological effects of pyrazole carbohydrazide derivatives may be inhibition of the enzyme 5-lipoxygenase.^{10,31} This enzyme is involved in the arachidonic acid pathway that induces leukotrienes formation. Leukotrienes have several functions, including chemotaxis for neutrophils.^{39,40} Therefore, in this study, the decrease in neutrophils in peripheral blood of treated animals may be caused by inhibition of 5-lipoxygenase.

During evaluation of new synthetic compounds against experimental leishmaniasis in the murine model, it is necessary to evaluate possible toxic effects. These data will enable study and application of the new drugs in the future. The obvious question was to evaluate toxicity in treated animals. This evaluation was performed by assessing body weight, leukocyte counts, hepatic enzymes, and urine creatinine. Systemic toxicity is defined as a reduction in body weight in experimental animals.⁴¹ In addition to reduction of body weight, systemic toxicity could be manifested through alterations of organ weights. In the present study, there was no alteration in body weights and spleen weights. The effect of the test compounds on leukocyte counts, hepatic enzymes, and urine creatinine was assessed by blood and serum analysis. No alterations in levels of ALT and AST were found. These enzymes have been extensively used as markers for toxicologic study of hepatic functions.⁴²

Production of nitric oxide by macrophages is essential for controlling growth of *L. major*⁴³ or *L. amazonensis*.⁴⁴ In treated animals, production of nitric oxide was induced by compound 1 when measured 24 hours after culture of unstimulated lymph node cells. However, when treated animals were infected with *L. amazonensis*, compounds 1 and 2 induced production of nitric oxide in the lymph node cell culture when measured after 48 hours (Figure 5). This result may be an important factor in controlling infection. In the present study, cells from CBA mice treated with pyrazole carbohydrazide derivatives and infected with *L. amazonensis* produced more nitric oxide than did cells from untreated susceptible mice.

Conflicting studies have reported a correlation of the capacity of CBA mice infected with *L. amazonensis* to induce production of nitric oxide with resistance¹⁷ or susceptibility⁴⁵ to *L. amazonensis*. Additionally, when nitric oxide was used as an inhibitor of nitric oxide synthase in *L. major*-infected mice, a considerable increase in parasite burden and development of larger skin lesions was observed,^{45,46} which corroborated the importance of this mechanism in regulating parasite growth *in vivo*.

Treatment of CBA mice infected with *L. amazonensis* with pyrazole carbohydrazide derivatives controlled progression of cutaneous lesions and dissemination of parasite in draining lymph nodes. No toxicity was observed (no variations in AST, ALT, creatinine, or body weight) in treated mice. Thus, the therapeutic effect of these compounds may be comparable with that of ketoconazole. Another feature observed was the capacity to decrease the number of neutrophils in both groups treated with compounds than in infected controls. It has often been suggested that these compounds, in addition to showing leishmanicidal activity reflected in reductions in parasitic burden, may also control evolution of the inflammatory process.

In conclusion, further experiments on dosage optimization and mechanism of action will be carried out. These experiments will involve possible anti-inflammatory effects and anti-*Leishmania* activity to determine an adequate dosing regimen for therapeutic use.

Received July 21, 2008. Accepted for publication September 16, 2008.

Financial support: This work is supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FIOCRUZ, Universidade Federal Fluminense, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, and fellowships from CAPES, Brazil.

Authors' addresses: Karen S. Charret, Raquel F. Rodrigues, Marilene M. Canto-Cavalheiro, and Leonor Leon, Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4.365 pav. 26 sl. 405, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Alice M. R. Bernardino and Adriana O. Gomes, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil. Adriana V. Carvalho and Veronica F. Amaral, Instituto Biologia, Departamento de Imunobiologia, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil.

REFERENCES

- Desjeux P, 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, Johnson Jr WD, 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546.
- Leon LL, Barral A, Machado GMC, Grimaldi G Jr, 1992. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationships with distinct clinical forms of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 229-234.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valet-Rosalino CM, Mendonça SC, 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 735-737.
- Herwaldt BL, Berman JD, 1992. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 46: 296-306.
- Croft SL, Coombs GH, 2003. Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502-508.
- Sundar S, 2001. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190: 89-92.
- Croft SL, Vivas L, Brooker S, 2003. Recent advances in research and control of malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and schistosomiasis. *East Mediterr Health J* 9: 518-533.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, 2006. Drug resistance in and leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111-126.
- Barreiro EJ, Fraga CA, Miranda Rodrigues AL, 2002. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Quim Nova* 25: 129-148.
- Rostom SA, Shalaby MA, El-Demellawy MA, 2003. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HCV agents. *Eur J Med Chem* 38: 959-974.

12. Bernardino AM, Gomes AO, Charret KS, Freitas AC, Machado GM, Canto-Cavalheiro MM, Leon LL, Amaral VF, 2006. Synthesis and leishmanicidal activities of 1-(4-X-phenyl)-N'-(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides. *Eur J Med Chem* 41: 80–87.
13. Grimaldi G Jr, David JR, McMahon-Pratt D, 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies, 1987. *Am J Trop Med Hyg* 36: 270–287. Erratum in *Am J Trop Med Hyg* 37: 414.
14. Lima HC, Titus RG, 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64: 5442–5445.
15. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR, 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131–138.
16. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres De Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R, 1996. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2447–2451.
17. Alves CR, Benévolo de Andrade TC, Alves JL, Pirmez C, 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 26: 127–135.
18. Cunha AC, Figueiredo JM, Tributino JL, Miranda AL, Castro HC, Zingali RB, Fraga CA, de Souza MC, Ferreira VF, Barreiro EJ, 2003. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem* 11: 2051–2059.
19. Croft SL, Seifert K, Yardley V, 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 399–410.
20. Soto J, Berman J, 2006. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 34–40.
21. Sundar S, Murray HW, 2005. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ* 83: 394–395.
22. Saenz RE, Paz H, Berman JD, 1990. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* 89: 147–155.
23. Salmanpour R, Handjani F, Noughpishah MK, 2001. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dermatolog Treat* 12: 159–162.
24. Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajón JF, 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 165: 528–534.
25. Beach DH, Goad LJ, Holz GG Jr, 1988. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 31: 149–162.
26. Guimarães ET, Santos LA, Ribeiro dos Santos R, Teixeira MM, dos Santos WL, Soares MB, 2006. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect* 8: 1219–1226.
27. Oliveira MR, Alves TR, Pinto AC, Pereira Hde S, Leão-Ferreira LR, Moussatché N, de Frugulhetti IC, Ferreira VF, de Souza MC, 2004. Synthesis and antiviral activities of new pyrazolo[4,-c]quinolin-3-ones and their ribonucleoside derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 735–748.
28. Tavares D, da Conceição Ribeiro R, Carlos da Silva A, 2006. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microbes Infect* 8: 957–964.
29. Cunha AC, Figueiredo JM, Tributino JL, Miranda AL, Castro HC, Zingali RB, Fraga CA, de Souza MC, Ferreira VF, Barreiro EJ, 2003. Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem* 11: 2051–2059.
30. Lima LM, Frattani FS, dos Santos JL, Castro HC, Fraga CA, Zingali RB, Barreiro EJ, 2008. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *Eur J Med Chem* 43: 348–356.
31. Matheus ME, Oliveira LF, Freitas AC, Carvalho AM, Barreiro EJ, 1991. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. *Braz J Med Biol Res* 24: 1219–1222.
32. Fraga CA, Barreiro EJ, 2006. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, anti-inflammatory and antithrombotic drugs. *Curr Med Chem* 13: 167–198.
33. Kucukguzel SC, Kucukguzel I, Ulgen M, 2000. Metabolic and chemical studies on N-(4-chlorobenzyl)-N'-benzoylhydrazone. *Farmaco* 55: 624–630.
34. Genin MJ, Biles C, Keiser BJ, Poppe SM, Swaney SM, Tarpley WG, Yagi Y, Romero DL, 2000. Novel 1,5-diphenylpyrazole nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with enhanced activity versus the delavirdine-resistant P236L mutant: lead identification and SAR of 3-substituted derivatives. *J Med Chem* 43: 1034–1040.
35. Storer R, Ashton CJ, Baxter AD, Hann MM, Marr CL, Mason AM, Mo CL, Myers PL, Noble SA, Penn CR, Weir NG, Woods JM, Coe PL, 1999. The synthesis and antiviral activity of 4-fluoro-1-beta-D-ribofuranosyl-1H-pyrazole-3-carboxamide. *Nucleosides Nucleotides* 18: 203–216.
36. Daidone G, Maggio B, Plescia S, Raffa D, Schillaci D, Migliara O, Caruso A, Cutuli VM, Amico-Roxas M, 1998. Synthesis and pharmacological evaluation of 1-methyl-5-[substituted-4(3H)-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl]-1H-pyrazole-4-acetic acid derivatives. *Farmaco* 30: 350–356.
37. Gamage SA, Spicer JA, Rewcastle GW, Milton J, Sohal S, Dangerfield W, Mistry P, Vicker N, Charlton PA, Denny WA, 2002. Structure-activity relationships for pyrido-, imidazo-, pyrazolo-, pyrazino-, and pyrolophenazinecarboxamides as topoisomerase-targeted anticancer agents. *J Med Chem* 45: 740–743.
38. Palomer A, Cabre F, Pascual J, Campos J, Trujillo MA, Entrena A, Gallo MA, García L, Mauleón D, Espinosa A, 2002. Identification of novel cyclooxygenase-2 selective inhibitors using pharmacophore models. *J Med Chem* 45: 1402–1411.
39. Goetzl EJ, Pickett WC, 1980. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 125: 1789–1791.
40. Pettipher ER, Salter ED, Breslow R, Conklyn MJ, Farrell CA, Hingorani GP, Salter ED, Hackman BC, Wimberly DJ, 1993. Specific inhibition of leukotriene B4 (LTB4)-induced neutrophil emigration by 20-hydroxy LTB4: implications for the regulation of inflammatory responses. *Br J Pharmacol* 110: 423–427.
41. Black DL, Marks TA, 1992. Role of maternal toxicity in assessing developmental toxicity in animals: a discussion. *Regul Toxicol Pharmacol* 16: 189–202.
42. Bhattarjee R, Sil PC, 2006. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride-induced liver damage via its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol* 45: 817–826.
43. Liew FY, Li Y, Millott S, 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306–4310.
44. Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE, 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76: 669–675.
45. Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA, 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect* 2: 1807–1815.
46. Woods ML, Mayer J, Evans TG, Hibbs JB Jr, 1994. Antiparasitic effects of nitric oxide in an *in vitro* murine model of *Chlamydia trachomatis* infection and an *in vivo* murine model of *Leishmania major* infection. *Immunol Ser* 60: 179–195.

DOCUMENTO 2

Documento 2

Nesta etapa deste estudo, os compostos 1*H*-pirazol-4-carbohidrazidas que apresentaram atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* foram investigados quanto a sua ação nas formas amastigotas. Sabendo-se que uma síntese que necessite de menos etapas, se torna mais barata para a produção, foram analisados também os compostos intermediários (P1, P2 e P3) das carbohidrazidas pirazólicas, quanto a sua atividade leishmanicida. Foram analisadas as diferenças de atividade durante as formas de vida do parasito, que poderiam ajudar a elucidar os mecanismos de ação dos compostos. Os compostos precursores não foram ativos sobre as formas promastigotas. No entanto, todos os compostos foram ativos na forma amastigotas e não mostraram citotoxicidade em célula de mamíferos. As contribuições farmacofóricas do anel N-heteroaromático e do grupo hidrazina nos compostos intermediários para a atividade leishmanicida foram observadas. Todos os compostos testados provocaram o aumento da produção de NO em macrófagos estimulados ou não por LPS. Neste trabalho pode-se avaliar a contribuição de alguns grupamentos da molécula dos compostos na atividade leishmanicida, agregando conhecimento sobre os mesmos. Estes resultados foram submetidos ao European Journal of Medicinal Chemistry em 2011 – “Charret KS et al. Effectiveness of carbohydrazides precursor in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis*. European Journal of Medicinal Chemistry”.

Effectiveness of carbohydrazides precursor in *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes.

Karen S. Charret ^a, Raquel F. Rodrigues ^a, Alice M.R. Bernardino ^b, Adriana O. Gomes ^b, Gêrzia M Carvalho Machado ^a, Leonor L. Leon ^a, Veronica F. Amaral^c,
Marilene M. Canto-Cavalheiro

^a Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brazil

^b Dep. de Química Orgânica, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil

^c Dep. de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-150, Niterói, RJ, Brazil

Recently synthesised 1H-pyrazole-4-carbohydrazides presented *in vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities. Their synthesis requires fewer steps and thus makes it less costly to produce. In addition, the intermediary compounds (P1, P2 and P3) exhibited leishmanicidal activity. Activity differences during various stages of the parasite life should help to elucidate the compounds' mechanisms of action. The precursor compounds were not active on the promastigote forms. However, all of the compounds were active in amastigotes and without cytotoxicity to the host cell. Herein, the pharmacophoric contributions of the N-heteroaromatic ring and hydrazine groups in the intermediary compounds towards the leishmanicidal activity, which was observed only for the amastigote forms of the *L. amazonensis*, are presented. All of these compounds might have led to increased NO production in stimulated or not stimulated macrophages.

Keywords: 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides; Antileishmania activity; *Leishmania*, Nitric Oxide.

1 Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* that affects about 2 million people per year (1). Leishmaniasis reaches around 12 million people worldwide, and 350 million people live in areas at risk. Eighty-eight countries are affected by leishmaniasis; however, notification is mandatory in only 32 of these countries, resulting in an underestimation of the number of cases. Recently, the number of cases in European countries has increased because of co-infection with HIV (2,3,4), resulting in a serious health problem and difficulty in choosing the type of treatment (1,5). This disease has two main clinical forms, tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL), and is endemic in tropical and subtropical regions of the world (6).

The *Leishmania* parasite is a protozoan belonging to the family *Trypanosomatidae* and the order *Kinetoplastida*. This flagellated organism has two distinct forms during its life cycle: promastigotes, which are elongated, extracellular and found in the gut of the insect vector, and amastigotes, which are rounded with a rudimentary flagellum that occurs intracellularly in vertebrate host cells and mainly in the mononuclear phagocytic system. However, amastigote forms have been found in other cell types such as neutrophils, fibroblasts and dendritic cells (7,8,9). The differences between these two forms not only are morphological but also include important biochemical and molecular differences such as glucose catabolism, fatty acid β -oxidation (10,11,12), amino acid metabolism (13,14), nuclease and cysteine proteinase activities (15,16,17), purine metabolism (18), protein phosphorylation (19) and gene expression (20,21).

The difficulty in controlling parasitic diseases remains a serious problem. The absence of an alternative chemotherapeutic approach for treatment of *Leishmania* infection requires urgent attention. Presently, no vaccines are available, and chemotherapy is unsatisfactory and expensive (22). Pyrazole carbohydrazides are compounds with anti-inflammatory, analgesic, and anti-thrombotic effects (23) in addition to anti-viral and anti-tumour activities (24). We have previously demonstrated in vitro activity of several 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazide derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes (Figure 1) (25).

Due to the high cost of current chemotherapy, developing novel drugs that are effective and inexpensive is needed. Reducing the synthesis steps of a compound makes it less costly to produce. Furthermore, understanding differences in activity on the different stages of parasite life should help to elucidate the compounds' mechanisms of action.

2 Chemistry

We previously reported the synthesis of a new series of 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazide derivatives (25). The four-step synthetic route for the preparation of these compounds is outlined in Scheme 1. The final derivative and all of these intermediary compounds form stable structures, which have been fully characterised by commonly used methods (IR, ^1H -, ^{13}C -NMR) and were synthesised using a molecular hybridisation approach (25). Drugs containing acylhydrazone derivatives have shown important biological effects such as analgesic, antiplatelets and anti-inflammatory activities (24,25,26). The aza-vinylogous groups in the pyrazole carbohydrazide molecules possibly

function as hydrophobic anchors for active sites within protozoa (23,27). In addition, it could be useful to study the contribution of the phenyl groups in pyrazol-4-carbohydrazide compounds to its bioactivity profile. In order to confirm and better understand the antileishmanial activity, we conducted a complementary study in which the inhibitory effects of 1-(4-X-phenyl)-1*H*-pyrazole-4-carbohydrazides with X= Br (**P1**), X= NO₂ (**P2**), X= H (**P3**) as precursors of 1-(4-X-phenyl)- N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1*H*-pyrazole-4-carbohydrazide) against two distinct forms of *L. amazonensis*.

3 Pharmacology

Studies with pyrazole carbohydrazide derivatives have shown that they exhibit several biological activities. (28,29). Some of these pharmacologic properties may be associated with the hydrazone group, which has been shown to determine analgesic, anti-inflammatory, and anti-thrombotic activities (23,20,31). Moreover, pyrazole carbohydrazide derivatives also contain a pyrazole group and show a variety of pharmacologic properties, such as antimicrobial (32,33), antiviral (34), and antitumor activities (35,36). The pyrazole ring present in some anti-inflammatory drugs could be responsible for selective inhibition of cyclooxygenase 2 (37). The proposed mechanism of action for the biological effects of pyrazole carbohydrazide derivatives is the inhibition of the enzyme 5-lipoxygenase (23, 30), which is involved in the arachidonic acid pathway that induces leukotriene formation.

The N-acylhydrazone (NAH) moiety (RCONHN=CHR) has been used in the design of new bioactive compounds with distinct pharmacological profiles, such as anti-trypanosome activities. We previously reported the leishmanicidal

activity *in vitro* and in an experimental model of a new series 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazide of N-acylhydrazone compounds (NAHs) (25, 38).

3 Results and Discussion

The new series 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides (1–30 series) was prepared from the corresponding hydrazine intermediates (40-42 series) obtained by treating the 4-(4'-phenyl) pyrazolylchlorides with hydrazine hydrate following a previously described procedure, as shown in Fig. 1 (25). We previously investigated a series of pyrazole-4-carbohydrazides (1–30) for their inhibitory effects against extracellular promastigotes of *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. braziliensis* parasites and for their direct toxic effects on macrophage host cells (25). In addition, we also reported two pyrazole-4-carbohydrazide substituents, X=Br / Y=NO₂ (**FC1**) and X=NO₂ / Y=Cl (**FC2**) as good antileishmanial agents in an experimental murine model (38). These results reinforced the antileishmanial profile of substituted carbohydrazides (RCONHN=CHR) reported in the literature (25, 39). In order to investigate the possible pharmacophoric contribution of the imino group (-N=C-) in carbohydrazide moieties in our compounds, we selected the two most effective compounds (FC1 and FC2) and three of its intermediary precursors (P1, P2 and P3) and evaluated their *in vitro* activity against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis*.

We demonstrate that the precursors (P1, P2 and P3) with a hydrazine (-N=N-) subunit were inactive against the promastigote forms at concentrations up

to 320µg/mL (table 1). Furthermore, our results revealed that compounds FC1 and FC2, which have a basic imino ($R_2C=N-R$) subunit, were able to inhibit promastigote growth (table 1). Significant antileishmanial activity of these two carbohydrazide derivatives (FC1 and FC2) was observed on *Leishmania*-infected macrophages (fig 2). Significant and minor effects were observed with 160 µg/mL and 20-30 µg/mL, respectively, of the precursor compounds P1, P2 and P3 (fig 2a, 2b).

Although compounds FC1 and FC2 were able to inhibit promastigote growth, our data demonstrated that both types (with or without imino groups) can stimulate leishmanicidal activity in macrophages (fig 2a, 2b). In an earlier report, nitric oxide (NO) production by carbohydrazide derivatives (FC1 and FC2) was investigated in draining lymph nodes and spleen cells for an association with disease evolution. The cells from CBA mice treated with pyrazole carbohydrazide derivatives and infected with *L. amazonensis* produced more NO than the cells from untreated susceptible mice (38). However, this effect could be related to the presence of specific substituents on the ring or to the ability to release NO by itself (40). In addition, NO in macrophages was identified as a potent effector molecule against extracellular and intracellular *Leishmania* forms (41). However, *Leishmania* parasites were reported to survive despite exposure to toxic nitrosative oxidants during phagocytosis by the host cell (42). Herein, we demonstrated that the FC1 compound and all of the precursors (P1, P2 and P3) at 80 µg/mL significantly increased NO production in elicited macrophages without lipopolysaccharide (LPS) activation (fig. 3a). These findings were supported by elevated NO production in macrophages treated and previously stimulated by LPS (fig. 3b). It has been well established in murine models that increased

leishmanicidal activity in activated macrophages is correlated with increased NO production (41). Notably, the precursor compounds (P1, P2 and P3) were not effective against promastigote forms (table 1) but potentially reduced macrophage infection through induction of NO production (fig 2a). These results suggest that the intermediary compounds having a hydrazine subunit could modulate macrophage infection by indirect functions. Considering that no differences were observed in nitrite measurements of parasite cultures with and without precursors or final products (80 ug/mL) after 24 h incubation (data not shown), we suggest that these compounds are not a class of NO donors. However, NO production by macrophages alone does not fully explain the inhibitory effect of FC1. Therefore, the aza-vinylogous groups in the pyrazole carbohydrazide molecules possibly function as hydrophobic anchors for active sites within the protozoa (43).

Azol compounds, such as ketoconazole and benznidazole, have been suggested to interfere with ergosterol biosynthesis in protozoa and fungi (44). In the case of *L. amazonensis*, the mechanisms of action seem to be unrelated to the biosynthesis of ergosterol, because no change was observed in the concentration of ergosterol in the promastigote culture containing the studied compounds compared to that without treatment (unpublished data).

In conclusion, the data in this study confirmed the leishmanicidal activity of new 1*H*-pyrazole-4-carbohydrazides on both forms of *L. amazonensis*. The precursors did not present any effect against promastigotes but were active against intracellular amastigotes. The imino group present in the final products (FC1 and FC2) may be the principal contributor to the leishmanicidal activity. These compounds might induce an increase of NO release by macrophages, as they are unable to do it by themselves.

5 Experimental protocols

5.1 Parasites

L. amazonensis (MHOM/BR/77LTB0016 strain) was maintained by animal passage and cryopreserved in liquid nitrogen. Promastigotes were cultured in Schneider's *Drosophila* medium, pH 7.2 (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10–20% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum (FCS). The characterisation of this strain was performed by molecular techniques such as isoenzyme electrophoresis (45).

5.2 Animals

Mice acquired from Centro de Experimentação e Criação de Animais de Laboratório (CECAL-Fiocruz) were used to obtain peritoneal macrophages for both infection and isolation of *Leishmania*. The experiments were conducted using a protocol approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA /Fiocruz (P0020-00).

5.3 Chemicals

The 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides with substituents X=Br / Y=NO₂ (**FC1**); X=NO₂ / Y=Cl (**FC2**) and X= NO₂ / Y= Br (**FC3**) and their precursors with substituents X=Br (**P1**), X= NO₂ (**P2**) and X= H (**P3**) were synthesised with a molecular hybridisation approach. The structures of these stable and crystalline compounds were fully characterised by commonly used techniques (IR, ¹H-, ¹³C-NMR) (25).

5.4 Drug assay on promastigotes

The precursor drugs were tested in a concentration range of 40–320 µg/mL solubilised in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.), with the final concentration of the solvent in the experiments never exceeding 1.6%. They were added to a 96-well microplate and incubated at 26 °C for 24 h with parasites in their late log phase, containing a high amount of metacyclic forms and with a concentration of 4×10^6 cells/mL (46).

Counting of the remaining parasites in Neubauer's chamber was used to observe the drug effects. The percentage of inhibition was estimated by comparison with the control, and the results are expressed as $IC_{50}/24$ h, i.e., the concentration that caused a 50% reduction in survival/viability in comparison to identical cultures without the compounds. All tests were carried out in triplicate and ketoconazole and pentamidine were used as reference drugs.

5.5 Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of all compounds expressed as cell viability was assayed on peritoneal macrophages from mice. The cells were isolated from the peritoneal cavity of Balb/c mice with cold RPMI 1640 medium, supplemented with 1 mmol l⁻¹ l-glutamine, 1 mol l⁻¹ HEPES, penicillin G (105 IU l⁻¹) and streptomycin sulphate (0.10 g l⁻¹). The cells (2×10^5 cells per well) were cultivated on a microplate and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 2 h of incubation, the adherent cells were removed, and the adhered macrophages were washed twice with RPMI. Compounds were added to the cell culture at a concentration range of 40–320 µg/mL and incubated for 24 h. Then, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) was added, and the results were evaluated on a spectrophotometer (47).

5.6 Drug assay on intracellular amastigotes

Peritoneal macrophages from mice were cultured as described above using a Lab-Tek Chamber Slider System (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA). The mice were infected with *L. amazonensis* promastigotes in log phase with a parasite:macrophage rate of 4:1 and incubated overnight. Then, the cultures were washed twice, and the carbohydrazide derivatives were added with the substituents X=Br / Y=NO₂; X=NO₂ / Y=Cl and X= NO₂ / Y= Br and their precursors with substituents X=Br, X= NO₂ and X= H and then maintained under these conditions for 24 and 48 h. The chamber was stained with Panotico kit (Laborclin, Pinhais, PN, Brasil) and observed by optical microscopy. The percentage of inhibition was estimated by comparison with the control.

5.7 Nitric oxide dosage.

Mice peritoneal macrophages were cultured on 96-well plates with or without stimulation of 10 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) plus 1 ng/mL of IFN-γ for 2 hours and then treated with the carbohydrazide derivatives and its precursors at a concentration range of 10 to 80 µg/mL for 24 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Indometacin was used in the controls (Merck Sharp & Dohme, New Jersey, USA). Culture supernatants were analysed for nitric oxide by using a Griess reaction on a 96-well plate and read at 545 nm in a spectrophotometer (48).

5.8 Statistical analyses

Results are expressed as the arithmetic mean of triplicates and are accompanied by their respective standard deviations. Means of control and experimental groups were compared by Student's t-tests. Comparisons of multiple groups were performed by NOVA tests. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using Graph Pad InStat 2.0.

Acknowledgements

This work is supported by grants from CNPq, CAPES, FIOCRUZ, FAPERJ and fellowships from CAPES and CNPq Brazil.

6 References

- [1] P. Desjeux, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27 (2004) 305-18.
- [2] C. Agostoni, N. Dorigoni, A. Malfitano, L. Caggese, G. Marchetti, S. Corona, S. Gatti, M. Scaglia, *Infection* 26 (1998) 93–99.
- [3] **P. Marty, E. Rosenthal, *Expert Opin Pharmacother.* 3 (2002) 1101-8.**
- [4] I. Cruz, J. Nieto, J. Moreno, C. Cañavate, P. Desjeux, J. Alvar, *J Med Res* 123 (2006) 357-388.
- [5] J. Alvar, C. Canavete, B. Gutiérrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. López-Vélez, R. Molina, J. Moreno, *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (1997) 298–319.
- [6] R.W. Ashford, K.A. Kohestany, M.A. Karimzad, *Ann Trop Med Parasitol* 86 (1992) 361-71.

-
- [7] P.K.Chang, Am J Trop Med Hyg. 30 (1981) 334-9.
- [8] M.G. Ritting, C. Bogdan, Parasitol Today 16 (2000) 292-7.
- [9] H. Laufs, K. Müller, J. Fleischer, N. Reiling, N. Jahnke, J.C. Jensenius, W. Solbach, T. Laskay, Infect. Immun. 70 (2002) 826-35.
- [10] G.H. Coombs, J.A. Craft, D.T. Hart, Mol. Biochem. Parasitol. 5 (1982) 199-211.
- [11] J.C. Meade, T.A. Glaser, P.F. Bonventre, A.J. Mukkada, J. Protozool. 31 (1984) 156-61.
- [12] M.J. McConville, D. de Souza, E. Saunders, V.A. Likic, T. Naderer, Trends Parasitol. 23 (2007) 368–375.
- [13] M.V. Geraldo, A.M. Silber, C.A. Pereira, S.R. Uliana, FEMS Microbiol Lett 242 (2005) 275–280.
- [14] P. Shaked-Mishan, M. Suter-Grotemeyer, T. Yoel-Almagor, N. Holland, D. Zilberstein, D. Rentsch, Mol. Microbiol. 60 (2006) 30–38.
- [15] P.A. Bates, FEMS Microbiol Lett. 107 (1993) 53-8.
- [16] G.H. Coombs, J.C. Mottram. Parasitology 113 (1997) 61-80.**
- [17] S. Besteiro, R.A. Williams, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Int J Parasitol 37 (2007) 1063–1075.
- [18] H.F. Hassan, G.H. Coombs, Exp. Parasitol. 59 (1985) 139-50.
- [19] K.R. Dell, J.N. Engel, Mol. Biochem. Parasitol. 64 (1994) 283-92.

-
- [20] H. Charest, G. Matlashewski, *Mol Cell Biol.* 14 (1994) 2975-84.
- [21] S.D. Barr, L. Gedamu, *J. Biol. Chem.* 278: (2003) 10816–10823.
- [22] S.L. Croft, V. Yardley, *Cur. Pharmaceut. Des.* 8 (2002) 319–342.
- [23] E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, A.L.P.C.R. Miranda Rodrigues, *Quim. Nova* 25 (2002) 129–148.
- [24] S.A. Rostom, M.A. Shalaby, M.A. El-Demellaw, *Eur J Med Chem* 38 (2003) 959–974.
- [25] A.M. Bernardino, A.O. Gomes, K.S. Charret, A.C. Freitas, G.M. Machado, M.M. Canto-Cavalheiro, L.L. Leon, V.F. Amaral. *EurJ Med Chem* 41 (2006) 80–87.
- [26] A. R. Todeschini; A. L. P. Miranda, K. C. M. da Silva,; E. J. Barreiro, S. C. Parrini. *Eur. J. Med. Chem.*, 33 (1998) 189.
- [27] R. Li, X. Chen, B. Gong, P. M. Selzer; S. Li, E. Davidson, G. Kurzban,; R. E. Miller, E. Nuzum, J. H. McKerrow, R. J. Fletterick, S. A. Gilmor, C. S. Craik, I. D. Kuntz, F. E. Cohen, G. I. Kenyon, *Bioorg Med Chem* 4 (1996) 1421.
- [28] A.C. Cunha, J.M. Figueiredo, J.L.M. Tributino, A.A.L.P. Miranda, H.C. Castro, R.B. Zingali, C.A.M. Fraga, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, E.J. Barreiro, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2051–2059.
- [29] L.M. Lima, F.S. Frattani, dos Santos JL, Castro HC, Fraga CA, Zingali RB, Barreiro EJ. *Eur J Med Chem* 43 (2008) 348–356.
- [30] C.A. Fraga, E.J. Barreiro, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 167–198.

[31] M.E. Matheus, L.F. Oliveira, A.C. Freitas, A.M. Carvalho, E.J. Barreiro.. *Braz J Med Biol Res* 24 (1991) 1219–1222.

[32] S.C. Kucukguzel, I. Kucukguzel, M. Ulgen,. *Farmaco* 55 (2000) 624–630.

[33] M.J. Genin, C. Biles, B.J. Keiser, S.M. Poppe, S.M. Swaney, W.G. Tarpley, Y. Yagi, D.L. Romero. *J Med Chem* 43 (2000) 1034–1040.

[34] R. Storer, C.J. Ashton, A.D. Baxter, M.M. Hann, C.L. Marr, A.M. Mason, C.L. Mo, P.L. Myers, S.A. Noble, C.R. Penn, N.G. Weir, J.M. Woods, P.L. Coe. *18* (1999) 203–216.

[35] G. Daidone, B. Maggio, S. Plescia, D. Raffa, D. Schillaci, O. Migliara, A. Caruso, V.M. Cutuli, M. Amico-Roxas. *Farmaco* 30 (1998) 350–356.

[36] S.A. Gamage, J.A. Spicer, G.W. Rewcastle, J. Milton, S. Sohal, W. Dangerfield, P. Mistry, N. Vicker, P.A. Charlton, W.A. Denny, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 740–743.

[37] A. Palomer, F. Cabre, J. Pascual, J. Campos, M.A. Trujillo, A. Entrena, M.A. Gallo, L. García, D. Mauleón, A. Espinosa, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1402–1411.

[38] K.S. Charret, R.F. Rodrigues, A.M. Bernardino, A.O. Gomes, A.V. Carvalho, M.M. Canto-Cavalheiro, L. Leon, V.F. Amaral, *Am J Trop Med Hyg.* 80 (2009) 568-73.

[39] K. Schonafinger. *Il Farmaco* 54 (1999) 316-320.

[40] S. Mauels, A. Ransijn, *Exp. Parasitol.* 87 (1997) 98-111.

-
- [41] M. Genestra, R.J. Soares-Bezerra, L. Gomes-Silva, D.L. Fabrino, T. Bellato-Santos, D.B. Castro-Pinto, M.M. Canto-Cavalheiro, L.L. Leon, *Cell Biochem Funct.* 26 (2008) 709-17.
- [42] G. Aguirre, L. Boiani, M. Boiani, H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, W. Porcal, A. Denicola, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.M. Sant'Anna, E.J. Barreiro, *Bioorg Med Chem.* 13 (2005) 6336-46.
- [43] D.H. Beach, L.J. Goad, G.G. Holz Jr., *Mol. Bioch. Parasitol.* 31 (1988) 149–162.
- [44] J. Mael, A. Ransijn, Y. Buchmuller-Rouiller, *Killing. J Leukocyt Biol* 49 (1991) 73–82.
- [45] G. Jr. Grimaldi, J.R. David, D. McMahon-Pratt, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36 (1987) 270–287. Erratum in *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37 (1987) 414.
- [46] M.M. Canto-Cavalheiro, A. Echevarria, C.A. Araujo, M.F. Bravo, L.H. Santos, A.M. Jansen, L.L. Leon, *Microbios* 90 (1997) 51–60.
- [47] F. Denizot and R. Lang, *J. Immunol. Methods* 22 (1986) 271–277.
- [48] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, *Anal Biochem.* 126 (1982) 131–138.

Figure 1 –

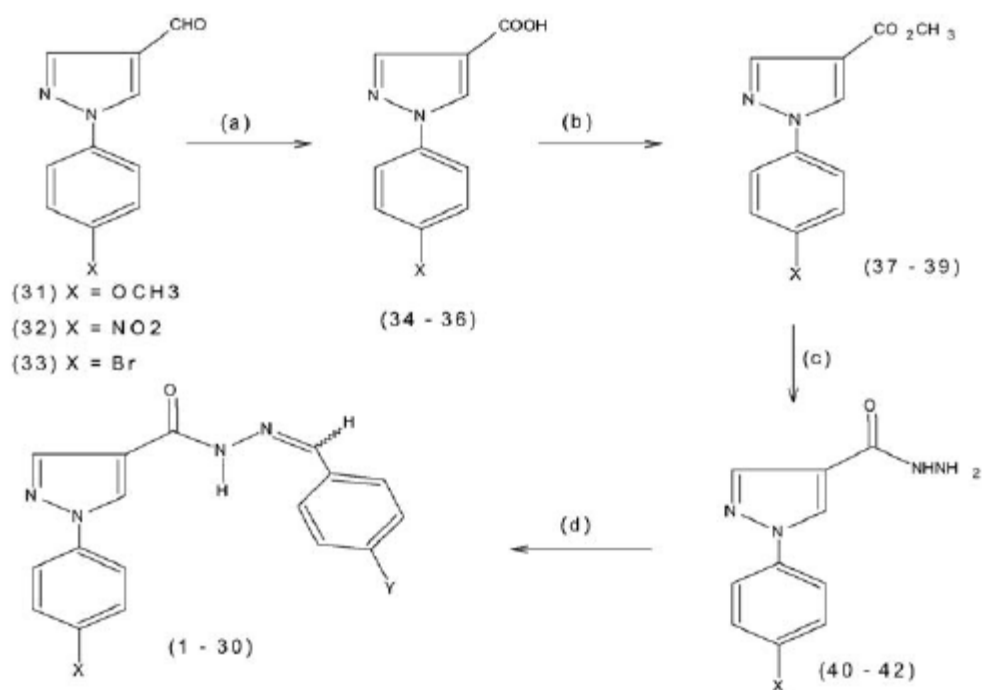


Figure 1. General procedure for the synthesis of 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides.

Table 1 - General structure of 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazide and their precursor IC₅₀ values on promastigotes of *L. amazonensis* and murine macrophages. (* Bernardino et al., 2006)

Compound	X	Y	Promastigote Cytotoxicity	
			Activity	
FC1*	Br	NO ₂	50 μM	>210 μM
FC2*	NO ₂	Cl	80 μM	>270 μM
P1	Br		>600 μM	>600 μM
P2	NO ₂		>600 μM	>600 μM
P3	H		>600 μM	>600 μM

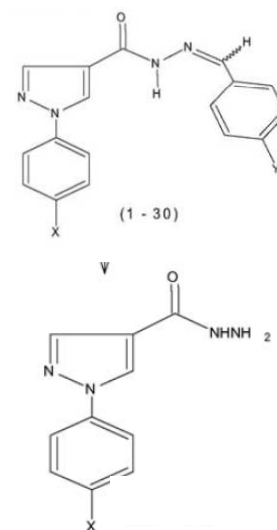
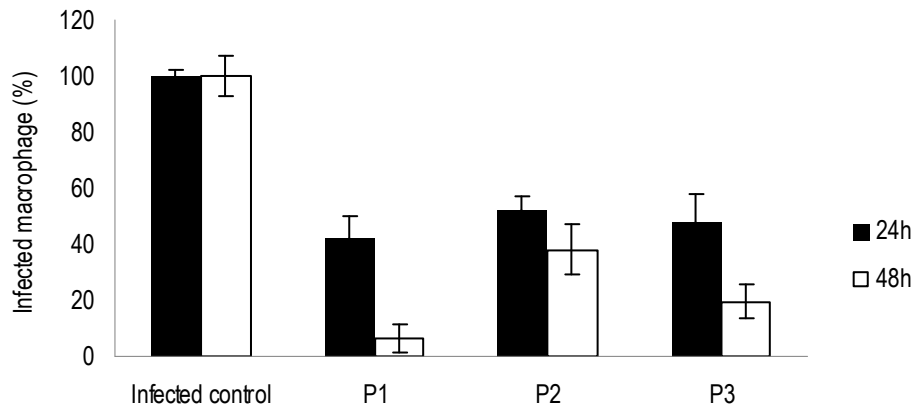


Figure 2a



2b

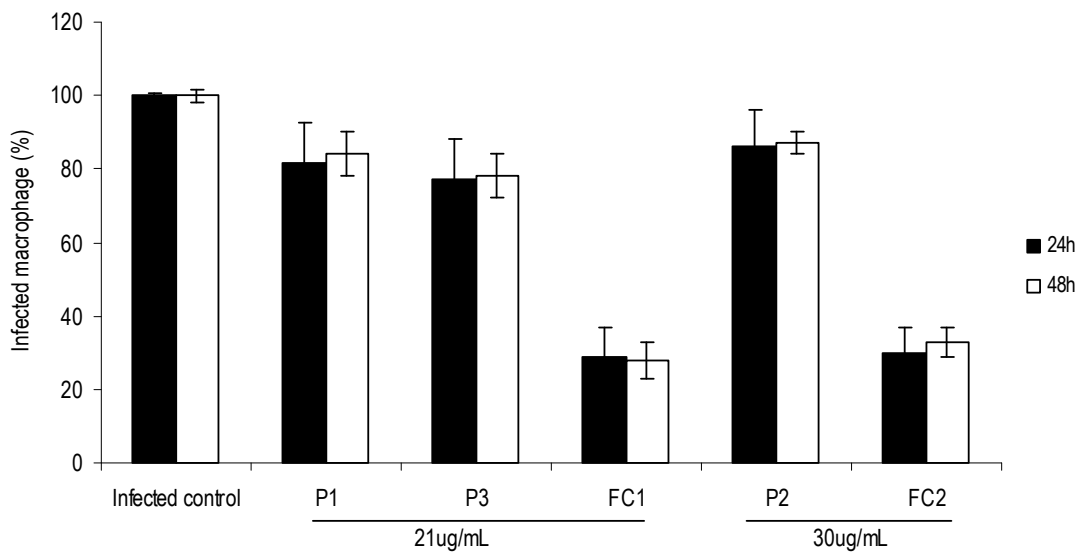
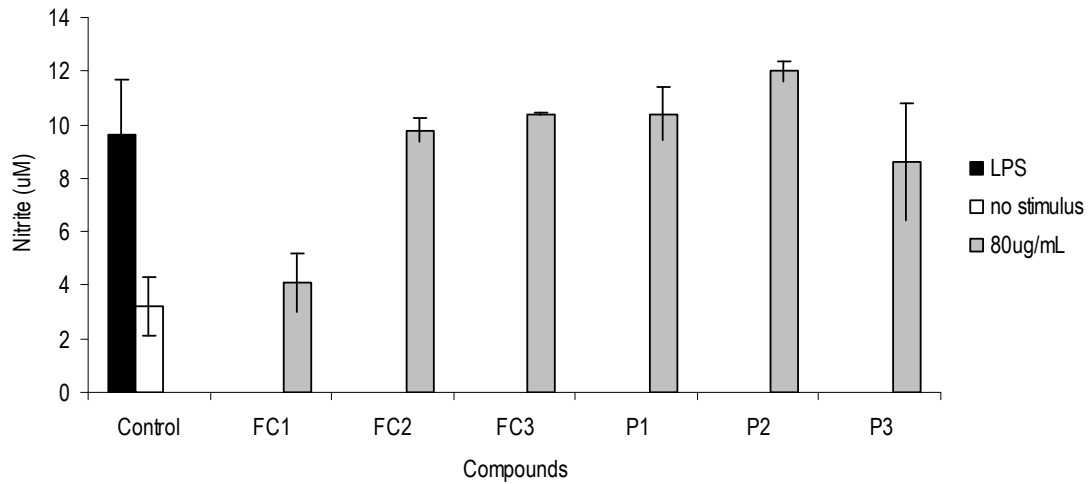


Figure 2 - Effect of carbohydrazides precursors on macrophage infection . Balb/c mice peritoneal macrophages adhered to Lab TeK chamber slides (2×10^5 cells) were infected with *L. amazonensis* amastigotes 4:1 and were treated with (a) P1, P2 and P3 compounds at 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, or (b) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of P1, P3 and FC and 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of P2 and FC2. After 24 h and 48 h, the percentages of infection were estimated. * $P < 0.01$ (compared to control group).

Figure 3a



3b

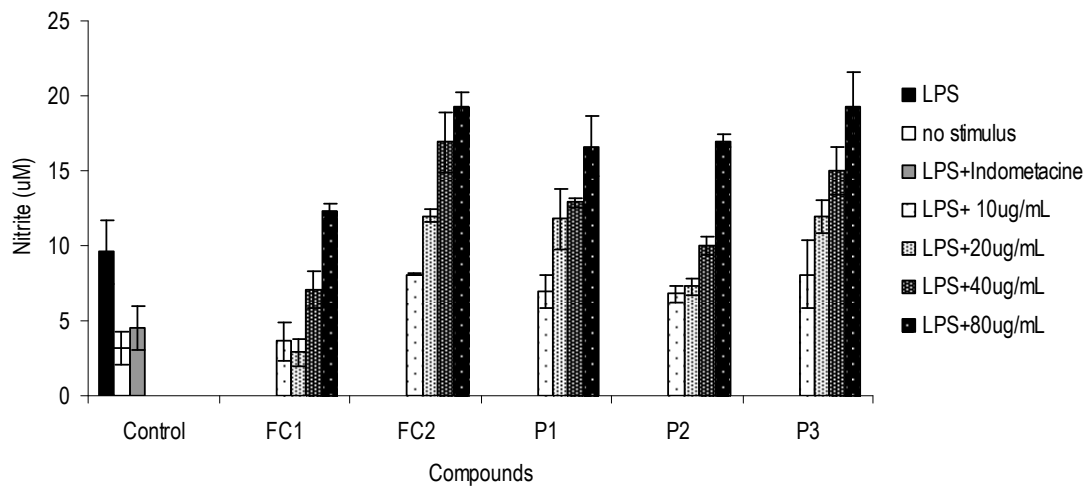


Figure 3 - Nitric oxide (NO) production in infected macrophages treated with carbohidrazides. Balb/c mice peritoneal macrophages: **(a)** Non stimulated and treated with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of carbohidrazides; **(b)** macrophages stimulated with LPS+IFN- γ were treated with carbohidrazides at a concentration range of 10 – 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nitric oxide levels were measured 24 h later. * $P < 0.001$ (compared to control group).

DOCUMENTO 3

Documento 3.

Esta terceira parte do estudo dá continuidade ao estudo *in vivo* anterior, focando os aspectos histopatológicos e imunológicos dos camundongos CBA, infectados por *L. amazonensis* e tratados com os compostos testes. Neste, os camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* e tratados por via oral com os derivados carboidrazidas pirazólicas e os efeitos histopatológicos e imunológicos foram então investigados. O estudo histopatológico revelou que mudanças na derme foram correlacionadas com o tamanho macroscópico da lesão. Camundongos CBA infectados tratados com carboidrazidas pirazólicas tinham lesões menores, e as estruturas da epiderme e derme tiveram níveis mais baixos de infiltrado inflamatório comparados com os camundongos controles infectados não tratados. Na derme dos animais tratados, o número de macrófagos vacuolizados contendo parasitas intracelulares era muito mais baixo do que nos animais infectados não tratados. Além de macrófagos da derme, também observamos um infiltrado inflamatório misto contendo linfócitos e neutrófilos. Apesar de números mais baixos de células B (+ B220) e neutrófilos (MPO +) identificadas nas lesões de camundongos tratados, em comparação com o grupo de camundongos infectados não tratados, o número de células T (CD3 +) manteve-se comparável nos tecidos de ambos os grupos. Em células do linfonodo de drenagem, o número de linfócitos T (CD3 +) foi diminuído, e os números de células B (CD19 +) e células T CD8 + estavam aumentadas em camundongos infectados, quando comparado com o grupo controle não-infectado. Em adicional, foi mostrado que as células tratadas e não tratadas de linfonodos infectados tinham os mesmos níveis expressão do mRNA de TGF- β e IFN- γ , enquanto IL-4 que foi expressa em menor quantidade no grupo tratado. O aumento dos níveis de anticorpos da subclasse específica anti-leishmânia IgG2a/IgG3 foram

observados nos grupos tratados. Em geral, esses achados sugerem que carbohidrazidas pirazólicas exercem efeitos terapêuticos significativos através da modulação da IL-4 expressão e níveis de células B, no entanto, uma avaliação mais aprofundada é necessária para determinar o regime de tratamento ideal. Estes resultados foram submetidos ao International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance em 2011 – “Charret KS et al. The histopathological and immunological profile of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. International Journal for Parasitology.”

**The histopathological and immunological profile of CBA mice infected with
Leishmania amazonensis after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives**

Karen S. Charret ^a, Carla Eponina Carvalho-Pinto ^b, Jussara Lagrota-Cândido ^b, Cristiane F. Hottz ^b, Marie-Luce Flores Lira ^b, Raquel F. Rodrigues ^a, Alice M. R. Bernardino ^c, Marilene M. Canto-Cavalheiro ^a, Leonor Leon ^a, Veronica Amaral ^{b*}

^aInstituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brazil

^bInstituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

^cInstituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de São João Baptista, CEP 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

Abstract

Because there is no vaccine in clinical use, control of Leishmaniasis relies almost exclusively on chemotherapy. Recently, new synthetic pyrazole carbohydrazide compounds were tested in an experimental murine infection model with *L. amazonensis* and showed a significant therapeutic effect, resulting in a lower parasite load and reduced skin lesion size without causing any toxic effects. In this study, CBA mice were infected in the footpad with *L. amazonensis* and then orally treated with pyrazole carbohydrazides; the histopathological and immunological effects were then investigated. Histopathological study revealed that changes in the dermis were correlated with the macroscopic size of the lesion. Infected CBA mice treated with pyrazole carbohydrazides had smaller skin lesions, and the structures of the epidermis and dermis had lower levels of inflammatory infiltration compared with the untreated infected control mice. In the dermis of treated animals, the numbers of vacuolated macrophages containing intracellular parasites were far lower than in untreated infected animals. In addition to dermal macrophages, we also observed a mixed inflammatory infiltrate containing lymphocytes and neutrophils. Although lower numbers of B cells (B220+) and neutrophils (MPO+) were identified in the lesions of treated mice compared with the untreated, infected mice, the number of T cells (CD3+) remained comparable in the tissues of both groups. In draining lymph node cells, the number of T lymphocytes (CD3+) was decreased, and the numbers of B cells (CD19+) and CD8+ T cells were increased in infected mice, when compared with the non-infected control group. In addition, we have shown that treated and untreated infected lymph node cells had similar levels of TGF- β and IFN- γ mRNA expression, whereas IL-4 was expressed at a lower level in the treated group. Increased levels of the specific anti-*Leishmania* IgG2a/IgG3 antibody subclass were observed in the pyrazole carbohydrazide-treated group. Overall, our experimental findings suggest that pyrazole carbohydrazides exert significant therapeutic effects through the modulation of IL-4 expression and B cell levels; however, further evaluation is required to determine the optimal treatment regime.

Keywords

Leishmania amazonensis; pyrazole carbohydrazide; Histopathology; immunological response

*Corresponding author. Address: Departamento de Imunobiologia, Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Outeiro de São João Baptista, Valonguinho, CEP 24020-150, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55-21-2629-2316; fax: 55-21-2629-2376.

E-mail address: vfa@vm.uff.br

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease of the tropical and subtropical regions of the world, affecting about 2 million people per year (Desjeux, 2004). The disease is expanding in Latin America and is increasing among patients with HIV, including in Europe (Cruz et al., 2006). Leishmaniasis are caused by flagellate protozoa that are transmitted to humans by a sand fly vector. When these insects take a blood meal, they transmit the infectious forms of the protozoa to the vertebrate host. The metacyclic promastigotes then infect macrophages, where they remain in phagolysosomes and differentiate into replicating amastigotes. The progression of the disease depends on the nature of the host immune response, as well as factors intrinsic to the parasite, which are expressed differently among the species of *Leishmania*. The control of leishmaniasis is very complex and depends on the variety of the *Leishmania* parasite species, drug resistance and the side effects of the drugs used (Ameen, 2010).

Despite their toxic properties and side effects, pentavalent antimonial compounds (Sb^V) are still the first-choice drugs for leishmaniasis treatment (Andersen, 2005; Frézard et al., 2009). However, the emerging resistance of *Leishmania* to Sb^V compounds limits its use (Herwaldt, 1999; Sundar & Murray, 2005). Other compounds have been evaluated against

Leishmania, such as amphotericin B, rifampicin, pentamidine, aminosidine, miltefosine, allopurinol, ketoconazole, metronidazole and other therapeutic approaches in different regions (Foti 2001). The ideal anti-*Leishmania* drug would be one that eliminated the parasite and, at the same time, modulated the host immune response.

The characterization of two distinct populations of CD4⁺ T cells, Th1 and Th2 cells, in a mouse model of infection by *L. major* (Mosman et al. 1986, Sacks & Noben-Trauth, 2002) enabled some of the mechanisms associated with the resistance or susceptibility of the host to be identified. Th1 responses are associated with the cytokines IFN- γ , IL-2 and TNF- α , with activating macrophages playing an important role. Th1 responses can induce cytophilic antibodies (IgG2a and IgG3) and/or delayed type hypersensitivity as part of a protective immune response against intracellular pathogens (Trinchieri 1993). In contrast, Th2 responses are associated with IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β and IL-13, which stimulate the production of antibodies (IgG1 and IgE), the activation of eosinophils and mast cells and the inhibition of some macrophage functions (Coffman et al. 1988; Boom et al. 1990; Fiorentino et al. 1991). Compounds that alter the cytokine microenvironment can inhibit inflammation and reduce the number of macrophages. Reducing the number of parasites can also reduce the immunogenic stimulus that leads to the expansion of Th2 cells during infection (Alexander et al., 1999).

Infection by *L. amazonensis* causes progressive, non-healing lesions in strains of mice resistant to *L. major* (McMahon-Pratt and Alexander, 2004). Susceptible CBA mice infected with *L. amazonensis* produce IL-4 and IL-10, in contrast to *L. major*-infected CBA mice, which produce IFN- γ and IL-10 (Lemos de Souza et al., 2002). However, studies in C3H and C57BL/6 mice showed that the pathogenesis of the disease caused by *L. amazonensis* is independent of IL-4/IL-10 cytokine production (Afonso & Scott, 1993; Jones et al., 2002; Ji et al., 2003). In humans, IL-4 is associated with disease development

(Mansueto et al., 2007). The cellular mechanisms responsible for the susceptibility of mice to infection by *L. amazonensis* is still not clear, although CD4⁺ T cells have been shown to play an important role in the pathogenesis of the disease (Soong et al, 1997;. Jones et al, 2000). Other cell types also contribute to the development of disease, including B cells and the antibodies they produce (Kima et al., 2000).

Heterocyclic acyl hydrazones pyrazole is a structure with diverse pharmacological activities and is, therefore, of great interest for the treatment of leishmaniasis (Barreiro et al., 2002). The 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides are heterocyclic compounds which contain a ring and a pyrazole hydrazone group. Analgesic, anti-inflammatory and anti-thrombotic activities have been reported for these acyl hydrazones compounds (Barreiro et al. 2002). Some studies have also demonstrated antitumor and antiviral activities (Rostom et al., 2003). Pyrazole carbohydrazide derivatives showed anti-parasitic activity *in vitro* against *L. amazonensis* promastigotes and, to a lesser extent, *L. braziliensis* and *L. chagasi*, with no toxicity to murine macrophages (Bernardino et al., 2006). These derivatives were tested in a murine model of infection with *L. amazonensis* and showed a significant therapeutic effect, with no signs of liver or kidney toxicity (Charret et al, 2009). Based on these data, mice infected with *L. amazonensis* were treated with pyrazole carbohydrazide, and the histology of lesions, cytokine mRNA expression, B and T lymphocyte phenotypes in the draining lymph nodes of the infection site and changes in the humoral immune response were analyzed.

2. Materials and methods

2.1 Parasites

L. amazonensis (MHOM/BR/77LTB0016 strain) was maintained by animal passage and cryopreserved in liquid nitrogen. Promastigotes were cultured in Schneider's *Drosophila*

medium, pH 7.2 (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 10–20% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS). The characterization of the strains was performed using molecular techniques such as isoenzyme electrophoresis (Grimaldi et al., 1987).

2.2 Animals

Mice were acquired from the Núcleo de Animais de Laboratório (NAL-UFF) and Centro de Experimentação e Criação de Animais de Laboratório (CECAL-Fiocruz). Each experimental group consisted of 8 male 8-week-old CBA mice. BALB/c mice were used as a control for infection. The experiments were conducted using a protocol approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Fiocruz (P0020-00)/ CEPA/UFF (0090/09).

2.3 Chemicals

The 1-(4-X-phenyl)-N'-[(4-Y-phenyl) methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides (Fig. 1) with the substituents Br-NO₂ (X = Br, Y = NO₂); NO₂-Cl (X = NO₂, Y = Cl) and NO₂-Br (X = NO₂, Y = Br) were synthesized using the molecular hybridization approach. The structure of these stable and crystalline compounds was fully characterized by the usual methods (IR, ¹H-, ¹³C-NMR) (Bernardino et al., 2006).

2.4 Cutaneous lesion measurements

Mice were infected with 1 x 10⁶ promastigotes (late log phase) of *L. amazonensis*. Animals were treated orally with the pyrazole carbohydrazide compounds (1.5 mg/kg/day of Br-NO₂, NO₂-Cl and NO₂-Br) from the second week after infection for up to 45 days, continuously. Lesion thickness was evaluated weekly by measuring the diameters of both rear feet with a direct reading dial caliper (Mitutoyo, Yokohama, Japan). The size of the lesion in millimeters was calculated by subtracting the measurement of the uninfected foot from that of the infected foot.

2.5 Histopathology and immunohistochemistry

Skin lesions were collected at 12 weeks of infection and at the end of the treatment, and the tissues were fixed in buffered 4% formalin overnight and embedded in paraffin. The sections (5 μm) were hydrated and stained by Mayer hematoxylin and eosin with phloxine (Sigma-Aldrich, Massachusetts, USA) staining. For the immunostaining, sections were deparaffinized and treated with distilled water containing 3% H_2O_2 and were then unmasked with 10 mM sodium citrate buffer in a steam bath and blocked using a biotin blocking kit (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were incubated with 20% normal goat serum and, then, with monoclonal anti-B220 (Southern Biotechnology, San Diego, CA, USA), CD3 (DBS, Pleasanton, CA, USA), -F4/80 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) and -MPO (LifeSpan bioScience, Seattle, WA, USA) antibodies to identify B and T lymphocytes, macrophages and neutrophils respectively. Peroxidase activity was detected using the DAB substrate system (Dako, Glostrup, Denmark). The tissue sections were analyzed by optical microscopy.

2.6 Flow cytometry analysis

The frequency of peripheral blood leukocytes was analyzed by flow cytometry. Anti-mouse CD4+-Tricolor, CD8+-PE and CD19+-FITC monoclonal antibodies (Caltag Lab., San Francisco, CA, USA) were used for the detection of CD4+, CD8+ T cells and B cells respectively. Samples were acquired with a FACS CyAn Flow Cytometer (Dako, Glostrup, Denmark). A total of 10.000 events were collected within a viable lymphocyte-enriched gate defined according to the forward and side scattering parameters. Appropriate fluorescence gates were created based on the labeling controls, with respect to curve inflexions, and the analysis was carried out with the Summit v.4.3 Build 2445 program (Dako, Fort Collins, CO, USA).

2.7 RT-PCR

Total RNA from the lesions was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Next, 1 µg of total RNA obtained from the lesions or lymph nodes was reverse transcribed using SuperScript II RNase Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) 15 primers (Promega, Southampton, UK). PCR amplification was performed with a programmable thermal cycler (Perkin–Elmer 2400, USA). The cDNA amplification protocols were as follows: for TGF-β and GAPDH, 30 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 3 min at 72°C; for IFN-γ, 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 62°C, and 3 min at 72°C; and for IL-4, 35 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 65°C, and 3 min at 72°C. All reactions were completed with a final amplification step at 72°C for 5 min. The sequences of the PCR primers (Table 1) were made to order by Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). A 100-bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a size marker. The PCR products were subjected to electrophoresis in a 1.7% agarose gel containing 0.8 mg/ml ethidium bromide and photographed using a Doc-Print II (Vilber Loumart, France).

2.8 Evaluation of serum antibody titers

To assess the parasite-specific antibody titers of IgG, IgG1, IgG2a and IgG3, 96-well assay plates were coated with *Leishmania amazonensis* promastigote lysates (50 µg/mL) overnight at 4°C. After blocking, the plates were washed and incubated with individual mouse serum samples (1:50 dilution) for 1 h at 37°C. Next, the plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgGs (1:4.000 dilution; BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) for 1 h at 37°C. The colorimetric assay was developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.9 Statistical analyses

The results are expressed as the arithmetic mean of triplicates, accompanied by the respective standard deviation. The means of the control and experimental groups were compared using the Student's t-test. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$. The statistical analyses were performed using Graph Pad Instat 2.0.

3. Results

3.1 Effect of pyrazole carbohydrazide treatment on footpad lesion progression

During the clinical analysis of CBA mice infected with *L. amazonensis*, we observed progressive growth in the size of the lesions in all animals from 3 weeks post-infection until the end of the study (data not shown). Oral treatment with pyrazolic carbohydrazide compounds with the X = Br, Y = NO₂ (compound 1), X = NO₂, Y = Cl (compound 2) and X = NO₂, Y = Br (compound 3) substituents promoted the control of the of skin lesions at 12 weeks after infection, when compared with the non-treated group (Fig.2).

3.2 Histopathology and immunohistochemistry in lesions of treated and untreated infected mice

To investigate what happened in the skin lesions when the animals were treated with pyrazole carbohydrazide, histological (Fig 3) and immunohistochemical assessments were performed (Fig 4). The slides of the foot lesion sections obtained at 12 weeks post-infection revealed different intensities of inflammatory cellular infiltration in the treated and untreated infected mice (Fig 2). In addition, histopathological examination revealed that changes in the dermis were correlated with the macroscopic size of the lesion.

In the footpad of the infected mice, vacuolated macrophages containing amastigotes were present at much higher numbers (Fig. 3A, B). Furthermore, a great number of free parasites were detected in the dermis of these mice (Fig. 3B). The infiltrating cells were a mixture of inflammatory cells, including macrophages, lymphocytes, neutrophils and rare eosinophils.

In contrast, the treated mice showed lower numbers of parasitized macrophages and rare free amastigotes in the extracellular space (Fig. 3C, D). CBA mice infected and treated with the two pyrazole carbohydrazide derivatives had much smaller skin lesions, and the structures of the epidermis and dermis were preserved, with limited inflammatory infiltrates (Fig 2, Fig 3C, D, E, F, G, H). Although vacuolated macrophages containing intracellular parasites were found in the dermis of treated animals, they were far less numerous than in untreated animals.

To further define the cellular populations present at the infection sites, immunohistochemical studies using specific monoclonal antibodies for CD3, MPO, F4/80 and B220+ were performed. Although lower numbers of B220+ cells and neutrophils (MPO+) were observed in the lesions of treated mice compared with those in the untreated mice, the number of T cells (CD3+) remained comparable in the tissues of both treated and non-treated infected mice (Fig. 4). Vacuolated macrophages were observed by hematoxylin

and eosin staining, but when assessed by immunohistochemistry, cells stained with anti-F4/80 monoclonal antibodies were scarcely detected in the infected mice, treated or not (data not shown).

3.3 Evaluation of lymphoid cell populations

L. amazonensis-infected CBA mice had swollen popliteal draining lymph nodes, and it was important to assess the subpopulations of lymphocytes present in the lymph nodes of the footpad. To define which inflammatory cell types were present at the site of infection, flow cytometry was used to determine the relative proportions of B (CD19⁺) and T lymphocytes (CD3⁺) and their subsets (CD4⁺ and CD8⁺).

The percentages of lymphocytes present in the lymph nodes of infected and uninfected animals are displayed as histograms (Fig. 5). The phenotypic analyses of the lymphocytes from the draining lymph nodes showed a very significant ($p = 0.002$) decrease in the relative number of CD3⁺ cells in infected animals relative to the uninfected control mice. The percentage of CD4⁺ cells in infected mice was decreased ($p = 0.001$), whereas CD8⁺ cells were significantly increased ($p = 0.03$) compared with the uninfected control group (Fig. 5A, B). In addition, an increase in CD19⁺ cells (Fig. 5 C, D) was observed in infected mice compared with the uninfected control group ($p = 0.01$). Moreover, no significant difference was observed in the percentages of CD3⁺ or CD19⁺ cells between the treated and untreated infected groups.

3.4 Expression of cytokines in lymph node cells

The cytokines that mediate inflammatory responses were evaluated by RT-PCR using RNA from draining lymph node cells at the site of the infection. mRNA expression levels of TGF- β and IFN- γ in the draining lymph nodes were not statistically different in the infected mice treated with compound 1 and those left untreated, when quantified at 10

weeks post-infection. Even though these results showed high variability, it was remarkable that IL-4 mRNA expression was lower ($p < 0.05$) in the mice treated with compound 1 than in untreated infected mice (Fig. 6A, B).

3.5 IgG isotypes of anti-*Leishmania* antibodies

To investigate the possibility of immunomodulation, the levels of specific anti-*Leishmania* antibodies were analyzed. Serum levels of anti-*Leishmania* IgG were increased in all infected animals and were significantly higher in animals treated with compound 2 at 6 weeks post-infection (data not shown). At the end of the treatment, 6 weeks after infection, similar levels of specific anti-*Leishmania* antibodies of the IgG1 subclass were observed in the animals treated with compounds 1 and 2. At 12 weeks post-infection, the levels of IgG1 isotypes were compared to untreated animals (Fig. 7A). At 6 weeks post-infection, a significant increase in the levels of IgG2a anti-*Leishmania* antibodies was observed in the animals treated with compound 2, whereas the animals treated with compound 1 showed the same level of IgG2a antibodies as the untreated animals (Fig. 7B). At 12 weeks post-infection, the level of IgG2a was decreased in the animals treated with the compound 2. In addition, at six weeks post-infection, a significant increase in the levels of IgG3 was observed in the animals treated with compound 1 (Fig. 7C).

4. Discussion

Leishmaniasis is a tropical/subtropical disease that has been treated with a variety of drugs with toxic properties (Foti, 2001). In this study, we demonstrated that pyrazole carbohydrazide derivatives decrease the size of skin lesions and decrease cellular infiltration into the lesions induced by *L. amazonensis* infection. In a previous study, pyrazole carbohydrazides (compound 1, X = Br, Y = NO₂ and compound 2, X = NO₂, Y = Cl) had a significant therapeutic effect against the promastigote form of *L. amazonensis* in

vitro, although compound 3 (X = NO₂, Y = Br) showed little activity. We have shown that the substituents on the benzene ring can strongly influence the therapeutic activity (Bernardino et al., 2006). Because the search for alternative therapies, including the identification of formulations for the oral treatment of cutaneous leishmaniasis, is emerging (Croft & Coombs, 2003), we decided to test the therapeutic effects of these compounds. We demonstrated that oral treatment with pyrazolic carbohydrazides (compound 1, X = Br, Y = NO₂, and compound 2, X = NO₂, Y = Cl) decreased lesion size and reduced the parasite burden in the popliteal lymph nodes by approximately 98% at the 16th week post-infection compared with the untreated infected control (Charret et al., 2009). Moreover, compound 3, a molecule that substitutes bromine atoms (X) for nitro (Y) on the benzene rings at the *para*-site, did not show *in vitro* leishmanicidal activity toward the promastigote form (Bernardino et al., 2006), but in this current work, this compound did show a therapeutic effect when tested in our murine model (Fig. 1). Additionally, a small number of studies correlated clinical responses with the *in vitro* sensitivity of promastigotes in the New World (Azeredo-Coutinho et al., 2007).

The analysis of the cellular profile of the infected footpad at 12 weeks post-infection showed mainly vacuolated macrophages filled with amastigotes. This observation was corroborated by others studies (Lemos de Souza., 2000, Abreu-Silva et al., 2004, Cardoso et al., 2010). In addition, neutrophils were observed in the lesions during the chronic phase post-infection with *L. amazonensis*, and treated mice, with the exception of those treated with compound 3, showed a reduction in infiltrating cell numbers. CBA mice infected with *L. amazonensis* had an increased percentage of neutrophils in the peripheral blood, which was not seen when infected animals were treated with the pyrazole carbohydrazide derivatives (Charret et al., 2009). Although pyrazolic compounds were able to control the parasitic burden of the draining lymph node and decrease the size of the

cutaneous lesions and the extent of cellular infiltration at the site of infection in our study, the inflammatory process observed at the site of infection was not completely eliminated; a few intra- and extracellular parasites were still observed in the dermis at the end of the treatment. Therefore, the combination of some existing drugs with these new compounds or a modified scheme of treatment/dose might be required to improve the efficacy of these compounds.

In this study, an expansion of B lymphocytes and a decrease in T lymphocytes was observed in the popliteal lymph nodes of CBA mice infected with *L. amazonensis* that had been treated with pyrazolic carbohydrazides or left untreated. These compounds failed to directly modulate the expansion of any particular lymphocyte subset within the lymph node (Fig. 5B, D). Similar to another study (Cardoso et al., 2010), our results demonstrated an expansion of B cells in the draining lymph node at the site of the infection and in cutaneous lesions from CBA mice infected with *L. amazonensis* 12 weeks post-infection (Fig. 5C, D). Additionally, treatment with compounds 1 and 2 decreased the percentage of B cells present in the dermis of infected mice but not in the lymph nodes (Fig. 4B, C). Furthermore, some studies have found that B cells play an important pathogenic role in leishmaniasis pathogenesis (McMahon-Pratt and Alexander, 2004), especially in the priming of *Leishmania*-specific CD4⁺ T cells (Wanasen et al., 2008). The level of CD4⁺ T-cell activation could be an important factor in determining the outcome of *Leishmania* infection (Xin et al., 2011).

In the present study, TGF- β and IFN- γ mRNA expression was detected by RT-PCR in the draining lymph nodes, and these results were not statistically different for the treated or untreated infected groups, when quantified at 10 weeks post-infection (Fig. 6). However, the mRNA expression of IL-4 was lower in mice treated with compound 1 than

in the untreated infected mice. IL-4 is considered to be a susceptibility factor for *L. amazonensis* infection (Guimarães et al., 2006).

Because of the involvement of B cells in immune responses to *Leishmania* infection, their antibody products were also investigated. Kima et al. (2000), showed that JhD mice that were unable to produce antibodies were resistant to *Leishmania* infection with reduced lesion size. In addition, mice lacking the FcR γ chain showed reduced inflammation (Barnes et al., 2002). Cytokines secreted by T cells are also involved in the activation of B cells, inducing antibodies with diverse isotypes. IL-4 drives IgE and IgG1 antibody production and inhibits the production of IgG2a, IgG2b and IgG3, whereas IFN- γ stimulates IgG2a and IgG3 production (Coffman et al. 1988). Our experiments showed that anti-*Leishmania* IgG isotypes increased in all infected animals. Recently, it has been shown that IgG1, but not IgG2a/c, was considered pathogenic to *L. mexicana* infection, and mice lacking IgG1 showed increased IgG2a/c, IgG3, and IgM levels and were less susceptible to infection (Chu et al., 2010). In our study, a significant increase in the levels of IgG2a anti-*Leishmania* antibodies was observed in the animals treated with compound 2, whereas the animals treated with compound 1 had increased IgG3 levels. The specific anti-*Leishmania* IgG subclasses show an interesting pattern of Th1/Th2 responses driving humoral immune responses in mice infected with *L. amazonensis* and treated with pyrazolic carbohydrazides. However, *Leishmania*-specific antibodies could increase parasite uptake by macrophages and dendritic cells and modulate their functions (Prina et al., 2004). In addition, a study (Deak et al., 2010) points to B cell activation as an important feature of leishmaniasis pathogenesis; this may signify a target for therapeutic intervention.

In conclusion, this report suggests that CBA mice infected with *L. amazonensis* and treated with pyrazole carbohydrazide had smaller skin lesions and showed intact structures of the

epidermis and dermis with little inflammatory infiltration. Pyrazole carbohydrazides exert significant therapeutic effects through immunomodulation with potential implications for the future design of treatment regimens for *Leishmania amazonensis* infection.

Acknowledgements

This work was supported by a CNPq Fellowship to Karen Charret and grants from PROPPI/UFF, FAPERJ and FIOCRUZ. The authors are grateful to Nina Cortes and Bartira Davi de Oliveira for their excellent technical assistance.

5. References

- Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Cupolilo, S.M., Cardoso, F.O., Souza, C.S., Gonçalves da Costa, S.C., 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet. Parasitol.* 121, 179-187.
- Afonso, L.C., Scott, P., 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61, 2952–2959.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.* 18, 2993-3002.
- Andersen, E.M., Cruz-Saldarriaga, M., Llanos-Cuentas, A., Luz-Cjuno, M., Echevarria, J., Miranda-Verastegui, C., Colina, O., Berman, J.D., 2005. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 133-137.
- Ameen, M., 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin. Exp. Dermatol.* 35, 699-705.

-
- Azeredo-Coutinho, R.B., Mendonça, S.C., Callahan, H., Portal, A.C., Max, G., 2007. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (Glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J. Parasitol.* 93, 688-693.
- Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., Miranda Rodrigues, A.L.P.C.R., 2002. A química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Quim. Nova.* 25, 129-148.
- Barnes, N., Gavin, A.L., Tan, P.S., Mottram, P., Koentgen, F., Hogarth, P.M., 2002. FcγRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity.* 16, 379-89.
- Bernardino, A.M.R., Gomes, A.O., Charret, K.S., Freitas, A.C.C., Machado, G.M.C., Canto-Cavalheiro, M.M., Leon, L.L., Amaral, V.F., 2006. Synthesis and leishmanicidal activities of 1-(4-X-phenyl)-N`-[(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides. *Eur. J. Med. Chem.* 41, 80-7.
- Boom, W.H., Liebster, L., Abbas, A.K., 1990. Titus RG. Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: Correlation with disease progression or resolution. *Infect. Immun.* 58, 3863-3870.
- Cardoso, F.O., de Souza, C.da S., Mendes, V.G., Abreu-Silva, A.L., Gonçalves da Costa, S.C., Calabrese, K.S. 2010 .Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *Infect. Dis.* 201, 1933-40
- Charret, K.S., Rodrigues, R.F., Bernardino, A.M.R., Gomes, A.O., Carvalho, A.V., Canto-Cavalheiro, M.M., Leon, L., Amaral, V.F., 2009. Therapeutic effect of pyrazole carbohydrazides derivatives on the mouse model of *Leishmania amazonensis* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 339-344.
- Chu, N., Thomas, B.N., Patel, S.R., Buxbaum, L.U., 2010. IgG1 Is Pathogenic in

Leishmania mexicana. Infection. J. Immunol. 185, 6939-6946.

Coffman, R.L., Seymour, B.W., Lebman, D.A., Hiraki, D.D., Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F., Finkelman, F.D., Bond, M.W., et al. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. Immunol. Rev. 102, 5-28.

Croft, S.L., Coombs, G.H., 2003. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends. Parasitol. 19, 502-8.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J., 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. Indian. J. Med. Res. 123, 357-388

Deak, E., Jayakumar, A., Cho, K.W., Goldsmith-Pestana, K., Dondji, B., Lambris, J.D., McMahon-Pratt, D., 2010. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. Eur. J. Immunol. 40, 1355-68.

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

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immuno. 147, 3815-22.

Foti, G., 2001. Treatment of visceral leishmaniasis. Minerva Med. 92, 245-249.

Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R.R., 2009. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules.; 14, 2317-2336.

Grimaldi, G. Jr., David, J.R., McMahon-Pratt, D., 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36, 270-287.

Erratum in *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 414.

Guimarães, E.T., Santos, L.A., Ribeiro dos Santos, R., Teixeira, M.M., dos Santos, W.L., Soares, M.B., 2006. Role of interleukin-4 and prostaglandin E₂ in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect.* 8, 1219-26.

Herwaldt, B., 1999. Miltefosine - The Long-Awaited Therapy for Visceral Leishmaniasis? *N. Engl. J. Med.* 341, 1840-1842.

Lemos de Souza, V., Ascensão Souza, J., Correia Silva, T.M., Sampaio Tavares Veras, P., Rodrigues de-Freitas, L.A., 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2, 1807-15.

Ji, J., Sun, J., Soong L., 2003. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 71, 4278-4288.

Jones, D.E., Buxbaum, L.U., Scott P., 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 165, 364-72.

Jones, D.E., Ackermann, M.R., Wille, U., Hunter, C.A., Scott, P., 2002. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.* 70, 2151-2158.

Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D., 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191, 1063-8.

Mansueto, P., Vitale, G., Di Lorenzo, G., Rini, G.B., Mansueto S, Cillari E. 2007.

Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 20, 435-445.

McMahon-Pratt, D., Alexander, J., 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol.* 201, 206–224.

Mosmann, T.R., Cherwinsky, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348.

Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., Antoine, J. C., 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell. Sci.* 117, 315–325.

Rosa, M.S.S., Mendonça-Filho, R.R., Bizzo, H.R., Rodrigue, I.A., Soares, R.M., Souto-Padron, T., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., 2003. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *AntiMicrob. Agents. Chemoth.* 47, 1895-1901.

Rostom, S.A., Shalaby, M.A., El-Demellawy, M.A., 2003. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HCV agents. *Eur. J. Med. Chem.* 38, 959-74.

Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845–858.

Soong, L., Chang, C.H., Sun, J., Longley, B.J. Jr., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., McMahon-Pratt, D., 1997. Role of CD4⁺T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 158, 5374–83.

Sundar, S., Murray, H., 2005. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. Bull World Health Organ. 83, 5.

Trinchieri, G., 1993. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. Immunol. Today. 14, 335-337.

Xin, L., Wanderley, J.L., Wang, Y., Vargas-Inchaustegui, D.A., Soong, L., 2011. The magnitude of CD4(+) T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. Parasite Immunol. 33, 170-80.

Wanasen, N., Xin, L., Soong, L., 2008. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. Int. J. Parasitol. 38, 417–29.

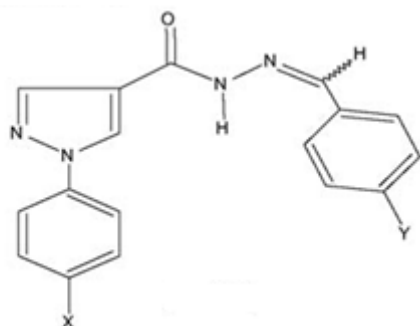


Figure 1. Chemical structure of pyrazole carbohydrazides.

Table 1 - Primer sequences and the sizes of the PCR products.

Oligonucleotide	Sense	Antisense	(bp)
TGF- β 1	CAAGGAGACGGAATACAGGGCT	GCACACAGCAGTTCTTCTCT GT	260
IFN- γ	GGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC	GACTCCTTTTCCGCTTCCTGA	426
IL-4	ACGGCACAGAGCTATTGATG	ATGGTGGCTCAGTACTACGA	454
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACGGA	TGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG.	245

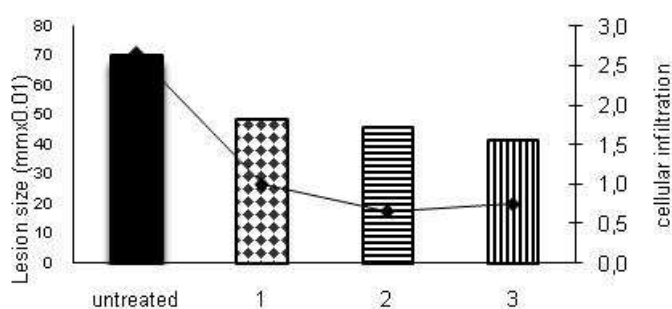


Fig. 2- Mean lesion diameter for CBA mice infected with *L. amazonensis* (MHOM/BR/77LTB0016) and treated with the pyrazole carbohydrazide derivatives Br-NO₂ (1), NO₂-Cl (2) and NO₂-Br (3) or left untreated, at 12 weeks post-infection. Treatment started at the second week post-infection and continued up to 45 days post-infection (n = 8 per group).

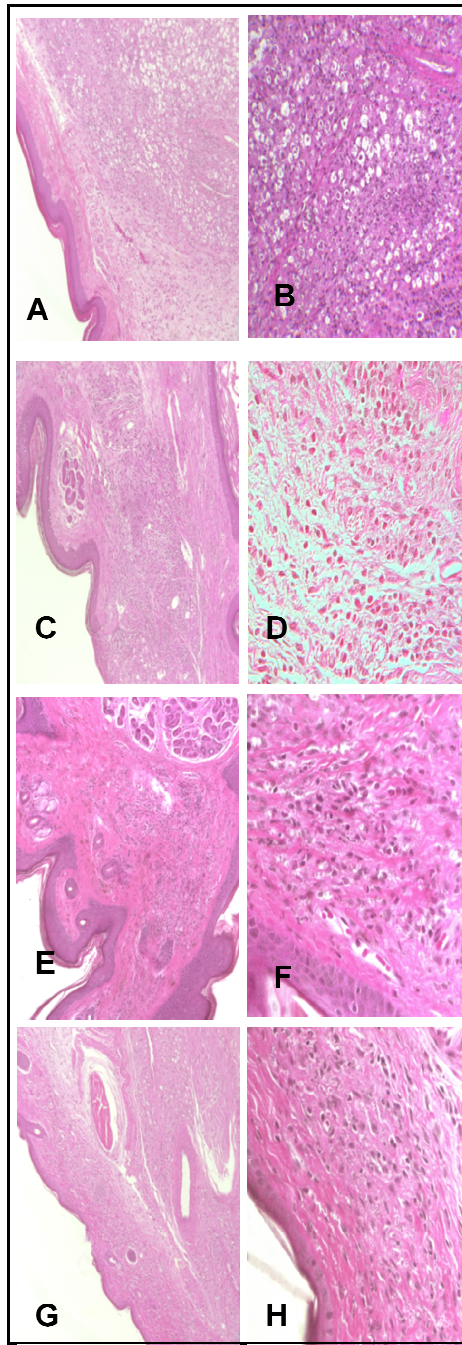


Figure 3. Histological analysis of the skin in non-infected and *L. amazonensis*-infected mice at 12 weeks post-infection. CBA mice were infected with 1×10^8 promastigotes in the right hind foot and either treated with pyrazol carbohydrazides for 45 days or left untreated. Representative H&E staining of lesion tissues from (A, B) untreated animals (C, D) animals treated with Br-NO₂ (compound 1), (E, F) animals treated with NO₂-Cl (compound 2) and (G, H) animals treated with NO₂-Br (compound 3). Sections from the treated mice showed more preserved skin containing fewer parasites and untreated group showed vacuolated heavily parasitized macrophages (arrows), The magnification was 100× for A, C, E, G and 400×, for B, D, F, H.

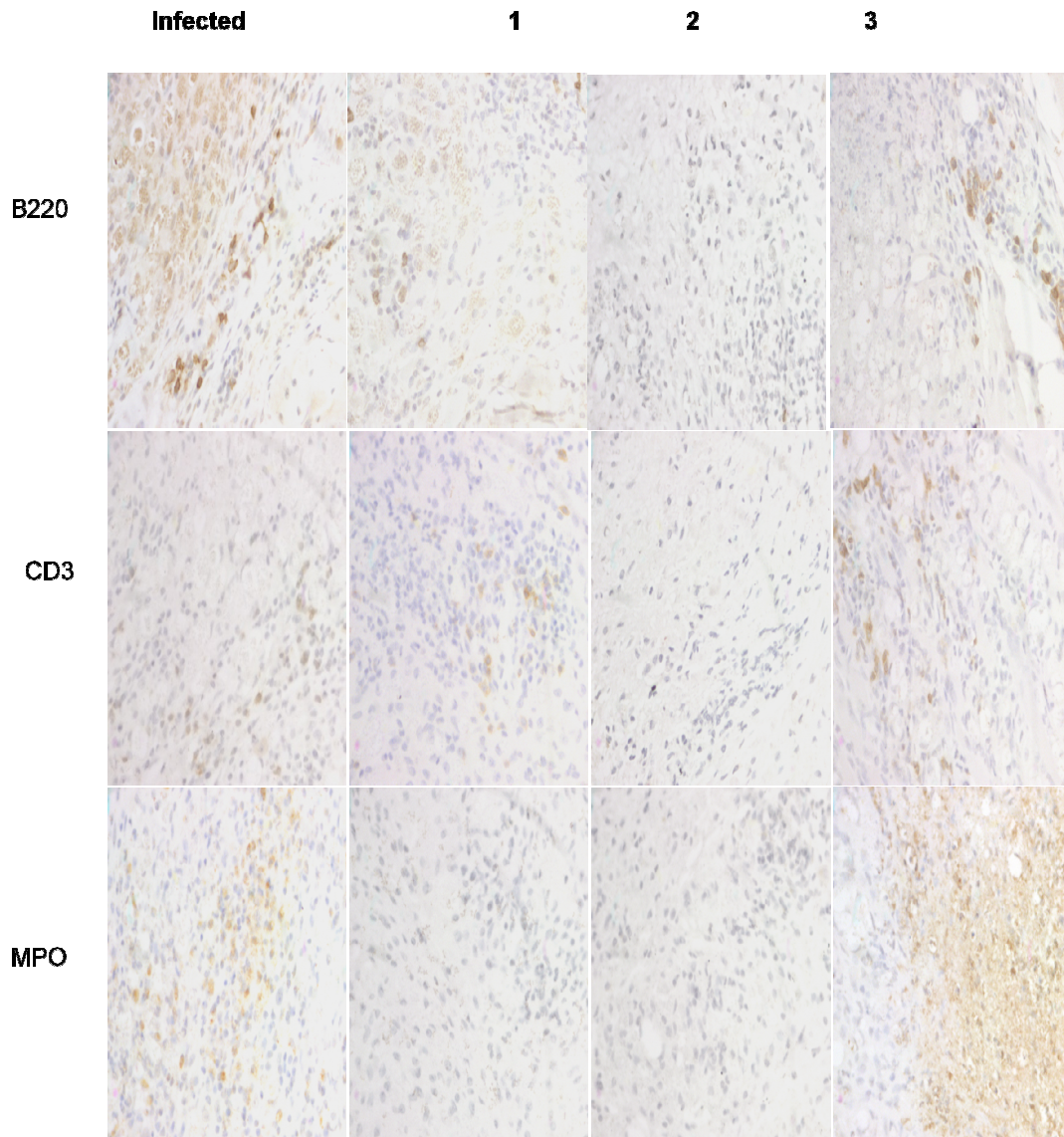
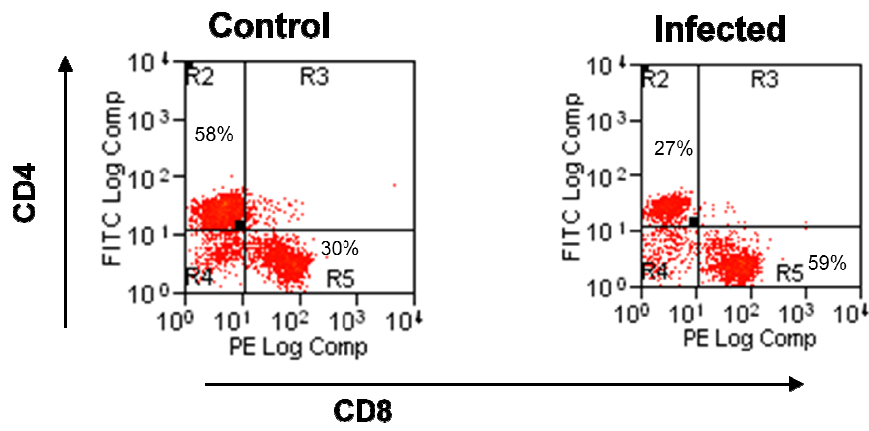
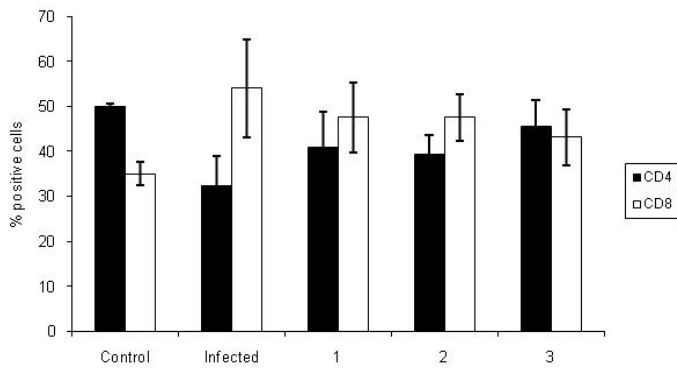


Figure 4. Immunohistochemical analysis of cutaneous lesion from infected *L. amazonensis* at 12 post infection with or without treatment. Mice were grouped, infected and treated as described in Fig. 1. (400x). Lesion tissues were collected and stained with anti-B220 (A, B, C, D), anti-CD3 (E, F, G,H) or anti-MPO (I, J, K, L). Representative sections show infiltrates for B220+ cells in (A) and (D), but not in (B) and (C). A little infiltrate for CD3+ was observed in (E), (F) and (H). Cell staining MPO+ was seen in (I) and mainly in (J). Mice infected and treated with compound 2 did not staining for all tested. All images were taken at 40 x magnification.

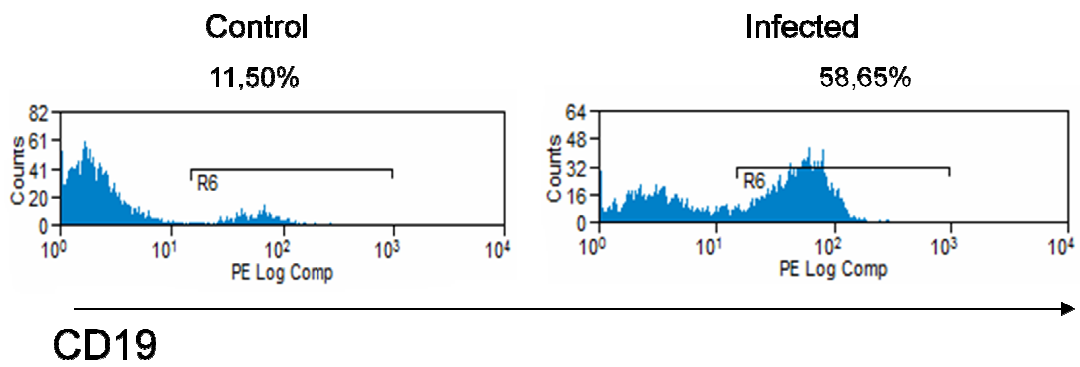
A



B



C



D

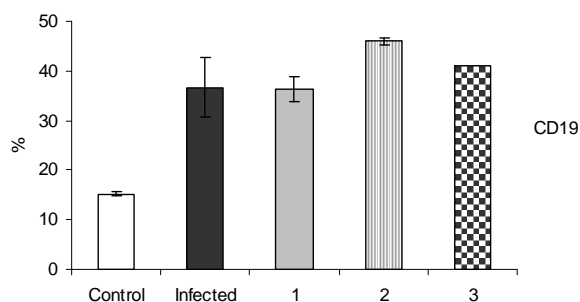
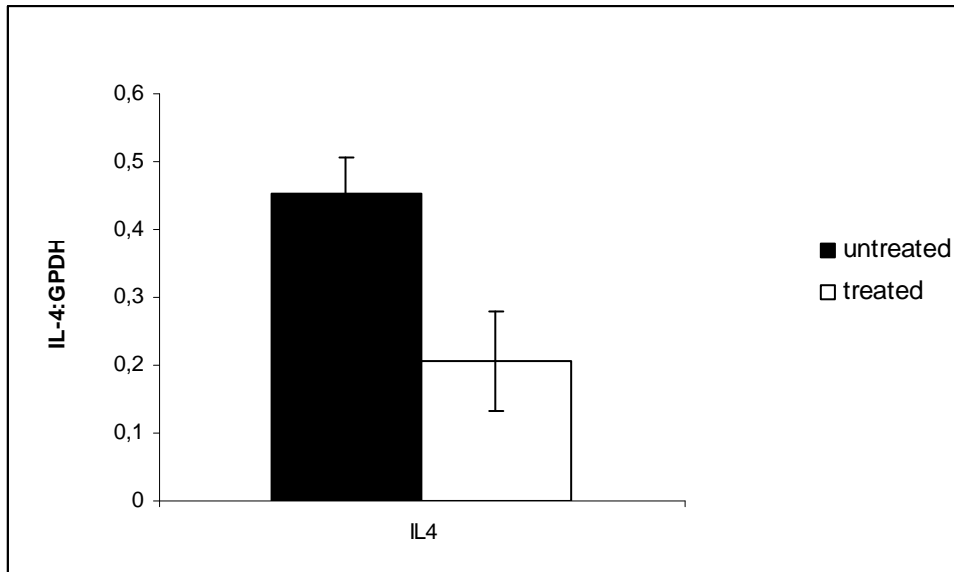


Figure 5 - Cellular profiles of mice infected and treated for up to 45 days with pyrazole carbohydrazides derivatives, all of the experiments above were performed at 12 weeks post-infection. (A, B) The proportion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from the popliteal lymph node of mice infected and treated with pyrazole carbohydrazide derivatives 1, 2 and 3 or left untreated. (C, D) CD19+ B lymphocytes from the popliteal lymph node of mice treated with pyrazole carbohydrazides 1, 2 and 3 or left untreated. There were no significant differences between the treated and untreated infected groups.

A



B

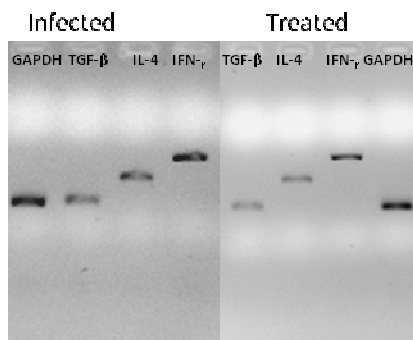
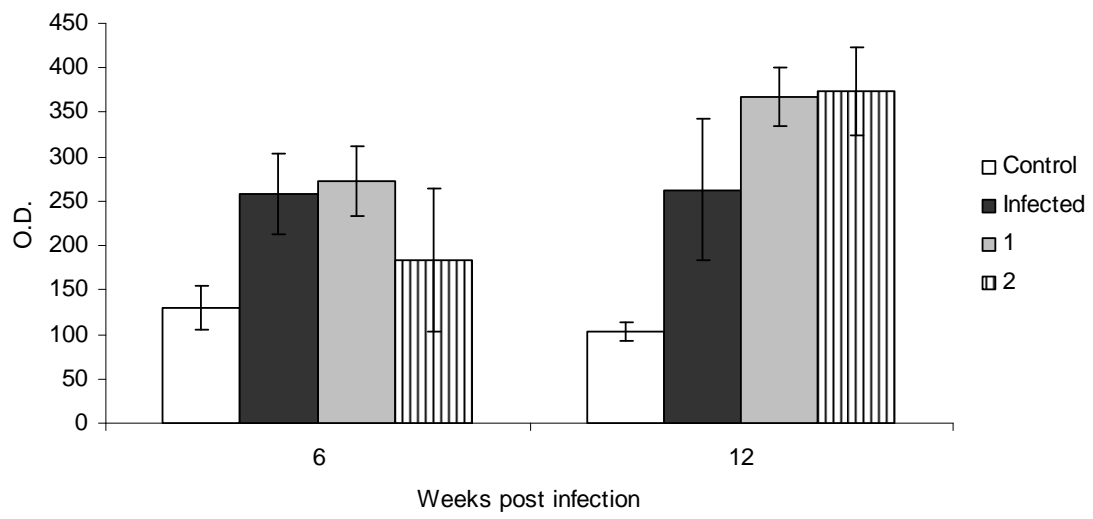
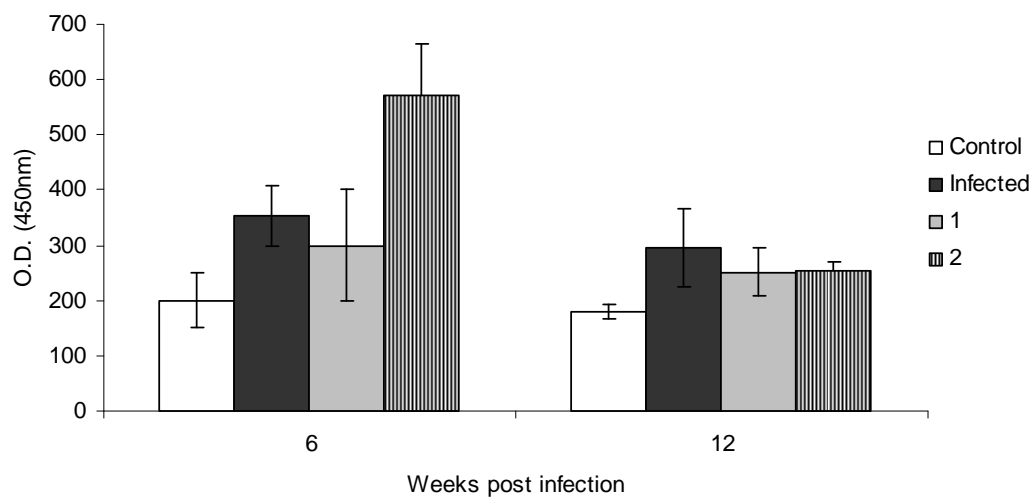


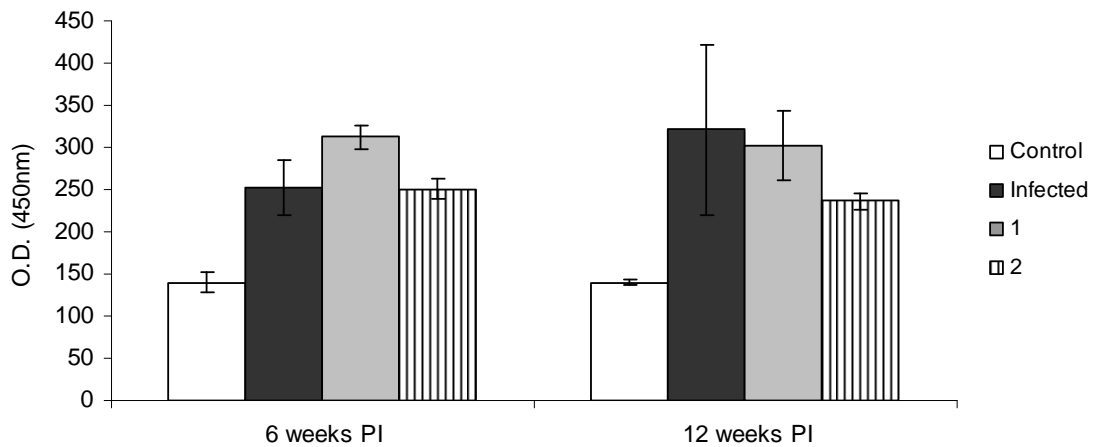
Figure 6. Cytokine mRNA expression in lymph node cells from *Leishmania*-infected mice. Total mRNA of lymph node cells was extracted for the measurement of cytokine expression by RT-PCR at 10 weeks post-infection. Densitometric analyses were performed and TGF-beta, IL-4 and IFN-gamma transcripts were quantified. (A) mRNA was normalized to the constitutive expression of GAPDH. mRNA expression is shown for untreated infected mice (black bars) and infected animals orally treated with compound 2.

A



B





C

Figure 7. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for serum antibodies to soluble antigen of *Leishmania amazonensis*. Serum from uninfected mice and infected mice treated with compounds **1** and **2** or left untreated were collected at 6 and 12 weeks post-infection. Levels of (A) IgG1, (B) IgG2a and (C) IgG3 are shown. The data are presented as the mean \pm S.D. for each group (* $P < 0.05$).

DISCUSSÃO

Discussão

A leishmaniose é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Contudo, o tratamento de primeira escolha introduzido nos anos 40 ainda é utilizado. Os efeitos colaterais destes tratamentos são diversos e as drogas alternativas também são bastante tóxicas. A resistência do parasito ao tratamento é outro fator crítico à terapêutica (Croft & Coombs, 2003, Seifert, 2011). Pouco tem se avançado na busca de novos compostos. Tudo isso denota a importância de estudos que favoreçam o desenvolvimento de novos fármacos.

Os compostos heterocíclicos acil-hidrazonas pirazólicas apresentam estrutura com diversificada atividade farmacológica e por isso despertam grande interesse na sua aplicação em estudos no tratamento das leishmanioses. Anteriormente, a série 1 - (4-X-fenil)-N' - [(4-Y-fenil) metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazidas foi investigada sobre os seus efeitos inibitórios contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*, além de seu efeito tóxico direto em macrófagos de mamíferos. Foi demonstrado seu potencial leishmanicida comparado com drogas de referência, como o cetoconazol, a pentamidina, o alopurinol e o benzonidazol. (Bernardino e cols., 2006).

No presente estudo, os compostos da série 1 - (4-X-fenil)-N' - [(4-Y-fenil) metileno]-1*H*-pirazol-4-carbohidrazidas, foram analisados em relação quanto ao seu potencial mecanismo de ação, quanto a sua atividade dos compostos precursores de sua síntese, sua eficácia terapêutica, toxicidade e sua influência sobre o sistema imunitário do hospedeiro mamífero.

Para aprofundar o conhecimento sobre estas carbohidrazidas e investigar a possível contribuição farmacofórica do grupo imino (-N = C-) na sua estrutura, foram selecionados os dois compostos finais mais ativos (FC1 e FC2) em promastigotas de *L. amazonensis* e três precursores (P1, P2 e P3) e que foram avaliados quanto à sua atividade *in vitro* contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

O presente trabalho demonstrou, que estes precursores (P1, P2 e P3), com uma subunidade de hidrazina (-N = N-) foram inativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em contraste, resultados vistos anteriormente com compostos finais FC1 e FC2, que tem uma subunidade básica imino (R₂C = NR), mostraram inibição do crescimento de promastigotas (Bernadino e cols., 2006). Este resultado ressalta a importância do grupamento imino, que pode funcionar como uma ancora hidrofóbica que potencialmente se ligaria a proteases dos parasitos, resultado que corrobora aqueles obtidos por Li e colaboradores (1996). Aqui se reforça a importância deste grupamento em sua ação antiparasitária. Entretanto, não se pode atribuir somente a esse grupamento a atividade dos compostos, isso porque foi observado que existem diferenças com relação à estrutura-atividade entre os derivados 1*H*-pirazol-4-carbohidrazidas de acordo com a natureza e a posição do substituinte na molécula, e que essas diferenças podem promover variações nas funções biológicas. Diferentes substituintes em diferentes posições podem conferir mudanças no caráter eletrofílico da função imínica. Essas diferenças na atividade foram observadas *in vivo* e *in vitro*.

Foi observada uma atividade leishmanicida significativa dos derivados carbohidrazida (FC1 e FC2) e, curiosamente de seus precursores, quando foi investigado o efeito desses em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Os resultados aqui obtidos demonstram que ambos, com ou sem grupos imino, podem estimular a atividade leishmanicida de macrófagos, pelo aumento de NO. Resultado que corrobora com os resultados *in vivo*, onde também foi observado o

aumento da produção de NO em linfonodos drenantes da lesão e células do baço tratados com os derivados carbohidrazidas pirazólicas, podendo se estabelecer uma associação com a evolução da doença. Entretanto, esse resultado poderia ser diretamente relacionado com a capacidade de liberação de NO pela própria molécula (Schonafinger, 1999), possibilidade descartada pelos experimentos realizados, concluindo-se que estes compostos não constituem uma classe de doadores de NO.

Estudos com a molécula de NO na relação leishmania/hospedeiro são de grande importância. O NO é reconhecido como uma molécula efetora potente contra a *Leishmania*. (Mauels & Ransijn, 1997). O NO produzido por macrófagos humanos e caninos está envolvido na eliminação da forma intracelular da *Leishmania* (Assreuy e cols., 1994). Inclusive, tem sido investigada a supressão da iNOS pelo parasito, como mais um mecanismo de escape (Mukbel e cols.; 2007). Embora tenha sido relatado, que leishmanias podem sobreviver apesar da exposição à agentes tóxicos oxidantes nitrosoativos durante a fagocitose pelas células do hospedeiro (Genestra e cols, 2008). Macrófagos infectados *in vitro* por *Leishmania* foi demonstrada a diminuição da produção de NO (Proudfoot e cols. 1996). Esses dados mostram a importância deste radical na infecção por *Leishmania*. Tem sido bem estabelecido em modelos murinos que, em macrófagos ativados, o aumento da atividade leishmanicida está correlacionada com o aumento da produção de NO (Mauel e cols, 1991). Neste sentido, compostos intermediários que não foram eficazes contra as formas promastigotas, potencialmente poderiam reduzir a infecção em macrófagos através da indução da produção de NO. Sugerindo que os compostos intermediários, os que possuem uma subunidade hidrazina, podem atuar inibindo a infecção de macrófagos através da sua ativação. Em relação aos compostos finais, além da ativação do macrófago, os grupos de aza-vinílico da molécula pirazol-carbohidrazidas, possivelmente, funcionam como âncoras hidrofóbicas em sítios ativos dentro do protozoário (Aguirre e cols, 2005), tendo uma ação antiparasitaria direta.

Uma das hipóteses para a atividade leishmanicida destes compostos é a presença do anel pirazol nas suas estruturas, assim como o cetoconazol e o benzimidazol. O anel pirazol tem conhecida atividade como inibidor da 14- α desmetilase, importante enzima na via de síntese do ergosterol, lipídio de

membrana presente em protozoários e fungos (Beach e cols., 1988). Esses compostos poderiam atuar por esta via, causando danos na membrana celular do parasito. No caso de promastigotas de *L. amazonensis*, o mecanismo de ação não parece estar relacionado com a biossíntese de ergosterol, uma vez que não foi observada alteração na concentração de ergosterol em presença destes compostos.

Vários modelos animais são utilizados em estudos experimentais de leishmaniose cutânea, entretanto o custo na manutenção de algumas espécies é muito elevado, como por exemplo, a manutenção de primatas (Amaral e cols. 1996). Camundongos produzidos em laboratório representam modelos experimentais capazes de reproduzir parcialmente alguns dos eventos clínico-patológicos da doença humana, assim como determinadas respostas do hospedeiro à infecção por *Leishmania* (Mauel & Behin 1987).

Os trabalhos terapêuticos sobre leishmaniose cutânea no homem (Ribeiro de Paula e cols., 2003) e leishmaniose cutânea experimental murina geralmente não apresentam padronização quanto ao esquema de tratamento e aos seus critérios de cura, o que dificulta a compreensão destes resultados. A escolha de um modelo adequado, que melhor represente a diversidade de fatores presentes na infecção e sua similaridade com a doença humana, é de extrema importância. Os camundongos da linhagem CBA foram escolhidos porque esta linhagem é um modelo intermediário quanto à suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Os camundongos da linhagem BALB/c são extremamente suscetíveis à infecção associada a esta espécie, com a disseminação da doença, sem cura e morte (Fournet e cols. 1996). Estudos envolvendo testes de quimioterápicos em infecção por *L. amazonensis*, indicam a linhagem CBA como a mais adequada, já a linhagem BALB/c seria um modelo aplicável aos estudos da leishmaniose visceral e/ou cutânea difusa (Carvalho, 2005).

Neste estudo, em modelo de infecção murina por *L. amazonensis*, ambos os derivados carbohidrazidas pirazólicas mostraram diferenças em relação ao controle da infecção. Uma observação interessante deste experimento foi a eficácia destes compostos, pela via oral para leishmaniose cutânea, o que indica que os derivados acil-hidrazonas pirazólicas tiveram uma absorção satisfatória no trato gastrointestinal. Os atuais fármacos de primeira escolha são de uso parenteral, o que dificulta o tratamento, seja por sua aplicação necessitar de

treinamento ou pela desistência do paciente devido ao incômodo e/ou dor. Mais recentemente tem sido utilizada a miltefosina (via oral) na Colômbia e Guatemala para o tratamento da LTA (Croft e cols.; 2006, Soto & Berman, 2006) e na Índia para LV (Sudar e cols., 2005). O cetoconazol, conhecido e estabelecido antifúngico, também tem sido usado como alternativa terapêutica de administração oral, com eficácia comparável ao antimonial pentavalente (Pentostan) de via parenteral (Saenz e cols., 1990, Salmanpour e cols., 2001). Foi demonstrado que os derivados carbohidrazidas pirazólicas são capazes de diminuir o tamanho das lesões, a carga parasitária e o infiltrado celular nas lesões induzidas pela infecção por *L. amazonensis*. Além disso, uma grande vantagem destes compostos é não apresentarem toxicidade renal e hepática, distúrbio hematológico e nem alterações na massa corpórea do camundongos tratados.

Em um estudo anterior, os derivados carbohidrazidas 1 e 2 (NO₂-Cl) foram mais ativos contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, que o composto 3 (NO₂-Br), reiterando que os substituintes no anel benzeno podem influenciar fortemente a atividade terapêutica (Bernardino e cols, 2006). Entretanto, o composto 3, com baixa atividade leishmanicida *in vitro* para a forma promastigota (Bernardino e cols., 2006), mostrou no presente trabalho, um efeito terapêutico quando testado em modelo murino. Esses dados indicam, mais uma vez, que os derivados carbohidrazidas interagem com o organismo hospedeiro.

A análise do perfil celular da lesão da pata de animais infectados e sem tratamento mostrou principalmente a presença de macrófagos vacuolizados, repletos de amastigotas, o que foi muito diminuído nos animais tratados. Foram observados também neutrófilos nas lesões durante esta fase da infecção por *L. amazonensis*, e camundongos tratados mostraram uma redução no número de células infiltrando, com exceção daqueles tratados com o composto 3. E também foi observado que o controle infectado apresentou um aumento da percentagem de neutrófilos no sangue periférico, o que não foi observado quando os animais infectados foram tratados com os derivados carbohidrazidas 1 e 2. Esses dados reforçam uma relação dos compostos com o hospedeiro.

Alguns estudos citam principalmente propriedades analgésicas, antiinflamatórias e anti-trombóticas de compostos com este grupamento (Matheus e cols.,1991, Ribeiro e cols., 1997, Barreiro e cols., 2002). Por outro lado, o grupamento pirazol também apresenta uma diversidade de propriedades

farmacológicas. Um dos mecanismos de ação proposto para explicar alguns dos efeitos biológicos dos derivados carbohidrazidas seria a inibição da enzima 5-lipooxigenase (5-LO) (Matheus e cols., 1991, Barreiro e cols., 2002). A 5-LO é uma enzima abundantemente expressa em macrófagos, envolvida na cascata oxidativa do ácido araquidônico (AA), que leva, a partir deste, à formação de leucotrienos. Os leucotrienos são fatores, que entre outras, têm funções vasodilatadora e quimiotática para neutrófilos e outras células sanguíneas (Goetzsl & Pickett, 1980; Smith & Ford-Hutchinson, 1980; Pettipher e cols., 1993). Logo, poderia se supor que os derivados carbohidrazidas poderiam atuar inibindo a 5-LO, impedindo a formação de leucotrienos e assim diminuindo a migração, principalmente, de neutrófilos ao local da lesão. Segundo Goulet e colaboradores (1994), na ausência de leucotrienos, outros produtos do metabolismo do AA não compensariam sua função de manter os neutrófilos no sítio de inflamação.

Por sua vez os neutrófilos possuem um papel importante no estabelecimento da infecção por *Leishmania*, chegam primeiro no sítio de infecção e são o primeiro contato com parasito (Bogdan e cols., 1996), além de serem os principais componentes da imunidade inata na infecção por *L. major* (Beil e cols., 1992; Van Zandbergen e cols. 2002). O papel destas células na resistência/suscetibilidade às leishmânias ainda não é bem compreendido. Em camundongos suscetíveis BALB/c, a infecção por *L. major* é caracterizada por um processo inflamatório agudo com a permanência do elevado número de neutrófilos, enquanto em camundongos C57BL/6, que são resistentes a essa infecção, isso não ocorre (Beil e cols., 1992). Interessantemente, neutrófilos podem internalizar promastigotas, os parasitos sobrevivem, porém não se multiplicam e permanecem na forma promastigota (Muller e cols., 2001; Laufs e cols., 2002; Van Zandbergen e cols., 2004). Os neutrófilos parasitados são ingeridos por macrófagos, servindo de “vetor” do parasito, facilitando a infecção, o que foi chamado de efeito “cavalo de tróia”, porque protegidos nos neutrófilos, os parasitos não interagem com receptores de superfície dos macrófagos, logo estes não são ativados. Ou então, porque neutrófilos em apoptose induzem a produção de TGF- β , citocina que inibe a ativação do macrófago e direciona a resposta imunitária ao perfil Th2, perfil de suscetibilidade (Van Zandbergen e cols., 2004). Segundo Tacchini-Cottier e colaboradores (2004), neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de lesões nos camundongos suscetíveis BALB/c. Desta forma,

os neutrófilos teriam seu papel relacionado à suscetibilidade. Assim, a diminuição de neutrófilos periféricos e no local da lesão em animais, infectados e tratados com os compostos testes, em relação àqueles infectados e sem tratamento, poderia indicar um efeito antiinflamatório destes compostos, que é benéfico para a resolução da lesão.

Entretanto, estes compostos não são capazes de modular diretamente a expansão de qualquer subconjunto específico de linfócitos no linfonodo. Semelhante a outro estudo (Cardoso e cols., 2010), nossos resultados demonstraram uma expansão de células B no linfonodo de drenagem no local da infecção e em lesões cutâneas de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis*. Contudo, o tratamento diminuiu a percentagem de células B presente na derme de camundongos infectados, mas não nos linfonodos. Alguns estudos apontam que as células B desempenham um papel negativo importante na leishmaniose (McMahon-Pratt & Alexander, 2004), especialmente no *priming* de células CD4 + T específicas (Wanasen e cols., 2008).

O perfil de infecção por *L. amazonensis*, ainda não é bem estabelecido. Segundo Lemos de Souza e colaboradores (2000), em camundongos CBA suscetíveis a infecção por *L. amazonensis*, se observou a produção de IL-4 e IL-10, porém não de IFN- γ , em contraste com camundongos da mesma linhagem infectados com *L. major* que produzem IFN- γ e IL-10, mas não IL-4. Neste estudo, a expressão das citocinas IL-4, TGF- β e IFN- γ foram analisadas. A expressão de TGF- β e IFN- γ não mostraram-se diferentes, porém a expressão de IL-4 foi menor em camundongos tratados com o composto 1. A citocina IL-4 pode ser considerada um fator de susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* (Guimarães e cols., 2006), pois está intrinsecamente relacionada ao envolvimento de células B na resposta imune à infecção por *Leishmania*, assim como seus anticorpos. Kima e colaboradores (2000), mostraram que camundongos JhD, que são incapazes de produzir anticorpos apresentaram um tamanho de lesão reduzido. Além disso, camundongos sem a cadeia FcR- γ mostraram redução da inflamação (Barnes e cols., 2002).

Citocinas secretadas por linfócitos T também estão envolvidas na ativação de células B, induzindo anticorpos com isotipos diversos. A IL-4 induz a produção de anticorpos IgE e IgG1, perfil de susceptibilidade, e inibe a produção de IgG2a,

IgG2b e IgG3. Por outro lado a presença de IFN- γ estimula a produção de IgG2a e IgG3, relacionados ao perfil de cura (Coffman e cols. 1988).

As subclasses de anticorpos IgG anti-*Leishmania* mostram um interessante padrão de respostas Th1/Th2, redirecionando a resposta imune humoral em camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com os derivados 1 e 2 das carbohidrazidas. Este fator pode ser considerado bastante importante, pois anticorpos específicos anti-*Leishmania* podem aumentar a captação de parasitos por macrófagos e células dendríticas e modular suas funções (Prina e cols., 2004). Entretanto, foi descrito (Deak e cols., 2010) a ativação de células B como uma característica importante da patogênese da leishmaniose, o que pode significar um alvo para intervenção terapêutica. As citocinas envolvidas na ativação de células B e as subclasses de anticorpos envolvidos, podem ser cruciais na evolução da patogênese.

O conjunto destes resultados indicam uma tendência para uma interação dos compostos com as células do sistema imune do organismo hospedeiro, inclusive porque esses compostos foram desenvolvidos agregando moléculas com diversas atividades biológicas conhecidas. Porém, alguns efeitos podem ser devido a ação leishmanicida dos compostos. Quando se diminui a quantidade de parasitos, se diminui a quantidade de estímulos ao sistema imunitário hospedeiro, e conseqüentemente pode-se alterar sua resposta. Ainda assim, os efeitos sobre o NO foram diretos ao hospedeiro, inclusive na ausência da infecção. Os dados presentes neste estudo podem conferir um perfil de antiparasitário e também um caráter imunorregulador a estes compostos.

Neste estudo foi confirmada a atividade leishmanicida de novas 1H-pirazol-4-carbohidrazidas e que o grupo imino presente nos produtos finais pode ser o principal responsável por esta atividade. O aumento da produção de NO em macrófagos, sugere uma atividade dos compostos sobre as células hospedeiras, que pode ser corroborado pela atividade de compostos precursores em amastigotas intracelulares, mas não em promastigotas. Extrapolando os resultados *in vitro* para o modelo *in vivo*, podemos correlacionar as alterações no local da lesão e aquelas relacionadas com o sistema imunitário com a interação dos compostos com o hospedeiro. Foi demonstrado que os camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* e tratados com os derivados carbohidrazidas

tinham lesões cutâneas menores e mostrou estruturas intactas da epiderme e derme com pouco infiltrado inflamatório.

Em termos gerais, a resolução da doença depende do sistema imunitário, onde seu papel é resumidamente ativar macrófagos infectados para eliminar os parasitos intracelulares. As carboidrazidas exercem importantes efeitos terapêuticos através da sua ação leishmanicida, bem como através da imunomodulação, com potencial para seu uso na quimioterapia das leishmanioses.

CONCLUSÕES

5 - Conclusões

- Os compostos precursores das carbohidrazidas não apresentaram atividade sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Este dado ressalta a importância do grupamento imino presente nos compostos finais, que pode ser responsável pela atividade leishmanicida, porém os compostos derivados e intermediários foram ativos na forma amastigota intracelular de *Leishmania amazonensis*;
- Os compostos derivados carbohidrazidas pirazólicas (Br-NO₂ e NO₂-Cl) foram efetivos na redução da progressão da lesão e da carga parasitária do linfonodo drenante da lesão causada pela *L. amazonensis* em camundongo CBA;
- Os grupos de animais, infectados e não-infectados, tratados com os compostos derivados carbohidrazidas pirazólicas (Br-NO₂ e NO₂-Cl) não apresentaram toxicidade renal e hepática;
- Ambos os compostos induziram um aumento da produção de NO *in vitro* e *in vivo*.
- Os compostos Br-NO₂ e NO₂ – Cl, promoveram uma redução do número de polimorfonucleares e linfócitos no infiltrado inflamatório da lesão dos camundongos infectados com *L. amazonensis*;

-
- O conjunto de resultados apresentados indica que os derivados carboidrazidas pirazólicas (Br-NO₂ e NO₂-Cl) atuam na imunomodulação da infecção de camundongos com *Leishmania amazonensis*, o que confirma a influencia destes sobre a célula hospedeira como um fator benéfico na resolução da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R,

-
- Molina R, Moreno. J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:298-319.
- Amaral VF, Ransatto VAO, Conceição-Silva F, Molinaro E, Ferreira V, Coutinho SG, McMahon-Pratt D, Grimaldi Jr G. The Asian *Rhesus macaques* (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996; 82: 4-44.
- Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 1993; 61:2952-9.
- Agostoni C, Migliorini D, Dorigoni N, Malfitano A, Scaglia M. Genital ulcer in an AIDS patient with disseminated leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17:813-4.
- Aguirre G, Boiani L, Boiani M, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Porcal W, Denicola A, Piro OE, Castellano EE, Sant'Anna CM, Barreiro EJ. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: quantitative structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13: 6336-46.
- Ashford RW, Craig PS, Oppenheimer SJ.. Polyparasitism on the Kenya coast. 1. Prevalence and association between parasitic infections, *Ann Trop Med Parasitol.*; 1992: 86:671-9.
- Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S.. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol.* 1994; 24:672-6.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004;119: 238-58.
- Balana-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of

leishmaniasis. *Gen Pharmacol.*; 1998; 30:435-43.

Barão SC, Giorgio S. Efficacy of 8-bromoguanosine against murine cutaneous leishmaniasis induced with *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*. 2003; 49:159-62.

Barnes N, Gavin AL, Tan PS, Mottram P, Koentgen F, Hogarth PM. FcγRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity*. 2002 Mar;16(3):379-89.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, ... Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44:536-46.

Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:3442-6.

Barreiro EJ, Fraga CAM, Miranda Rodrigues ALPCR. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Quim. Nova* 2002; 25: 129-148.

Basselín M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol.*; 1997; 85:274-82.

Bates, PA Rogers. Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 15:53-8.

Beach DH, Goad LJ, Holz GG Jr. Effects of antimycotic azoles on growth and

-
- sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1988 ;31:149-62.
- Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 1992; 52:135-42.
- Berger BJ, Fairlamb AH. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology.* 1992;105:71-8
- Bernardino AMR, Gomes AO, Charret KS,. Freitas ACC, Machado GMC,. Canto-Cavaleiro MM, Leon LL.& Amaral VF. Synthesis and leishmanicidal activities of 1-(4-X-phenyl)-N`-(4-Y-phenyl)methylene]-1H-pyrazole-4-carbohydrazides. *Eur J Med Chem.* 2006; 41:80-7.
- Bertholet S, Mauel J. Human monocytic U937 cells transfected with human hepatic inducible nitric oxide synthase exhibit leishmanicidal activity. *J Leukoc Biol.* 2000; 67:34-9
- Boeck P, Bandeira Falcão CA, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem.* 2006; Mar 1;14(5):1538-45.
- Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M.. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8:517-25.
- Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health.* 2001; 6:928-34.
- Busse I, Preisfeld A. Discovery of a group I intron in the SSU rDNA of *Ploetia costata* (Euglenozoa). *Protist.* 2003; 154: 57-69.
- Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low

seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol.* 2010; 174: 37-42.

Carvalho AV. Trabalho monográfico de bacharelado em ciências biológicas apresentado na Universidade Federal Fluminense: Padronização de modelo murino para ensaios terapêuticos de infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2005.

Castro-Pinto DB, Echevarria A, Genestra MS, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004; 19(1):57-63

Castro-Pinto DB, Lima EL, Cunha AS, Genestra M, De Leo RM, Monteiro F, Leon LL. *Leishmania amazonensis* trypanothione reductase: evaluation of the effect of glutathione analogs on parasite growth, infectivity and enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2007; 22:71-5.

Chan C, Yin H, Garforth J, McKie JH, Jaouhari R, Speers P, Douglas KT, Rock PJ, Yardley V, Croft SL, Fairlamb AH. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J Med Chem.* 1998 Jan 15;41(2):148-56. Erratum in: *J Med Chem* 1998; 41: 4910.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44:499-529.

Chang KP, Bray RS, Leaney AJ. Infection of mouse macrophages in vitro by sandfly-derived promastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75:475-6.

Charest H, Matlashewski G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:2975-84.

-
- Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84:221-5.
- Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102:5-28.
- Coombs GH, Craft JA, Hart DT. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. *Mol Biochem Parasitol.* 1982; 5:199-211
- Coombs GH, Mottran JC. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology.* 1997; 114: 61-80.
- Costa JM, Moraes MS, Saldanha AC, Barral A, Burattini MN. Diabetes mellitus associated with pentamidine isethionate in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995; 28:405-7
- Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. . Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6):e11153
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123:399-410.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003; 19:502-8.

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 319-42.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in and leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:111-26.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36:2633-6.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(2):255-60.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006; Mar;123:357-88.

Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP, Falqueto A, Grimaldi G Jr. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol.* 2001; 190:57-60.

Davidson R N, den Boer M, Ritmeijer k. Paramomycin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2009; 103: 653-60.

Davila, A. M. and K. M. Tyler "Combating Kinetoplastid diseases." *Kinetoplastid Biol Dis* 2002; 1: 6.

Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD, McMahan-Pratt D. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 1355-68.

-
- Dell KR, Engel JN. Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994; 64:283-92.
- Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003; 97 :3-15.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27: 305-18
- Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan.. *J Immunol*. 1992; 149:3008-15.
- Dietze R, Fagundes SM, Brito EF, Milan EP, Feitosa TF, Suassuna FA, Fonschiffrey G, Ksionski G, Dember J. Treatment of kala-azar in Brazil with Amphotericin B cholesterol dispersion) for 5 days. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995; 89:309-11.
- Erhlich P.. On the partial functions of the cell. In the Collected papers of Paul Erhlich, 3 (1960) .(ed. Himmelweit, F.) p. 183-194 London pergamon Press. 1909
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra. A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991; 147:3815-22.
- Fonseca OJ, Lacaz Cda S, Machado Pde A. Immune-allergic survey in Amazonas. Preliminary results. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1973 Nov-Dec;15: 409-16.
- Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A, Torres De Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania*

amazonensis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:2447-51.

Frézard R, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009; Jun 30;14(7):2317-36.

FUNASA. Capturado da página da Web: www.funasa.gov.br, em dezembro de 2006

Furtado D. Clinical and experimental trials of imipramine (tofranil). *J Med (Oporto)*. 1960; 43:45-9.

Gadelha e cols. Tratamento de Leishmaniose tegumentar Americana com a pentamidina. Esquema em dose única venosa. *An. Bras. Dermatol.*, 1990; 65: 198-200.

Genestra M, Soares-Bezerra RJ, Gomes-Silva L, Fabrino DL, Bellato-Santos T, Castro-Pinto DB, Canto-Cavalheiro MM, Leon LL. In vitro sodium nitroprusside-mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Cell Biochem Funct*. 2008; 26: 709-17.

Ghosh S, Goswami S, Adhya S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochem J*. 2003 ;369:447-52.

Goetzl EJ, Pickett WC. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol*. 1980;125:1789-91.

Gomes DC, Muzitano MF, Costa SS, Rossi-Bergmann B. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2010; 137(4):613-8.

Gomes AO 2001. *Dissertação de Mestrado*: Síntese de Pirazóis-4-substituídos para avaliação tripanocida – UFF.

-
- Gontijo B, de Carvalho M de L. 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003. 36:71-80.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Apr;8(4):419-33.
- Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM, Koller BH.. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:12852-6.
- Gramiccia, M., Gradoni, L.,. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 2005; 35: 1169–1180.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nancy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in INF- γ – stimulated macrophage by induction of TNF- α . *Infect Immun.* 1993; 61:689-98.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, D McMahon-Pratt.. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1989; 41: 687-725.
- Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: An overview, p. 73-118. In 3d. T. Sun (ed.), *Progr. Clin. Parasitol* vol 2. Field, Wood Med. Publ, Inc., New York. 1991
- Grimaldi Jr G & Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol* 1993; 6: 230-260.
- Guimarães KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra RM, Costa AD, Oliveira AS, Calabrese KS, Cardoso FO, Souza CS, do Vale TZ, Gonçalves da Costa SC, Abreu-Silva AL. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005; 131: 305-9.

-
- Hannaert V, Bringaud F, Oppendoes FR, Michels PA. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003; 2: 11.
- Hart DT, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol.* 1982; .54:397-409.
- Hassan HF, Mottram JC, Coombs GH. Subcellular localization of purine-metabolising enzymes in *Leishmania mexicana mexicana*. *Comp Biochem Physiol B.* 1985; 81:1037-40.
- Hernández-Ruiz J, Becker I. [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud Publica Mex.* 2006; 48: 430-9.
- Herwaldt BL. Miltefosine--the long-awaited therapy for visceral leishmaniasis? *N Engl J Med.* 1999; 341: 1840-2.
- Hoare CA. The Trypanosomas of mammals: A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972; 60-70
- Ji J, Sun J, Soong L.. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 2003; 71: 4278–4288.
- Jones DE, Buxbaum, LU, Scott P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 2000; 165, 364–72.
- Jones DE, Ackermann MR, Wille U, Hunter CA, Scott P.. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect. Immun.* 2002; 70 2151–2158.

Kane MM, Mosser DM. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7:26-31.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jul 11;9(8):604-15.

Kim DH, Chung HJ, Bleys J, Ghohestani RF. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e381 (2009).

Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D.,. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 2000; 191:1063–8.

Klingbeil MM, Englund PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 4333-4.

Korolkovas A. *Dicionário terapêutico Guanabara*, Edição 1999/200, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

Korolkovas A. *Essentials of medicinal chemistry*, 2° ed., New York: Wiley-Interscience, 1988. 135-139.

Kulshrestha A, Singh R, Kumar D, Negi NS, Salotra P. Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6):2916-21.

Lainson R , Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120. In Peters W and Killick-Kendrick R (ed.), *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. I. Academic Press, London. 1987

Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W,

-
- Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 2002; 70:826-35.
- Leander BS. Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends Microbiol.* 2004; 12: 251-8.
- Lemos de Souza V, Ascensão Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2000; 2: 1807-15.
- Leon LL, Barral A, Machado GMC, Grimaldi Jr G. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationships with distinct clinical forms of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87: 229-234.
- Li R, Chen X, Gong B, Selzer PM, Li Z, Davidson E, Kurzban G, Miller RE, Nuzum EO, McKerrow JH, Fletterick RJ, Gillmor SA, Craik CS, Kuntz ID, Cohen FE, Kenyon GL. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 1996; 4:1421-7.
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV e cols. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 34, n. 3, 2001.
- Maarouf M, Adeline MT, Solignac M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite.* 1998; 5:167-73.
- Machado GM, Leon LL, Castro SL.. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102:73-77.

-
- Magill AJ, Grogl M, Gasser RA Jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med.* 1993; 328:1383-7
- Manandhar KD, Yadav TP, Prajapati VK, Kumar S, Rai M, Dube A, Srivastava ON, Sundar S. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(2):376-80.
- Marty, P., Rosenthal, P. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2002; 3: 1101-8..
- Mauel J, Behin R. Immunity: clinical and experimental, 3d. p. 731-791. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. II. Academic Press, London. 1987
- Mauël J, Corradin SB, Buchmüller Rouiller Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. *Res Immunol.* 1991; 142: 577-80; discussion 593-4.
- Mauël J, Ransijn A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol.* 1997; 87: 98-111.
- Matheus ME, Oliveira LF, Freitas AC, Carvalho AM, Barreiro EJ. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. *Braz J Med Biol Res.* 1991; 24:1219-22.
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev.* 2004. 201:206-24.
- Meade JC, Glaser TA, Bonventre PF, Mukkada AJ. Enzymes of carbohydrate metabolism in *Leishmania donovani* amastigotes. *J Protozool.* 1984; 31:156-61.

-
- Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today*. 2000; 16: 482-9.
- Minodier P, Noel G, Blanc P, Uters M, Retornaz K, Garnier JM. Management of cutaneous leishmaniasis in adults and children. *Med Trop* 2005; 65:487-95.
- Mollace V, Muscoli C, Iannone M, Palma E, Rotiroti D, Romeo F, Nistico R, Salvemini D. Dexamethasone inhibits the inducible bioconversion of glyceryl trinitrate to nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39:544-51.
- Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*. 2006; 52(3):130-6.
- Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J Immunol*. 1993; 150:4457-65.
- Morris, J. C., M. E. Drew, M. M. Klingbeil, S. A. Motyka, T. T. Saxowsky, Z. Wang and P. T. Englund . "Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium." *Int J Parasitol*. 2001; 31: 453-458.
- Mosmann TR, Cherwinsky H, Bond MW, Giedlin MA , Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol*. 1986; 136: 2348.
- Mosser DM, Brittingham A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitol*. 1997; 115:9-23.
- Mosser DM, Vlassara H, Edelson PJ, Cerami A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation end products. *J Exp Med*. 1983; 165:140-5.

-
- Mottram JC, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: subcellular distribution of enzymes in amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol*. 1985; 59: 265-74
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 ;76:669-75.
- Muller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, Laskay T. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*.190:73-6.
- Murray HW. 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *J Exp Med*. 153:1690-5.
- Murray HW, Delph-Etienne S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 2000; 68:288-93.
- Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1985; 134:1982-8.
- Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. 2006;67:2071-7.
- Nakayama H, Loiseau PM, Bories C, Torres de Ortiz S, Schinini A, Serna E, Rojas de Arias A, Fakhfakh MA, Franck X, Figadère B, Hocquemiller R, Fournet A. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4950-6.

-
- Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 ; 105(5):298-300
- Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF, Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infe Dis* 1992; 165: 528-34.
- Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology.* 1983; 87: 7-13.
- Olliaro PL, Bryceson AD. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today.* 1993; 9:323-8.
- OMS Organização Mundial de Saúde / WHO/CID/Leish. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of Control of Tropical Diseases leishmaniasis control latest epidemiological data. Disponível em World Wide Web http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html >2007
- Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 1977 Aug 15;80(2):360-4.
- Opperdoes FR. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:127-51.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments.. *Drug Resist Updat.* 2004; 7:257-66.
- Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide

production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res.* 1999; 29:122-7.

Passos VM, Falcao AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EG, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1993; 88:103-10

Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol.* 2008 20; 158: 239-55.

Peter ME, Dhein J, Ehret A, Hellbardt S, Walczak H, Moldenhauer G, Krammer PH. APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines. *Int Immunol.* 1995; 7: 1873-7.

Pettipher ER, Salter ED, Breslow R, Raycroft L, Showell HJ. Specific inhibition of leukotriene B4 (LTB4)-induced neutrophil emigration by 20-hydroxy LTB4: implications for the regulation of inflammatory responses. *Br J Pharmacol.* 1993; 110:423-7.

Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, Schirmeister T, Moll H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2439-47.

Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 751-8.

Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., Antoine, J. C., 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of

Leishmania amazonensis: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell. Sci.* 117, 315–325.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:10984-9.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97:17-28.

Rashid JR, Wasunna KM, Gachihi GS, Nyakundi PM, Mbugua J, Kirigi G. The efficacy and safety of ketoconazole in visceral leishmaniasis. *East Afr Med J.* 1994; 71:392-5

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 2007; 581–596.

Ribeiro IG, Barreiro EJ, Fraga. CAM . Síntese de novos derivados Imidazo[1,2-a]piridinil-N-alkilacilidrazônicos. In: *20a Reunião Anual da SBQ, 1997*, Poços de caldas. Resumos-20a Reunião Anual da SBQ. SP: SBQ, 1997.

Ribeiro de Paula, CD, Sampaio JHD, Cardose DR, Sampaio RNR. Estudo comparativo de eficácia de isotianato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mg SbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003; 36: 365-371.

Ritting MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 2000; 16:292-7.

Rodrigues MLO. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst Med Trop.*,

1999; 41: 33-37.

Robinson RF, Nahata MC. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin *B.J Clin Pharm Ther.* 1999; 24:249-57.

Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol.Today.* 1991; 12: 256- 257.

Rostom SA, Shalaby MA, El-Demellawy MA. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HCV agents. *Eur J Med Chem.* 2003; 38:959-74.

Saf'janova VM. Classification of the genus *Leishmania* Ross. In the *Leishmania. Leishmaniasis.* Academy of sciences, USSR all Union Society of *Protozoologist.* 1982; 7: 95-101.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:845-58.

Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology.* 1994; 108: 55-62.

Saenz RE, Paz H, Berman JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med.* 1990; 89:147-55.

Salmanpour R, Handjani F, Nouhpisheh MK. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dermatolog Treat.* 2001; 12 :159-62

Schönafinger K. Heterocyclic NO prodrugs. *Farmaco.* 1999; 54: 316-20.

-
- Simpson AG, Roger AJ. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol.* 2004 7;14: R693-6.
- Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992; 266: 68-71, 74-7.
- Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22:380-7.
- Seifert K. Structures, Targets and recent approaches in Anti-Leishmanial drug discovery and development. *The Open Medicinal Chemistry.* 2011; 5, 31-39.
- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91:671-83.
- Smith MJ, Ford-Hutchinson AW, Bray MA. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J Pharm Pharmacol.* 1980; 32:517-8. Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992; 266:68-71.
- Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 1997; 158: 5374-83.
- Soto J Berman J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100:34-40.
- Sundar S, Agrawal N, Arora R, Agarwal D, Rai M, Chakravarty J. Short-course paromomycin treatment of visceral leishmaniasis in India: 14-day vs 21-day treatment. *Clin Infect Dis.* 2009 Sep 15;49(6):914-8.
- Sundar S, Kumar K, Chakravarty J, Agrawal D, Agrawal S, Chhabra A, Singh V .

-
- .Cure of antimony-unresponsive Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis with oral miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005; 100:698-700.
- Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis.. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2001; 190:89-92.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray HW. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.* 1998;352:1821-3.
- Tacchini-Cottier F, Allenbach C, Otten LA, Radtke F. Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *Eur J Immunol.* 2004; 34:1588-96.
- Tasdemir D, Brun R, Yardley V, Franzblau SG, Ruedi P. Antituberculotic and antiprotozoal activities of primin, a natural benzoquinone: in vitro and in vivo studies. *Chem Biodivers.* 2006;3:1230-7.
- Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem.* 1989; 264:19654-8.
- Taylor MC Kelly JM, Chapman CJ, Fairlamb AH, Miles MA. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 64:293-301
- Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* 2011; 77(6):572-85.
- Thakur CP, Bhowmick S, Dolfi L, Olliaro P. Aminosidine plus sodium stibogluconate for the treatment of Indian kala-azar: a randomized dose-finding clinical trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995; 89:219-23.

-
- Titus RG, Kelso A, Louis JA. Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon. *Clin Exp Immunol.* 1984; 55:157-65.
- Torres-Santos EC, Rodrigues JM Jr, Moreira DL, Kaplan MA, Rossi-Bergmann B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1776-8.
- Torres-Santos EC, Da Silva SA, Costa SS, Santos AP, Almeida AP, Rossi-Bergmann B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. *Phytother Res.* 2003; 17: 801-3.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today.* 1993; 14:335-8.
- Tuon FF, Amato VS, Graf ME et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *Int. J. Dermatol* 2008; 47, 109–124
- Vallance P, Collier J, Moncada S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins *in vivo.* *Cardiovasc Res.* 1989; 23:1053-7.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun.* 2002; 70:4177-84.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004; 173:6521-5.

-
- Vercesi AE, Docampo R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem J*. 1992; 284:463-7.
- Vidal-Puig AJ, Munoz-Torres M, Jodar-Gimeno E, Garcia-Calvente CJ, Lardelli P, Ruiz-Requena ME, Escobar-Jimenez F. Ketoconazole therapy: hormonal and clinical effects in non-tumoral hyperandrogenism.. *Eur J Endocrinol*. 1994; 130:333-8.
- Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol* 2008; 38:417–29.
- Wiese M. Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context. *Int J Parasitol*. 2007; 37(10):1053-62.
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 28: 39925-32
- Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB, Kharazmi A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43:793-803.
- Zilberstein D, Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania parasites*. *Annu Rev Microbiol*. 48:449-70

ANEXO 1

Estágio doutoral sanduíche.

Durante o período de doutorado, foi realizado um estágio sanduíche no Instituto de Biomedicina Y Parasitologia López-Neyra (Granada- Espanha), com bolsa concedida pelo CNPq. A proposta inicial deste estágio foi o desenvolvimento do projeto intitulado “Reparo de dano induzido por estresse oxidativo em DNA de fita simples em tripanosomatídeos”, cujo objetivo deste projeto foi avaliar um possível alvo terapêutico em *Leishmania major*.

Alguns alvos terapêuticos têm sido identificados e mostram importância na pesquisa de novos fármacos. Esses alvos são moléculas biologicamente importantes ao parasito, que não estão presentes no hospedeiro. Desta maneira, podemos citar: a) microtúbulos do parasito, o composto trifluralin tem mostrado atividade, por romper estruturas do microtúbulo e inibir a proliferação de *Leishmania* sp. (Croft e Coombs, 2003); b) dihidrofolato redutase, enzima que participa do metabolismo de folatos e é diferente no hospedeiro (Croft e Coombs, 2003); c) cisteína proteinases, enzimas que estão relacionadas com a multiplicação e virulência de algumas espécies do parasito (Coombs & Mottram, 1997); d) tripanotiona redutase (TR), enzima envolvida na sobrevivência do parasito, atuando como um sistema de detoxificação (Fairlamb e cols; Castro-Pinto e cols., 2007).

A maior ou menor sensibilidade dos parasitos e em particular dos tripanosomatídeos aos danos oxidativos, desperta bastante interesse como alvo terapêutico. A expressão aumentada da TR e a consequente neutralização do peróxido de hidrogênio tem sido bastante estudada. Outro mecanismo, ainda pouco explorado, seria a capacidade de reparo dos danos causados ao DNA, através da atividade das AP-endonucleases.

De forma geral, as principais lesões em DNA são geradas pela interação deste com espécies reativas de oxigênadas (ROS). Em mamíferos foram

descritos alguns mecanismos de reparo deste dano. Entre eles o mecanismo que envolve a atuação das endonucleases de sítios apirimidinico/apurinico (AP).

Quando o DNA sofre danos por ROS, há a formação de um DNA de fita única com extremidades 3'-final modificadas. Para iniciar o reparo, enzimas glicosilases removem esse dano pela hidrólise da extremidade N- glicosil tornando esse sítio um fosfoglicolato 3'-(3'-PG) ou 3'-fosfato (3'-P) (Dempfle e cols., 1986), ou seja um sítio apirimidinico ou apurinico, de acordo com a base nitrogenada afetada (figura 5). Este é reconhecido por uma enzima AP endonuclease (Dempfle & Harrison, 1994).

Em células de mamíferos, a AP endonuclease 1 (APE1) é a principal enzima com atividade na remoção das extremidades 3'-PG em DNA de fita única para gerar terminos 3'-hidroxila, desempenhando assim um papel vital no reparo do DNA e estabilidade do genoma (Parson e cols., 2004). A APE1 é um gene essencial em células de mamíferos. Camundongos *knockout* para *Ape1* mostraram letalidade embrionária (Xanthoudakis & Curran, 1992), enquanto a redução da APE1 produz uma acumulação de sítios abásicos no DNA, impede a proliferação de células e provoca a morte celular por apoptose (Fung & Dempfle, 2005).

Em tripanosomatídeos foi descrito um gene homólogo ao gene humano *Ape1*: o *Imap* de *Leishmania major*. Este gene homólogo codifica para uma proteína com atividade enzimática AP-endonuclease: 3'-fosfodiesterase e 3'-fosfatase e quando expresso em *Escherichia coli*, mostrou sua associação com a resistência em *L. major* a agentes oxidantes (Perez e cols., 1999; Gallego e cols., 2005; Vidal e cols. 2007), mostrando seu importante papel na proteção do DNA. Os resultados recentes indicam que *Imap* possui uma atividade anormalmente elevada de 3'-fosfodiesterase, que corrige eficientemente os dois tipos de danos ao DNA (3-PG ' e 3'-P), iniciando assim a reparação do DNA de fita simples. Os dados sugerem que *Imap* deve ter um papel importante na sobrevivência dos parasitos tripanosomatídeos, após a sua exposição ao ambiente altamente oxidativo no interior dos macrófagos do hospedeiro.

Interessantemente, a análise estrutural do gene *Imap* e modelagem molecular do complexo DNA-enzima revela um alto grau de conservação de homólogos anteriormente caracterizados apenas com sutis diferenças na geometria do sítio ativo (Vidal e cols., 2007).

Neste sentido, foi construída uma proteína LmAP com um resíduo (Alanina 138D) ausente em APE1 humano que desempenha um papel específico no reparo de quebras de fita. Mutações que afetam este resíduo (ou seja, A138D) reduzem a atividade 3'-fosfodiesterase (resultados não publicados) desta enzima. Este achado revela que existem diferenças funcionais e estruturais entre o parasito e a enzima humana, que podem ser exploradas no desenho racional de inibidores seletivos desta enzima. Para isso se torna interessante conhecer a função biológica desta enzima no parasito, explorando sua função e importância para tripanosomatídeos de forma geral. Os parasitos da espécie *T. brucei*, apresentam um gene homólogo ao *lmap*: o gene *tbap* que pode ser um excelente modelo para o estudo desta enzima.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel biológico da AP endonuclease de tripanosomatídeos e sua possível validação como alvo farmacológico, possibilitando o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento destas enfermidades. Este estudo é uma parte notável que complementa o trabalho de tese que trata de novos compostos sintéticos com atividade anti-tripanosomatídeos, uma vez que a compreensão das vias metabólicas exclusivas dos parasitos é extremamente importante no desenvolvimento de novos quimioterápicos.

A criação ou tentativa de obtenção de um parasito knockout em geral, e é uma boa estratégia para observar a função biológica de uma enzima, e neste caso também para a validação como alvo terapêutico, uma vez que se observará as consequências da ausência da mesma.

Para observar a importância o papel biológico da AP endonuclease, foi desenvolvido um parasito que teve esse gene substituído. O trabalho inicial era direcionado a substituição em parasitos de *Leishmania major*, entretanto por dificuldades técnicas, foi substituído pelo *Trypanosoma brucei*, como uma primeira etapa, pois a técnica que envolve seu manuseio é bem estabelecida, enquanto em *Leishmania*, o protocolo ainda apresenta muitas dificuldades. O “knockout” em *leishmania* se tornou uma etapa posterior do trabalho.

Para a geração de parasitos de *T. brucei* “knockout” foram elaborados plasmídeos com UTRs (regiões não codificantes do gene) mais um gene de resistência a antibióticos, que poderia ser blasticidina, higromicina ou puromicina. Os genes foram transfectados por eletroporação para cultura de células em

estágio procíclico (linhagem 449) e sanguíneo (linhagem S16) e selecionados, com antibióticos. Deste modo, foram obtidos 12 clones simples e 12 clones “duplo knockout” em procíclicos e 4 clones simples e 2 clones “duplo knockout” em sanguíneos.

A confirmação molecular foi feita através de ampliações por PCRs dos genes de resistência aos antibióticos e foi visto que estão integrados ao genoma do parasito em todos os clones (Figura 1 e 2). Outro PCR foi realizado para o próprio gene de TbAP, que foi negativo em “duplo knockout”, para descartar a possibilidade de que o plasmídeo não tenha sido inserido corretamente e ratificar a ausência do gene TbAP (Figura 3). Foi utilizada também a técnica de “southern blot”, e foi observado que a substituição gênica estava correta. Foram realizados “western blots”, e para isso, previamente foram produzidos anticorpos anti-TbAP imunizando coelhos com a proteína TbAP. O anticorpo foi purificado e mostrou alta especificidade. Nos testes de “western blot” foram observadas, a diminuição da expressão da proteína em “simples knockout” e a ausência em “duplo knockout.”

Em testes enzimáticos, nos quais foram usados substratos específicos marcados radioativamente, foi observado que as atividades endonuclease 3'-fosfodiesterase e 3'-fosfatase estão ausentes em clones “duplo knockout”.

Foi feito o acompanhamento da curva de crescimento dos parasitos que foram confirmados como simples e “duplo knockout”. Em procíclicos os parasitos que não possuem esse gene crescem 30 % mais lentos que o “wild type”. Em sanguíneo a ausência do gene é ainda mais notada, sendo que nos “simples knockout”, há uma diminuição de 30% e em “Duplo” chega a crescer 10 vezes menos que o “wild type”, tendendo a morte depois de algumas passagens (Figura 3). Foram feitas tentativas de reverter esse fenótipo de crescimento, através da transfecção de um plasmídeo com uma copia ectópica do gene TbAP. Neste sistema, a expressão da enzima pode ser regulada através de estímulos com doxiciclina. Entretanto, não foram observadas alterações no crescimento, o que pode ser explicado pelo fato de que estes parasitos já terem acumulado muitos danos em seu DNA, que não puderam se revertidos.

Foi utilizado o FACs para analisar possíveis alterações no ciclo celular. Foi observado que os parasitos deficientes têm um deslocamento de todo o ciclo à esquerda, indicando uma perda de material genético, porém os resultados não

são conclusivos, sendo necessários outros testes para avaliar que fase do ciclo está prejudicada. Os parasitos também foram analisados por microscopia confocal e foi confirmada localização nuclear desta enzima. Não foi observada sua presença no kinetoplasto.

Apesar de não ser essencial, ou seja, o parasito consegue sobreviver na ausência da TbAP, este se mostra muito frágil. Testes a serem continuados pelo grupo estrangeiro pretendem avaliar a resistência destes parasitos a agentes genotóxicos e as alterações na infectividade e resistência no organismo hospedeiro. Deste modo, poderemos futuramente de acordo com os resultados validá-lo ou não como alvo terapêutico.

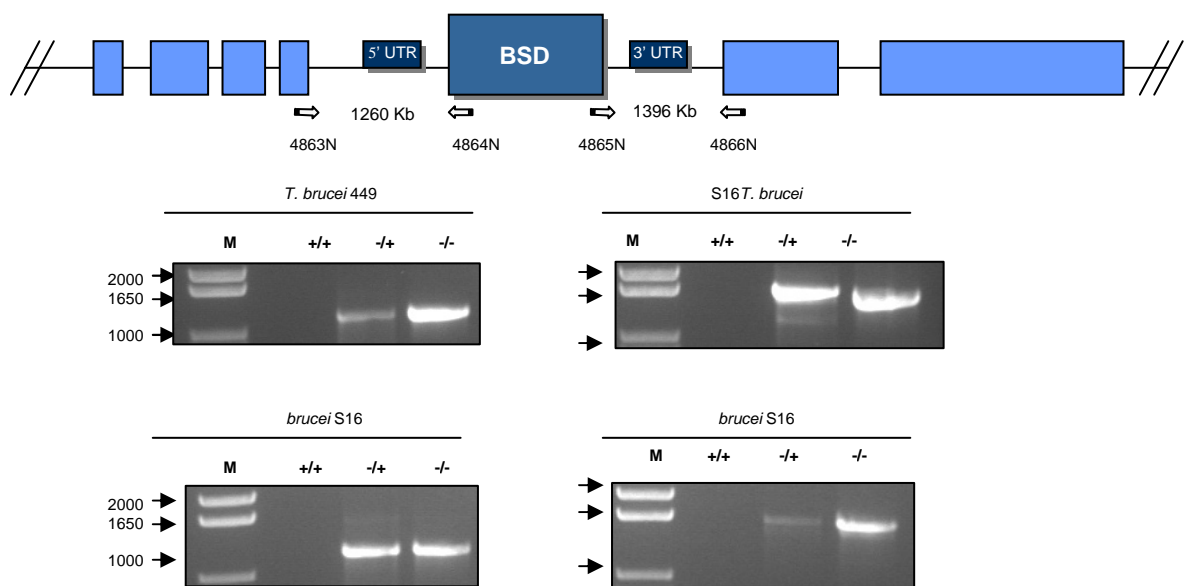


Figura 1 - A integração do gene BSD foi confirmada por ensaios de PCR. Pode-se observar duas bandas de 1260 kb e 1396 kb correspondentes, respectivamente a região 5' UTR do gene *tbap* seguido de um pequeno fragmento 5' do gene BSD; e um fragmento 3' do gene BSD mais a região 3' UTR. Os *primers* utilizados estão indicados no desenho esquemático por setas (4863N, 4864N, 4865N, 4866N). Foram analisados parasitos procíclicos (449) e sanguícolas (S16) de *T. brucei* selvagens (+/+), simples *knockout* (+/-) e duplo *knockout* (-/-). Dos grupos analisados, foi observada em simples e duplo *knockout* a presença de bandas correspondentes a BSD.

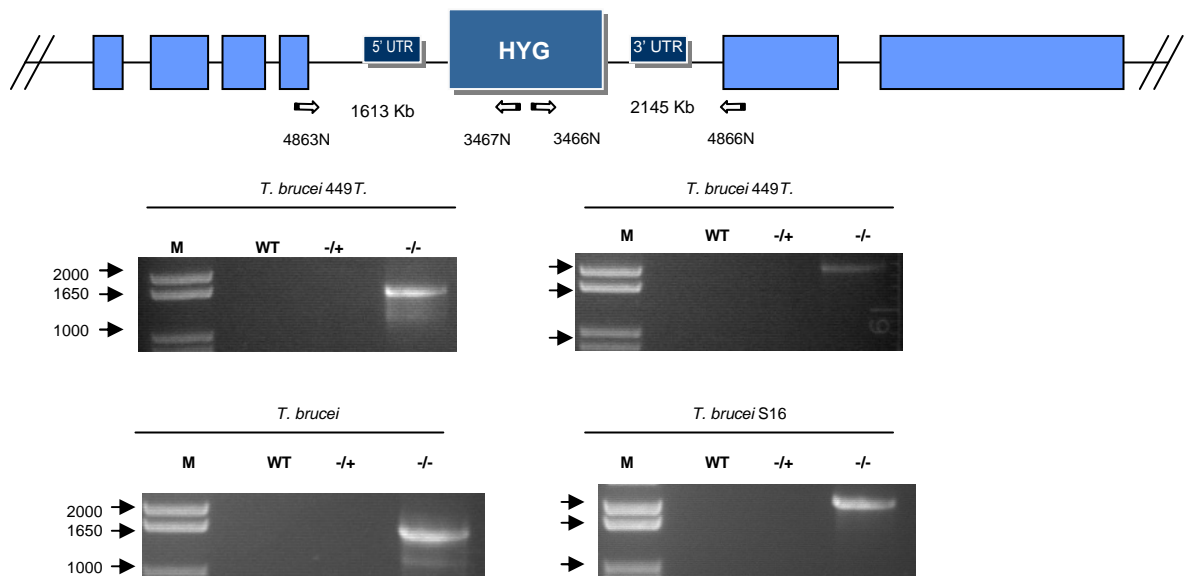


Figura 2 - A integração do gene HYR foi confirmada por ensaios de PCR. Pode-se observar duas bandas de 1613 kb e 2145 kb correspondentes, respectivamente a região 5' UTR do gene *tbap* seguido de um pequeno fragmento 5' do gene HYR; e um fragmento 3' do gene HYR mais a região 3' UTR. Os *primers* utilizados estão indicados no desenho esquemático por setas (4863N, 3467N, 3466N, 4866N). Foram analisados parasitos procíclicos (449) e sanguícolas (S16) de *T. brucei* selvagens (+/+), *simples knockout* (+/-) e *duplo knockout* (-/-). Dos grupos analisados, foi observada somente em *simples* e *duplos knockout*, a presença de bandas correspondentes a presença de HYG.

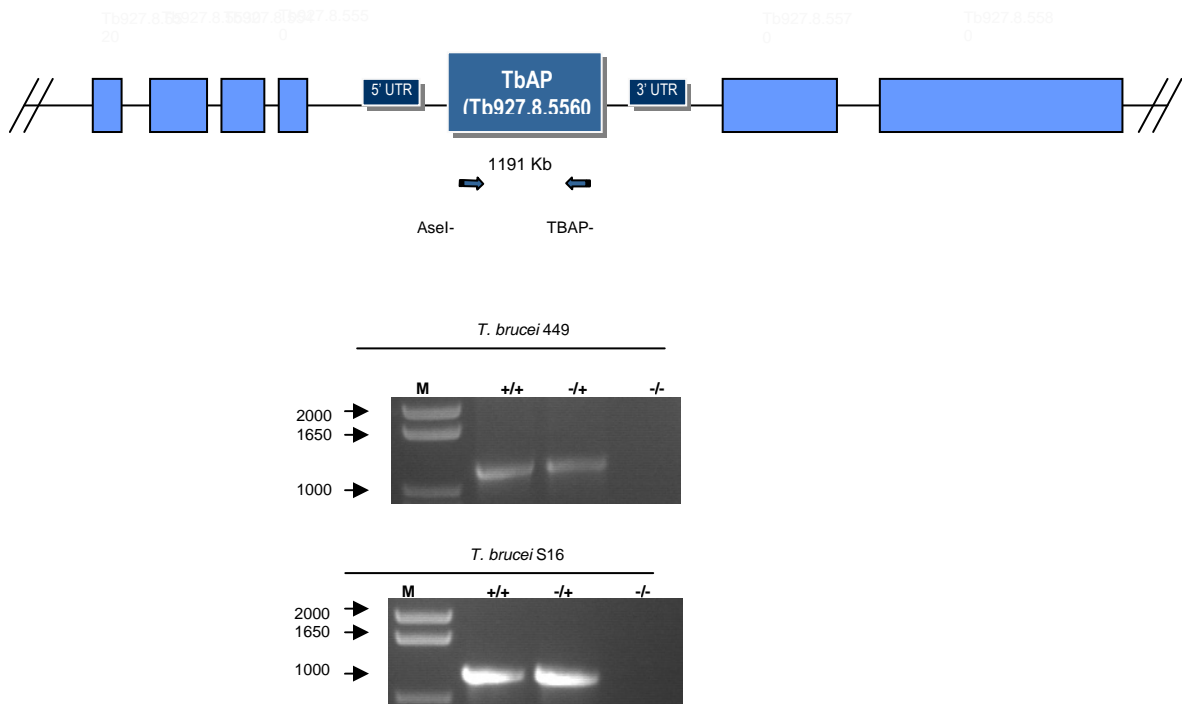


Figura 3 - A ausência do gene TbAP foi confirmada por ensaios de PCR em parasito duplo *knockout*. Pode-se observar uma banda de 1191 kb. Os *primers* utilizados estão indicados no desenho esquemático por setas (Ase I, TBAP). Foram analisados parasitos procíclicos (449) e sanguícolas (S16) de *T. brucei* selvagens (+/+), simples *knockout* (+/-) e duplo *knockout* (-/-). Dos grupos analisados, foi observada somente em selvagens e simples *knockout* a presença de banda correspondente a presença de TbAP.

Referencias bibliográficas

- Castro-Pinto DB, Lima EL, Cunha AS, Genestra M, De Leo RM, Monteiro F, Leon LL. 2007 *Leishmania amazonensis* trypanothione reductase: evaluation of the effect of glutathione analogs on parasite growth, infectivity and enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 22:71-5.
- Coombs GH, Mottran JC. 1997. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology.* 114: 61-80.
- Croft SL, Coombs GH. 2003. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19:502-8
- Demple B, Harrison L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.*; 63:915-48.
- Demple, B., Johnson, A. Fung, D. 1986. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 7731-5.
- Fairlamb AH, Cerami A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1985, 14(2):187-98;
- Fung, H. & Demple, B. 2005. A vital role for ape1/ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell.* 17, 463-70.
- Gallego, C., Estevez, A. M., Farez, E., Ruiz-Perez, L. M. & Gonzalez-Pacanowska, D. 2005. Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 141, 191-7.

-
- Parsons JL, Dianova II, Dianov GL. 2004. APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. *Nucleic Acids Res.* 6;:3531-6.
- Perez, J., Gallego, C., Bernier-Villamor, V., Camacho, A., Gonzalez-Pacanowska, D. & Ruiz-Perez, L. M. 1999. Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 27, 771-7.
- Vidal, A. E., Harkiolaki, M., Gallego, C., Castillo-Acosta, V. M., Ruiz-Perez, L. M., Wilson, K. & Gonzalez-Pacanowska, D. 2007. Crystal structure and DNA repair activities of the AP endonuclease from *Leishmania major*. *J Mol Biol* 373, 827-38
- Xanthoudakis, S. & Curran, T. 1992. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo. J.* 11, 653-65.

ANEXO 2



Trypanosoma brucei AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents

Karen S. Charret¹, Cristina E. Requena¹, Víctor M. Castillo-Acosta¹, Luis M. Ruiz-Pérez¹, Dolores González-Pacanowska¹, Antonio E. Vidal^{1*}

¹ Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. del Comisariado 70, 18100 Armilla, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 August 2011
Received in revised form 7 October 2011
Accepted 7 October 2011
Available online xxx

Keywords:
AP site
Strand break
AP endonuclease
APE1
BER
Trypanosoma brucei

ABSTRACT

DNA repair mechanisms guarantee the maintenance of genome integrity, which is critical for cell viability and proliferation in all organisms. As part of the cellular defenses to DNA damage, apurinic/apyrimidinic (AP) endonucleases repair the abasic sites produced by spontaneous hydrolysis, oxidative or alkylation base damage and during base excision repair (BER). *Trypanosoma brucei*, the protozoan pathogen responsible of human sleeping sickness, has a class II AP endonuclease (TBAPE1) with a high degree of homology to human APE1 and bacterial exonuclease III. The purified recombinant enzyme cleaves AP sites and removes 3'-phosphoglycolate groups from 3'-ends. To study its cellular function, we have established TBAPE1-deficient cell lines derived from bloodstream stage trypanosomes, thus confirming that the AP endonuclease is not essential for viability in this cell type under *in vitro* culture conditions. The role of TBAPE1 in the removal of AP sites is supported by the inverse correlation between the level of AP endonuclease in the cell and the number of endogenously generated abasic sites in its genomic DNA. Furthermore, depletion of TBAPE1 renders cells hypersensitive to AP site and strand break-inducing agents such as methotrexate and phleomycin respectively but not to alkylating agents. Finally, the increased susceptibility that TBAPE1-depleted cells show to nitric oxide suggests an essential role for this DNA repair enzyme in protection against the immune defenses of the mammalian host.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Abasic sites are one of the most common DNA lesions that arise in DNA and if left unrepaired, have both mutagenic and cytotoxic effects [1]. The loss of purine or pyrimidine bases in cellular DNA occurs by spontaneous hydrolysis due to the inherent lability of the N-glycosyl bond. AP sites are also generated by the action of endogenous factors such as reactive oxygen species produced by the normal metabolism of the cell or by exposure to chemical and physical exogenous agents. Moreover, in the BER pathway, damaged bases are excised by DNA glycosylases, giving rise to abasic sites [2,3]. DNA strand breaks are also a major threat to genetic

stability. Strand breaks containing modified 3'-ends such as 3'-phosphoglycolate (3'-PG) and 3'-phosphate (3'-P) may arise by the attack of DNA by free radicals [4,5] or caused by the action of some antitumoral agents such as neocarzinostatin and bleomycin [6]. In addition, certain glycosylases can incise AP sites generating single-strand breaks with blocked 3'-ends. Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) and the endonuclease III (NTH1) have intrinsic associated β -lyase activity that cleaves the phosphodiester backbone 3' to the abasic site through a β -elimination reaction to produce a 3'- α , β -unsaturated aldehyde [7,8] while endonuclease VIII-like glycosylases incise the abasic site by β , β -elimination generating a 3'-P terminus [9]. Abasic sites and blocked-ends must be removed prior to completion of repair by the coordinated actions of DNA polymerase and DNA ligase activities [10–12].

AP site repair is initiated by class II AP endonucleases, which catalyze the hydrolytic cleavage of the phosphodiester bond 3' to the AP site [2]. There are two structurally unrelated families of class II AP endonucleases. The first family is comprised by endonuclease IV from *Escherichia coli* (endoIV) and the homologous AP endonuclease I (ApeI) from *Saccharomyces cerevisiae* [13]. The second family includes *E. coli* exonuclease III (exoIII) and human APE1 [14]. APE1 has a broad specificity for AP sites but can also act as a 3'-phosphodiesterase [15,16]. APE1 is the major phosphoglycolate removal activity in human cell extracts [17]. The human AP

Abbreviations: AP, apurinic/apyrimidinic; TBAPE1, *Trypanosoma brucei* AP endonuclease I; hMP, *Leishmania major* AP endonuclease; exoIII, exonuclease III; endoIV, endonuclease IV; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase I; NTH1, endonuclease III; BSD, blastocidin 5 transferase; HYG, hygromycin phosphotransferase; F, tetrahydrofuranly residue; 3'-PG, 3'-phosphoglycolate; 3'-P, 3'-phosphate; MOA, methoxyamine; MTX, methotrexate; PLM, phleomycin; CPT, camptothecin; MMS, methyl methanesulphonate; NO, nitric oxide; Tdp1, tyrosyl-DNA-phosphodiesterase; PNKP, polynucleotide kinase phosphatase.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 181656; fax: +34 958 181672.
E-mail address: avidal@ipb.csic.es (A.E. Vidal).
¹ Present address: IOC, POCEM, Avenida Brasil, 4305 pav. 26 sala 405 CEP 71040-360 Mangueira, RJ, Brazil.

1568-7864/\$ - see front matter © 2011 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.dnarep.2011.10.006

Please cite this article in press as: K.S. Charret, et al., *Trypanosoma brucei* AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. DNA Repair (2011), doi:10.1016/j.dnarep.2011.10.006

The *in vivo* activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide compounds in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis

Raquel F. Rodrigues^{1*}, Karen S. Charret¹, Monica C. Campos¹, Veronica Amaral², Aurea Echevarria³, Camila dos Reis³, Marilene M. Canto-Cavalheiro¹ and Leonor L. Leon¹

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Rio de Janeiro, Brasil;

²Departamento de Imunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, Brasil; ³Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

*Corresponding author. Tel: +55-21-3865-8225; Fax: +55-21-2290-0479; E-mail: rakelbio@gmail.com

Received 5 July 2011; returned 15 August 2011; revised 1 September 2011; accepted 6 September 2011

Objectives: Researchers have recently investigated the biological activities of mesoionic (MI) compounds, which have shown *in vitro* activity against many species of *Leishmania*, as well as *Trypanosoma cruzi*. The main goal of this study was to evaluate and compare the activity of three MI compounds against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* infection *in vivo*.

Methods: The experiments were carried out using BALB/c mice infected with *L. amazonensis* or *L. infantum* as a highly sensitive murine model. The infected mice were treated with MI-HH, MI-4-OCH₃, MI-4-NO₂ or meglumine antimoniate by different routes (intralesional, topical or intraperitoneal).

Results: Treatment with MI-4-OCH₃ and MI-4-NO₂ efficiently contained the progression of cutaneous and visceral leishmaniasis in comparison with the control group or mice treated with meglumine antimoniate. Interestingly, these MI compounds did not produce toxicological effects after treatment. Furthermore, treatment with these compounds led to a modulation of the immune response that was correlated with disease control. In this study, MI compounds, and MI-4-NO₂ in particular, exhibited high activity in the *L. infantum* murine model. In the *L. amazonensis* model, intralesional treatment with MI-4-OCH₃ or MI-4-NO₂ showed greater therapeutic efficacy than treatment with meglumine antimoniate, and the new topical formulations of these compounds also displayed great activity in the cutaneous leishmaniasis model.

Conclusions: Upon comparison of each MI compound, MI-4-NO₂ was clearly the compound with the greatest activity in these two *in vivo* infection models by each administration route tested.

Keywords: mesoionic compounds, *L. amazonensis*, *L. infantum*

Introduction

Leishmaniasis represents a set of important human diseases that produce different clinical manifestations depending on the *Leishmania* species involved and the host immune response. The two general forms of the disease, which are caused by several species of *Leishmania*, are visceral leishmaniasis (VL) and tegumentary leishmaniasis (TL).

Furthermore, these diseases constitute the third largest group of vector-transmitted infectious diseases, behind malaria and filariasis,¹ and they belong to the group of neglected tropical diseases with research priority according to the WHO. Leishmaniasis affects approximately 12 million people worldwide; the annual incidence of new cases is approximately 2 million, and 350 million people are at risk

for infection.² There are 500 000 new cases of VL per year globally, although 90% of these new cases occur in just five countries (India, Bangladesh, Brazil, Nepal and Sudan). Tegumentary forms of the disease affect 1 500 000 people worldwide, and although TL is not a lethal disease like VL, disfigurement, disability, and social and psychological stigma are all severe consequences of TL.

In South American countries, *Leishmania amazonensis* causes a broad spectrum of clinical manifestations; these range from single to multiple cutaneous lesions and include disfiguring nodules associated with the mucosal form of the disease as well as visceral complications.^{3,4} This species is described as the unique aetiological agent of anergic diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil. This condition is associated with the specific impairment of the cell-mediated immune response at the early

