



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO
(II): EFEITO NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

Aluna: Mônica Soares Costa

Orientadora: Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

UBERLÂNDIA - MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO
(II): EFEITO NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

Aluna: Mônica Soares Costa

Orientadora: Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Genética e Bioquímica (Área de
Bioquímica).**

UBERLÂNDIA - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837p
2016

Costa, Mônica Soares, 1990

Potencial anti-leishmania de novos complexos de rutênio (II): efeito na interação parasito-hospedeiro / Mônica Soares Costa. - 2016.
80 f. : il.

Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Leishmania - Teses. 3. Rutênio - Teses. 4. Leishmaniose - Teses. I. Tudini, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO
(II): EFEITO NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

ALUNA: _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____

(Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

Dedico este trabalho aos meus pais, Lindolfo e Lacir e à minha irmã, Vanessa que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sonho. Dedico também a minha avó, Honorica, que foi meu exemplo de carinho e amor.

*“Quando a gente pensa, a gente cria,
quando a gente cria a gente sente, quando a
gente sente, a gente acredita e quando a
gente acredita, as coisas acontecem.”*

Regina Basílio

Agradecimentos

- A Deus pela força concedida principalmente nos momentos de dificuldades e por todas as graças alcançadas.
- À minha família pelo apoio, carinho, orações, paciência e principalmente confiança. Em especial aos meus pais que nunca mediram esforços para garantir um ensino de qualidade, além de todo o carinho, ensinamentos, amor e confiança depositados por eles. À minha irmã pelo carinho, os ensinamentos e os desabafos e a minha avó.
- Ao meu namorado Lucas pela paciência, compreensão, amor e incentivo, principalmente por acreditar e apoiar minhas escolhas.
- À professora Dra. Kelly Yoneyama pela oportunidade e confiança depositada, pelos preciosos ensinamentos, pela paciência e dedicação, além da contribuição científica e intelectual.
- Às professoras Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e Dra. Renata Santos Rodrigues pela oportunidade, incentivo e amizade.
- Às “*meninas da Leishmania*”, Débora e Márcia, pelos ensinamentos, ideias, alegrias e desabafos e principalmente pela amizade.
- Às amigas Isabela, Letícia e Dayane pelo acolhimento, torcida e amizade prestada.
- Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LABITOX) pelos ensinamentos, convivência e carinho.
- Ao professor Dr. Gustavo Von Poelhsitz e sua aluna Yasmim Garcia pela gentileza em ter cedidos os complexos de rutênio. Agradeço também pela presteza e pelos ensinamentos.
- À Dra. Danielle Reis Napolitano pela parceria, disposição e ajuda com os experimentos envolvendo os macrófagos de linhagem.
- À Tianinha e Marina pela dedicação, amizade e preocupação.
- À equipe da limpeza pela organização, prontidão e carinho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) e professores pelos conhecimentos passados e pela contribuição para meu conhecimento profissional.
- A todos que indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
Apresentação.....	13
Capítulo 1	16
1. Aspectos gerais da leishmaniose.....	17
2. Epidemiologia.....	19
3. Agente etiológico e ciclo biológico	22
4. Interação parasito-hospedeiro	28
5. Manifestações clínicas.	30
5.1 Leishmaniose tegumentar (LT).....	31
5.2 Leishmaniose visceral (LV)	33
6. Tratamento	33
6.1 Antimoniais pentavalentes.....	34
6.2 Pentamidinas.....	36
6.3 Anfotericina B	37
6.4 Paramomicina.....	39
6.5 Miltefosina	39
7. Potencial terapêutico de complexos metálicos: complexos de rutênio	40
Referências Bibliográficas.....	46
Capítulo 2	57
Abstract	58
1. Introduction.....	59
2. Materials and methods	61
2.1. Chemistry	61
2.1.1 Synthesis of <i>cis</i> -[Ru ^{II} (η^2 -O ₂ CR)(dppm) ₂]PF ₆ complexes	61
2.2. Promastigote and macrophage culture	62
2.3. Cytotoxicity assay	62

2.4. Infectivity assay	63
2.5. Statistical Analysis	63
3. Results	64
3.1. Synthesis and characterization of <i>cis</i> -[Ru ^{II} (η^2 -O ₂ CR)(dppm) ₂]PF ₆ complexes	64
3.2. Cytotoxic effect of ruthenium complexes.....	64
3.3. Effect of ruthenium complexes on parasite infectivity.....	64
4. Discussion	66
References	69
Legends to figures and tables	74

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1. Distribuição das leishmanioses no mundo no ano de 2012. **(a)** leishmaniose visceral **(b)** leishmaniose tegumentar.

Figura 2. Morfologia das diferentes formas de *Leishmania*. **(a)** Imagem de microscopia eletrônica de varredura das formas promastigota procíclica, promastigota metacíclica e amastigota. **(b)** Morfologia esquemática da forma promastigota presente no inseto vetor (imagem à esquerda) e da forma amastigota presente no hospedeiro vertebrado (imagem à direita).

Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania*.

Figura 4. Representação esquemática da forma promastigota apresentando moléculas de superfície como a glicoprotease GP63, lipofosfoglicanos (LPGs), proteofosfoglicanos (PPGs) e (glicoinositolfosfolipídeos) GIPLs. Outras biomoléculas, não ancoradas à membrana plasmática, podem ser liberadas pelo parasito via bolso flagelar, sendo elas: GP63, PPGs, fosfatases ácidas (SAPs) e cisteína proteinases (CPs).

CAPÍTULO 2:

Figure 1: Synthesis of three new ruthenium complexes: a) $\text{cis-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_{10}\text{H}_{13})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (complex 1); b) $\text{cis-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_7\text{H}_7\text{S})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (complex 2) and 3. $\text{cis-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_7\text{H}_7\text{O}_2)(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ (complex 3).

Figure 2. Effect of three new ruthenium complexes on parasite infectivity in RAW 264.7 macrophages. The graphs show the percentages of infectivity inhibition for three *Leishmania* specie caused by ruthenium complexes at two different concentrations. Graphs **A** and **B**, infectivity inhibition for *L. (L.) amazonensis*; graphs **C** and **D**, infectivity inhibition for *L.(V.) braziliensis*; graphs **E** and **F**, infectivity inhibition for *L. (L.) infantum*. Graphs **A**, **C** and **E**, infectivity

inhibition (%) in presence of concentrations able to inhibit 50% of promastigotes viability (IC_{50}). Graphs **B**, **D** and **F**, infectivity inhibition (%) in presence of concentrations not toxic to 90% of host cells (RAW 264.7 macrophage). X axis, **C**, infectivity control (not treated); **P**, precursor; **1**, complex 1; **2**, complex 2; **3**, complex 3. Data represent mean \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments performed in triplicate. *Statistically significant difference when compared to the infectivity control ($p < 0.05$). **Statistically significant difference when compared to the precursor ($p < 0.05$).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1. Espécies do gênero *Leishmania* de acordo com a classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987 (revisado em 2005).

Tabela 2. Drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses associadas com dados de eficácia, vantagens, limitações e custo.

CAPÍTULO 2:

Tabela 1. Cytotoxic effects of ruthenium complexes on *Leishmania* promastigotes and RAW 264.7 macrophages.

Table 2. Ruthenium complexes effect on *Leishmania* infectivity in RAW 264.7 macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DTN: doenças tropicais negligenciadas
FBS: *fetal bovine serum*
IC₅₀: *50% inhibition concentration*
LC: leishmaniose cutânea
LCD: leishmaniose cutânea difusa
LCPC: leishmaniose cutânea pós-calazar
LIT: Liver infusion tryptose
LMC: leishmaniose mucocutânea
LT: leishmaniose tegumentar
LTA: leishmaniose tegumentar americana
LV: leishmaniose visceral
MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: phosphate buffer saline
SBI: *sterol biosynthesis inhibitor*
WHO: *World Health Organization*

Apresentação

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* que é transmitida vetorialmente através do repasto sanguíneo de fêmeas flebotomíneos infectadas com o parasito. A doença está presente em diferentes regiões do mundo e é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença preocupante, uma vez que acomete uma parte considerável da população e está relacionada com elevadas taxas de mortalidade e morbidade humana.

Esta enfermidade pode se manifestar de diferentes formas dependendo da espécie infectante e da resposta imunológica do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar afeta principalmente a pele (cutânea) e/ou mucosas (mucocutânea), causando desde úlceras nas partes expostas do corpo até a mutilação total ou parcial da mucosa naso-faríngea, e por fim, pode resultar em cicatrizes permanentes e, em alguns casos, em deficiências. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e quando não tratada pode resultar na morte do indivíduo. Ela acomete os órgãos, sobretudo o baço, o fígado e os linfonodos, podendo resultar em hepatoesplenomegalias.

As leishmanioses são consideradas pela OMS como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) por vários aspectos, principalmente devido à falta de investimentos em novos agentes terapêuticos. O tratamento atual para a doença apresenta uma série de efeitos adversos, elevado custo, possibilidade de resistência, além da necessidade de hospitalização do paciente. Neste sentido a busca por novos agentes terapêuticos os quais tenham menores efeitos colaterais e sejam menos onerosos se faz constante.

Estratégias para o desenvolvimentos de novos fármacos se apoiam em alguns pilares básicos, sendo eles: conhecimento da doença, identificação das vias bioquímicas envolvidas na sobrevivência do parasito e seleção de alvos moleculares promissores. A Química Bioinorgânica ganhou destaque no delineamento de novos fármacos por meio da descoberta da ação antitumoral da platina. Desde então, outros compostos inorgânicos foram estudados e associados a diversas propriedades biológicas. Partindo do pressuposto de que as células muito replicativas com células tumorais e células parasitárias da ordem Kinetoplastida apresentam processos metabólicos semelhantes, os complexos inorgânicos passaram a ser testados também em parasitos, apresentando resultados promissores.

Os complexos de rutênio ganharam destaque devido a sua versatilidade e sua baixa toxicidade em células normais. Além disso, a partir de sua estrutura básica é possível à síntese de inúmeras moléculas bioativas por meio de modificação em seus ligantes. Tais alterações tem a intenção de melhorar o potencial da droga contra organismos patogênicos e reduzir a toxicidade em células normais.

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito anti-*Leishmania* de 3 novos complexos de rutênio (II), com formula geral de $cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CR)(dppm)_2]PF_6$, com $dppm = bis(diphenylphosphino)methane$ and $R = 4$ -butylbenzoate (complexo **1**); 4-(methylthio)benzoate (complexo **2**) e 3-hydroxy-4-methoxybenzoate (complexo **3**) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB) do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. O capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica acerca do assunto, incluindo tópicos referentes à leishmaniose, epidemiologia, agente etiológico e ciclo biológico, interação parasito-hospedeiro, manifestações clínicas, tratamentos e por fim, complexos metálicos e suas aplicações biológicas. O capítulo 2 contempla a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão acerca da ação anti-*Leishmania* de 3 novos complexos de rutênio (II). Este capítulo está apresentado na forma de artigo científico intitulado “Anti-*Leishmania* activity of new ruthenium (II) complexes: effect on parasite-host interaction” o qual será submetido para a revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC) e segue normas e formatação preconizada pela revista.

Capítulo 1

Fundamentação teórica

1. Aspectos gerais da leishmaniose

As leishmanioses integram um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (HIDE et al., 2006; ROBERTS, 2006; BARI et al., 2008). Sua transmissão ocorre por meio vetorial através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com parasitos, sendo possível a transmissão de mais de 21 espécies diferentes (WHO, 2014).

A leishmaniose tegumentar nas Américas parece ser uma doença muito antiga como sugerido por meio de algumas peças de cerâmicas do Peru e Equador, as quais retratavam rostos humanos com deformações semelhantes às descritas para a forma mucocutânea da doença (LAINSON, 2010). Em 1951, Pedro Pizarro descreve lesões desfigurantes na boca e nariz de plantadores de coca na Cordilheira dos Andes (PIZARRO, 1571). Tais lesões descritas certamente estavam relacionadas com a leishmaniose, uma vez que tal região é endêmica para a forma mucocutânea da doença.

Durante muitos anos, a uta peruana e outras lesões cutâneas ocorridas em outros países da América Latina eram consideradas idênticas a leishmaniose conhecida no Velho Mundo como “botão do oriente” e sua etiologia causava muitas dúvidas naquela época. Em 1903, o agente etiológico do botão do oriente foi identificado e denominado de *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903; LUHE, 1906). Anos depois (1909) o gênero *Leishmania* foi associado com outras lesões cutâneas semelhantes. Tal associação ocorreu por meio de estudos independentes realizados por Lindenberg, Carini e Paranhos, os quais demonstraram formas amastigotas, denominados na época de “corpúsculos de Leishman-Donovan”, em lesões cutâneas de indivíduos acometidos com a “úlcera de bauru” no estado de São Paulo (LINDENBERG, 1909; CARINI; PARANHOS, 1909).

Naquela época acreditava-se na existência de apenas um agente etiológico. Entretanto, Gaspar Vianna, um médico brasileiro identificou formas amastigota em indivíduos com lesões cutâneas no estado de Minas Gerais e observou que as mesmas eram morfologicamente distintas das formas amastigota da *Leishmania tropica*. Assim o parasito identificado por Gaspar Viana foi denominado de *Leishmania brazilienses* (VIANNA, 1911),

posteriormente corrigido por da Matta como *Leishmania braziliensis* (MATTA, 1916).

A leishmaniose visceral (LV) pode ser tão antiga quanto a leishmaniose tegumentar (LT) na América Latina. Entretanto, a LV oferece um menor número de evidências visuais externas de sua existência. Assim, o primeiro relato de LV nas Américas foi realizado por Migone, o qual observou a presença de amastigotas no sangue de um paciente no Paraguai (MIGONE, 1913). No Brasil, a evidência definitiva da presença da LV ocorreu em 1934, através da análise de tecidos do fígado de 41 pacientes (PENNA, 1934).

A princípio, o gênero *Leishmania* tinha suas espécies identificadas por meio de critérios extrínsecos (aspectos clínicos da doença, distribuição geográfica, tropismo e propriedades antigênicas). Com o desenvolvimento das ciências e suas tecnologias relacionadas à Bioquímica e a Biologia Molecular, os critérios intrínsecos passaram a ser utilizados para identificação das espécies (NEVES, 2011). A classificação mais utilizada hoje foi proposta por Lainson e Shaw (1987) sendo que a mesma divide o gênero *Leishmania* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* com base na ocorrência ou ausência de desenvolvimento do parasito no intestino posterior do flebotomíneo (Tabela 1). Assim, as espécies que se desenvolvem no intestino posterior foram agrupadas no subgênero *Viannia* (nome dado em homenagem a Gaspar Viannia que descreveu a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*) e as espécies as quais não se desenvolvem no intestino posterior foram incluídas no subgênero *Leishmania*.

Quanto ao vetor associado à transmissão da doença, insetos flebotomíneos popularmente conhecidos como asa branca, birigui, cagalhinha, flebótomo, mosquito palha e tatuquira são os agentes transmissores da leishmaniose. No velho mundo (Europa, África e Ásia) apenas o gênero *Phlebotomus* apresenta espécies transmissoras enquanto que no Novo mundo (Américas) os gêneros transmissores são *Brumptomya*, *Warileya* e *Lutzomyia*, estando o último relacionado com a transmissão de inúmeras espécies de *Leishmania*. Somente as fêmeas são capazes de transmitir a doença, tendo em vista que são parasitos hematófagos e necessitam, portanto, do sangue como fonte de proteínas e aminoácidos para o desenvolvimento dos ovos (NEVES 2011; BRASIL, 2013).

Tabela 1: Espécies do gênero *Leishmania* de acordo com a classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987 (revisado em 2005).

Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis*</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (V.) guyanensis*</i>
<i>L. (L.) infantum chagasi*</i>	<i>L. (V.) panamensis*</i>
<i>L. (L.) archibaldi</i>	<i>L. (V.) peruviana*</i>
<i>L. (L.) tropica</i>	<i>L. (V.) lainsoni*</i>
<i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>L. (V.) naiffi*</i>
<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (V.) shawi*</i>
<i>L. (L.) gerbilli**</i>	<i>L. (V.) colombiensis*</i>
<i>L. (L.) mexicana*</i>	<i>L. (V.) equatorensis</i>
<i>L. (L.) amazonensis*</i>	<i>L. (V.) lindenberg*</i>
<i>L. (L.) venezuelensis*</i>	<i>L. (V.) utingensis</i>
<i>L. (L.) enrietti**</i>	
<i>L. (L.) aristidesi</i>	
<i>L. (L.) pifanoi</i>	
<i>L. (L.) gamhami*</i>	
<i>L. (L.) hertigi*</i>	
<i>L. (L.) deanei</i>	
<i>L. (L.) forattinii</i>	

* Espécies encontradas parasitando humanos no Brasil.

** Espécies exclusivamente de animais.

Fonte: NEVES, 2011.

2. Epidemiologia

As leishmanioses fazem parte do grupo de doenças as quais são consideradas preocupantes pelo Sistema de Saúde Pública em quatro continentes diferentes (Américas, Europa, África e Ásia), uma vez que apresentam grande diversidade epidemiológica e estão associadas com o desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas (BRASIL, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 98 países, três territórios e cinco continentes são endêmicos para as leishmanioses, ocorrendo assim cerca de 1,3 milhões de novos casos anualmente. A LV acomete principalmente regiões como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sul do Sudão e Sudão e está relacionada com a infecção de mais ou menos 300 mil pessoas anualmente (figura 1a), podendo causar cerca de 20 a 50 mil óbitos. A LT relacionada ao desenvolvimento da forma cutânea afeta

principalmente regiões como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Pasquidão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia (figura 1b). A LT relacionada ao desenvolvimento da forma mucocutânea acomete principalmente o Brasil, Peru e Estado Plurinacional da Bolívia. Ambas LT (cutânea e mucocutânea) estão associadas com a infecção de aproximadamente 1 milhão de pessoas ao ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

Nos anos de 2009 à 2012 houve uma epidemia no leste da África que resultou em 28 mil novos casos de LV com 850 casos de óbito. Apesar do grande impacto, esta epidemia foi considerada controlável, já que teve o apoio substancial da OMS, Médicos sem fronteiras e outros colaboradores. Dessa forma, a epidemia manteve um índice de 5% de mortalidade que é considerado relativamente baixo quando comparado com a epidemia que houve em 1990 e gerou um índice de 35% de mortalidade (WHO, 2015).

Segundo dados fornecidos pela WHO foram reportados no ano de 2013 18.226 novos casos de LT no Brasil, sendo a região do Pará a mais prejudicada com aproximadamente 18% dos casos. A LV apresentou 3.233 novos casos e a região do Maranhão representou 19% dos eventos reportados.

Os casos de coinfeção de *Leishmania* em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) também apresenta um crescimento no Brasil. Dados mostram um aumento de cerca de 2% no ano de 2005 e de 6,6% no ano de 2011. Entretanto o tratamento com os antirretrovirais apresentam seus benefícios, uma vez que eles têm auxiliado na redução da disseminação da LV, diminuindo assim as recaídas e aumentando consequentemente a sobrevida de pacientes portadores do HIV (WHO, 2015).

O gênero *Leishmania* têm se distribuído e expandido nas últimas décadas e o número de casos da doença tem aumentado exponencialmente. Entretanto, a real epidemiologia ainda é desconhecida uma vez que a notificação do número de casos desta doença é obrigatória em apenas 34% dos países. Dessa forma, presume-se que os valores reais dos casos de leishmanioses sejam na verdade maiores do que os dados anunciados até o presente momento (AAGAARD-HANSEN; NOMBELA; ALVAR et al., 2010; ARGAW et al., 2013).

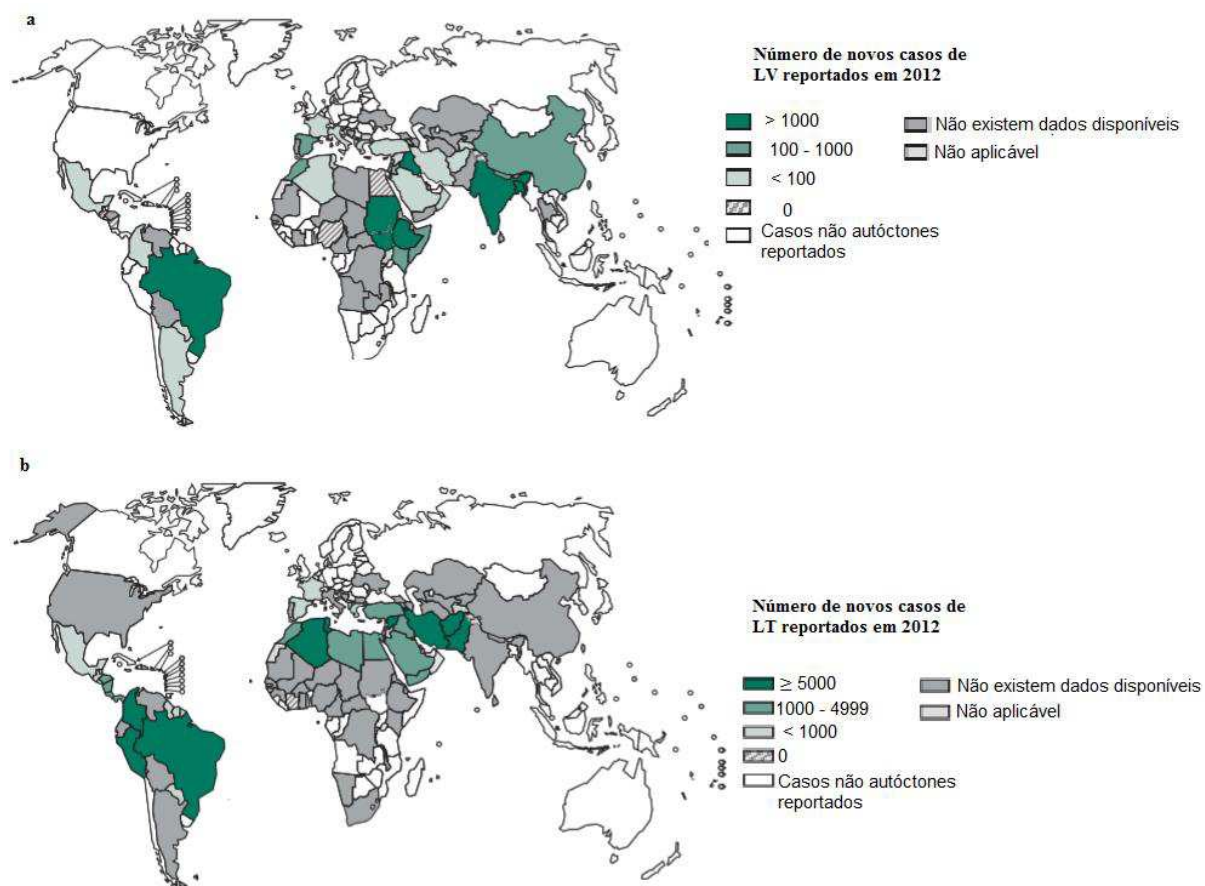


Figura 1: Distribuição das Leishmanioses no mundo no ano de 2012. **(a)** Leishmaniose Visceral **(b)** Leishmaniose Tegumentar. **Fonte:** WHO, 2015.

Dentre as doenças parasitárias as leishmanioses são a segunda doença que mais provoca mortes, ficando atrás apenas da malária. Além disso, a doença tem se difundido para outras regiões, aumentando assim os casos de leishmaniose em locais não endêmicos. Casos de LV têm aumentado cada vez mais em países da Europa, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, portadores de HIV, pacientes transplantados e pacientes que fazem o uso de quimioterapia (ALVAR et al., 2012; OKWOR; UZONNA, 2013).

Estudos atuais mostram que a propagação das leishmanioses para a Europa vem ocorrendo não somente devido às viagens internacionais, mas também devido às mudanças climáticas presentes neste país, as quais têm contribuído de forma positiva para o aumento da disseminação de novos vetores (MAROLI et al., 2013; SIGNORINI et al., 2014).

Segundo a OMS, a detecção, o tratamento e os cuidados associados a LV podem necessitar de investimentos de aproximadamente 100 milhões de dólares (80 – 130 milhões de dólares) por ano e para a LT cerca de 13 milhões de dólares (11 à 14 milhões de dólares) por ano durante o período de 2015-2030. Estes dados reafirmam, portanto, o grande impacto financeiro que as leishmanioses podem gerar para o Sistema de Saúde Pública (WHO, 2015).

3. Agente etiológico e ciclo biológico

O gênero *Leishmania* inclui protozoários unicelulares e digenéticos os quais completam seu ciclo evolutivo alternando-se entre os insetos vetores e os hospedeiros vertebrados mamíferos, desta forma, o parasito necessita apresentar formas adaptativas (figura 2) que forneçam condições apropriadas ao parasitismo (NEVES, 2011).

Neste contexto, formas flageladas, altamente móveis conhecidas como promastigotas estão presentes nos flebotomíneos. Elas residem primeiramente no trato alimentar dos insetos e se apresentam sob duas formas: promastigota procíclica e promastigota metacíclica (figura 2a). As formas promastigota procíclica estão presentes no intestino médio do vetor, apresentam um corpo celular arredondado (aproximadamente 20 – 35 µm X 2 – 3 µm), um flagelo

pequeno e se multiplicam intensamente. Já as formas promastigota metacíclica apresentam um corpo pequeno e alongado (cerca de $\leq 8 \mu\text{m} \times 1.2 - 1.5 \mu\text{m}$) com o flagelo duas vezes maior que o comprimento da célula e após completar seu desenvolvimento, esta forma adquire capacidade infectiva e migra para a probóscide do vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; ROGERS et al., 2004). O processo de produção das formas promastigota metacíclica é chamado de metaciclogênese e ele é de suma importância uma vez que serve como uma pré- adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado. O processo de transição entre o inseto vetor para o hospedeiro vertebrado implica em algumas modificações importantes as quais estão relacionadas com mudança no pH, na nutrição, na disponibilidade de oxigênio e na temperatura. Assim as diferentes formas presentes da *Leishmania* vão auxiliar no seu processo de adaptação e sobrevivência nos diferentes ambientes (BESTEIRO et al., 2007).

A forma amastigota está presente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (figura 2a). Essa forma parasitária é oval, esférica ou fusiforme, não exibem flagelo livre aparente e apresentam um diâmetro de aproximadamente $1,5 - 3,0 \times 3,0 - 6,5 \mu\text{m}$ (NEVES, 2011). Os amastigotas apresentam uma estrutura altamente adaptada para sobrevivência e parasitismo das células no hospedeiro vertebrado (figura 2b) como tamanho reduzido e flagelo internalizado, capacidade de sobrevivência em ambientes com pH baixo e grande habilidade adaptativa quanto ao seu metabolismo energético (BESTEIRO et al., 2007).

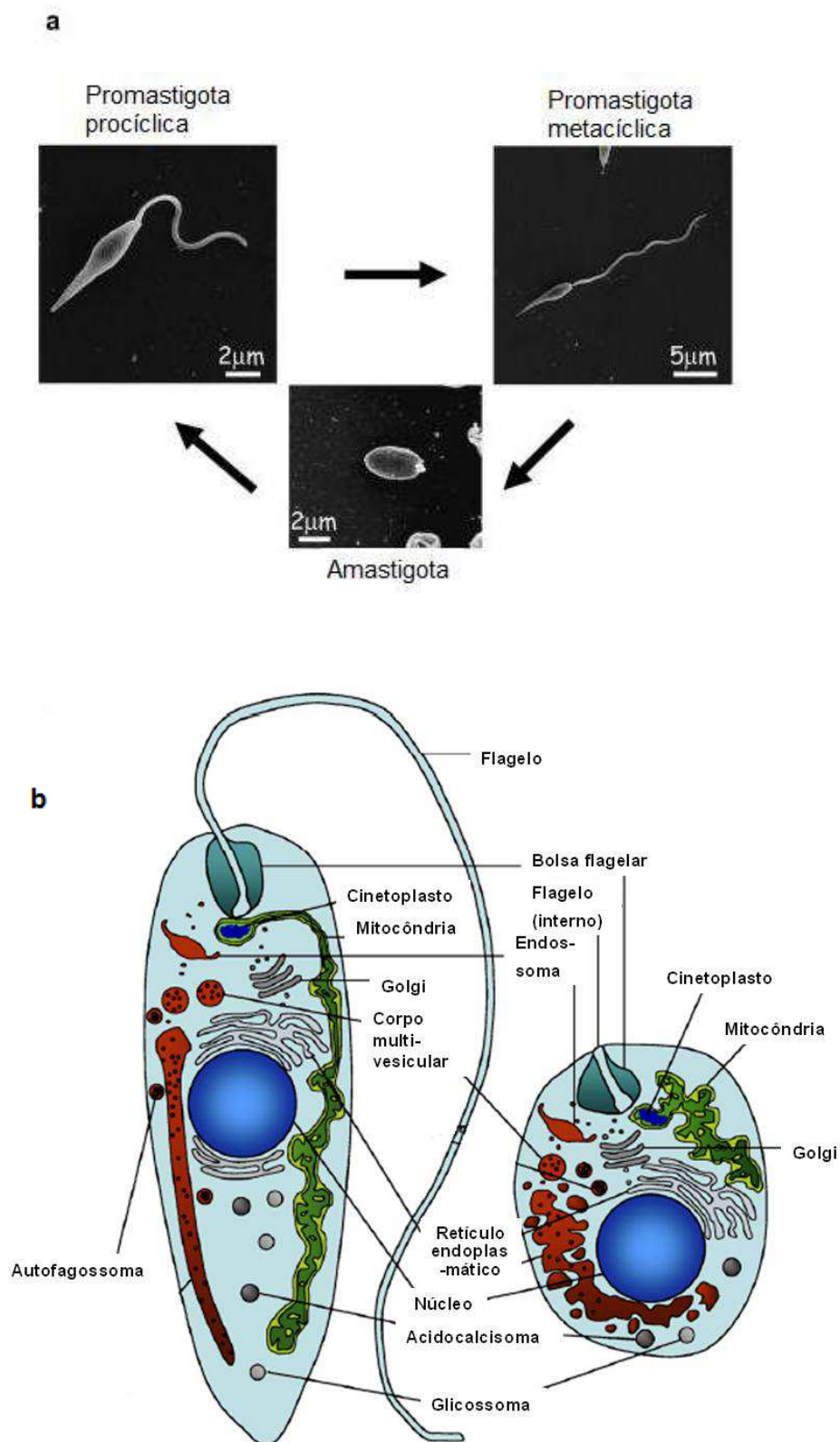


Figura 2: Morfologia das diferentes formas de *Leishmania*. **(a)** Imagem de microscopia eletrônica de varredura das formas promastigota procíclica, promastigota metacíclica e amastigota. **(b)** Morfologia esquemática da forma promastigota presente no inseto vetor (imagem à esquerda) e da forma amastigota presente no hospedeiro vertebrado (imagem à direita). **Fonte:** Modificado de Besteiro et al.,2007.

Apesar das diferenças morfológicas, promastigotas e amastigotas apresentam características metabólicas similares e que as distinguem do metabolismo do hospedeiro. Em termos bioquímicos, mas especificamente quanto à bioenergética, a principal diferença entre parasito e hospedeiro vertebrado é que no parasito as enzimas glicolíticas são compartimentalizadas em uma organela específica chamada glicossoma (figura 2), uma característica comum a todos os tripanossomatídeos, enquanto que as enzimas glicolíticas de hospedeiros mamíferos estão dispersas no citosol da célula (BERMAN, 1988; BALAÑA-FOURCE et al., 1998). A exploração dessa diferença metabólica pode ser bastante promissora para o desenvolvimento de novos fármacos. Inclusive os antimoniais usados no tratamento da doença parecem estar envolvidos com a inibição da glicólise e da β -oxidação nos parasitos (BERMAN, 1988).

Outra diferença entre o parasito e o hospedeiro vertebrado consiste no balanço redox. Os tripanosomatídeos mantêm seu balanço redox por meio do sistema tripanotiona/tripanotiona-redutase (TR) em substituição à catalase e glutathione peroxidase dos hospedeiros vertebrados. O sistema TR é responsável por manter a tripanotiona no estado reduzido e, dessa forma, mantém o balanço redox do parasito, protegendo-o contra danos oxidativos, ação de xenobióticos, metais pesados tóxicos, além de oferecer equivalentes redutores para a síntese de DNA (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; HALDAR; SEN; ROY, 2011). Associado ao sistema TR, o parasito ainda apresenta o sistema tripanotiona/triparredoxina peroxidase que é responsável pelo metabolismo do peróxido de hidrogênio no parasito. Brevemente, a tripanotiona reduzida pela tripanotiona redutase transfere seus elétrons reduzindo a triparredoxina. Por fim, a triparredoxina reduzida irá doar os elétrons (na forma de átomos de hidrogênio) para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), via enzima triparredoxina peroxidase, convertendo o H_2O_2 em 2 moléculas de água (H_2O) (TURRENS, 2004).

O ciclo biológico inicia-se quando o inseto vetor entra em contato com o parasito (forma amastigota) durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, por meio da ingestão de formas amastigota presentes no interior de células fagocitárias (figura 3). No trato digestório anterior, os amastigotas passam por um processo de diferenciação transformando-se em

formas promastigota procíclica ainda no sangue ingerido, o qual é envolto por uma membrana peritrófica secretada por células presentes no inseto vetor. As formas promastigota procíclica continuam se replicando por divisão binária. Após 3-4 dias o sangue é digerido e a membrana peritrófica é rompida, liberando as formas promastigota, as quais podem então seguir dois destinos diferentes dependendo do subgênero do parasito (ROGERS et al., 2008; NEVES, 2011).

Caso o subgênero seja *Viannia* os promastigotas irão migrar para o intestino posterior e se organizarão nas regiões do piloro e íleo, recebendo assim a denominação de promastigotas haptomonas. Os mesmos ficaram aderidos a esta região do intestino através do flagelo e irão continuar o processo de replicação até atingir a forma metacíclica (ROGERS et al., 2008; NEVES, 2011).

Caso o subgênero seja *Leishmania* os promastigotas irão se multiplicar livremente ou aderidos à parede do estômago. Em seguida eles irão migrar para região anterior do estômago onde serão transformados em promastigotas nectomonas e irão se fixar na região do esôfago e faringe, local no qual serão diferenciados em formas promastigota metacíclica. Posteriormente, esta última forma parasitária irá migrar em direção à faringe do vetor e se instalar na probóscide do mesmo (ROGERS et al., 2008; NEVES, 2011).

A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorrerá durante o processo de alimentação do flebotomíneo infectado, uma vez que a porção anterior do tubo digestório do mesmo está cheio de promastigotas altamente infectivos os quais serão regurgitados e dispensados no local da picada. Uma vez dentro do organismo do hospedeiro vertebrado, os promastigotas infectantes serão fagocitados pelas células do sistema fagocítico mononuclear, sobretudo pelos macrófagos, formando assim os fagossomos. Estes irão se fundir com os lisossomos e originar os fagolisossomos os quais irão formar os vacúolos parasitóforos (NEVES, 2011). Os promastigotas rapidamente serão convertidos em amastigotas e irão se adaptar no interior dos vacúolos parasitóforos. Uma vez adaptado, os amastigotas irão se multiplicar até esgotar a resistência dos macrófagos fazendo com que a membrana dele se rompa e os amastigotas sejam então liberados. Estes amastigotas disponíveis no tecido

serão novamente fagocitados, iniciando no local da picada uma reação inflamatória (NEVES, 2011).

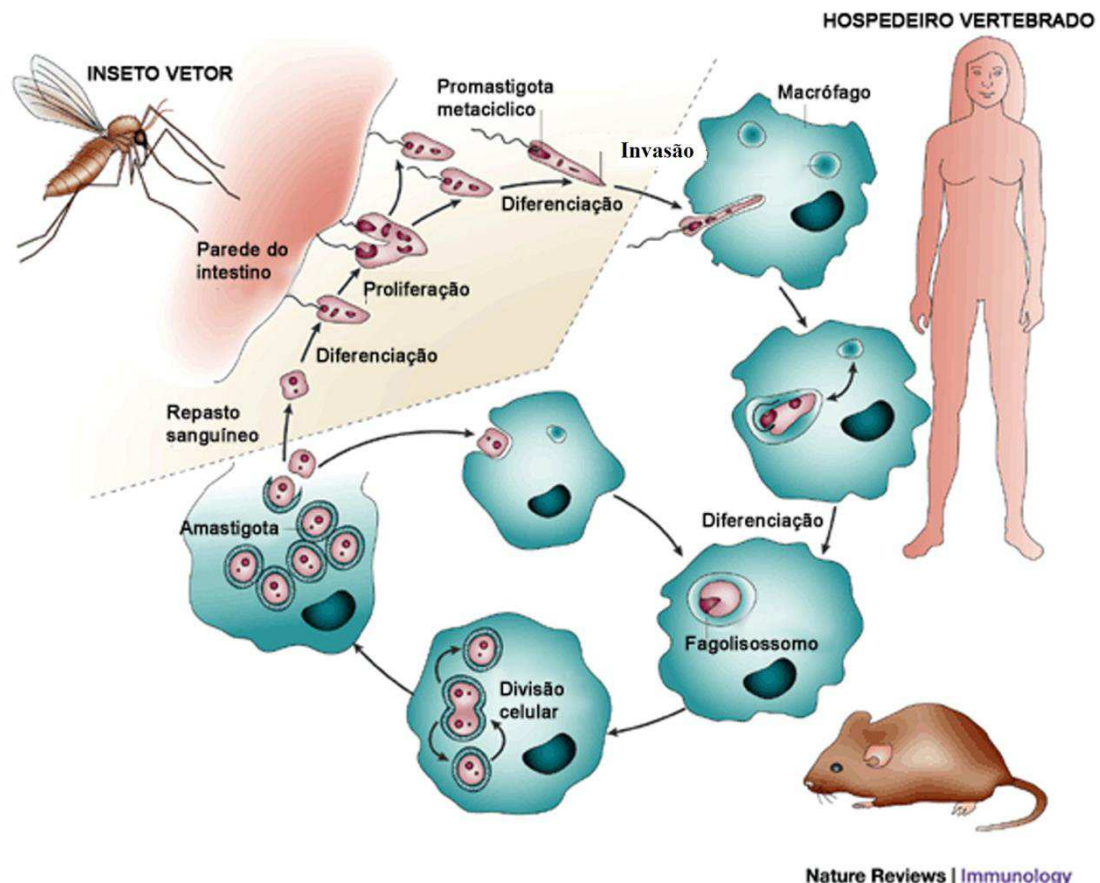


Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania*.

Fonte: Modificada de SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002.

4. Interação parasito-hospedeiro

A interação parasito-hospedeiro configura uma etapa fundamental para o estabelecimento e o desenvolvimento da infecção em células hospedeiras. Neste sentido, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam-se bem adaptados para sobreviver e multiplicar dentro de macrófagos devido sua capacidade de modular as funções biológicas da célula hospedeira (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; SHIO et al., 2012). De forma bem simplificada, para que a interação *Leishmania*-macrófago ocorra são necessários eventos como os que se seguem: a) ligação do parasito ao macrófago; b) internalização do parasito; c) sobrevivência da forma promastigota e diferenciação; d) multiplicação da forma amastigota (YONEYAMA, 2006).

A ligação do parasito ao macrófago e sua internalização compreendem o mecanismo denominado de fagocitose e este evento ocorre via receptores presentes na célula hospedeira como, por exemplo, receptores do complemento CR1 e CR3; receptores manose-fucose; receptores de fibronectina e as várias moléculas presentes na superfície do parasito (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; ANTOINE et al., 2004).

Uma vez fagocitado, o parasito precisa sobreviver ao meio ácido e rico em enzimas proteolíticas encontrado nos fagolisossomos. Desta forma, moléculas secretadas e/ou expressas na superfície parasitária como lipofosfoglicano (LPG), glicoinositolfosfolipídeos (GIPs), proteofosfoglicanos (PPGs), fosfatases ácidas (SAPs), cisteína proteinase (CPs), glicoprotease GP63 e outras glicoproteínas ancoradas via GPI têm sido relacionadas também com a sobrevivência do parasito dentro do fagossomo ou do fagolisossomo (figura 4) (OLIVIER et al., 2012).

O LPG é um glicoconjugado abundante encontrado na superfície de formas promastigota do parasito, inclusive na região do flagelo. Este glicoconjugado é pouco expresso ou não expresso em formas amastigota. O LPG é essencial para sobrevivência inicial do parasito no macrófago uma vez que é capaz de inibir a maturação do fagolisossomo por induzir o acúmulo de F actina que gera uma barreira física à fusão fagolisossomal (HOLM et al., 2001). Portanto, o LPG tem um importante papel na sobrevivência do parasito na célula hospedeira, tendo em vista que a forma promastigota terá um tempo

maior para se diferenciar em amastigota, forma parasitária adaptada para sobrevivência em ambiente com o pH mais ácido e rico em enzimas proteolíticas. Desta forma, o LPG é uma importante molécula na iniciação da infecção do parasito ao macrófago.

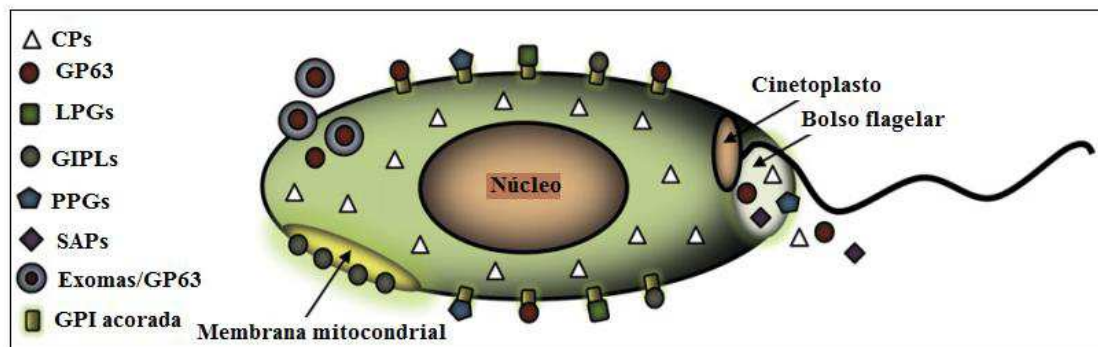


Figura 4: Fatores de virulência de *Leishmania*. Representação esquemática da forma promastigota apresentando moléculas de superfície como a glicoprotease GP63, lipofosfoglicanos (LPGs), proteofosfoglicanos (PPGs) e (glicoinositolfosfolipídeos) GIPLs. Outras biomoléculas, não ancoradas à membrana plasmática, podem ser liberadas pelo parasito via bolso flagelar, sendo elas: GP63, PPGs, fosfatases ácidas (SAPs) e cisteína proteinases (CPs). **Fonte:** Traduzido e modificado de OLIVIER et al., 2012.

Os GIPLs podem ser encontrados tanto na superfície da forma promastigota quanto na forma amastigota, sendo também um glicoconjugado abundante no parasito. Os GIPLs apresentam um papel importante na sobrevivência e multiplicação do amastigota no macrófago, uma vez que evidências apontam que os GIPLs estão envolvidos na modulação de vias de sinalização no macrófago (GIORGIO et al., 2003). No promastigota, os GIPLs (85% do total) encontram-se enriquecidos em regiões especializadas da membrana plasmáticas e denominadas de microdomínios de membrana ou microdomíneos lipídicos. Tais regiões da membrana estão envolvidas com o processo de infetividade do parasito, tendo em vista que o tratamento do promastigota com metil- β -ciclodextrina, um agente que causa desestabilização dos microdomínios, promove diminuição significativa na infectividade, sugerindo assim um importante papel dos microdomíneos lipídicos e seus componentes na virulência do parasito (YONEYAMA, 2006; OLIVIER, 2012).

Os PPGs podem ser adicionados à âncoras de GPI no retículo endoplasmático ou ser secretado tanto pelo promastigota (forma filamentosa)

quanto pelo amastigota (forma não filamentosa). Acredita-se que a forma filamentosa dos PPGs esteja relacionada com o aumento do número de picadas dos flebotomíneos, elevando assim a chance de transmissão da doença (ILG, 2000; ROGERS et al., 2004). Além desta ação no vetor, os PPGs estão envolvidos com a modulação da atividade da arginase, enzima que gera poliaminas essenciais ao crescimento do parasito. Ainda por meio desta ação na arginase, os PPGs são capazes de reduzir a L-arginina, substrato necessário para que a enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) da célula hospedeira possa produzir o óxido nítrico (NO). Assim, os PPGs também atuam interferindo com a capacidade microbicida da célula hospedeira (ROGERS et al., 2009).

A glicoproteína ancorada via GPI, conhecida como GP63 ou leishmanolisina, é a principal glicoproteína presente em promastigotas e também pode ser encontrada em amastigotas. A GP63 é uma metaloprotease dependente de zinco com aproximadamente 60 kDa que parece estar associada com a clivagem da região C3b, auxiliando assim no escape do parasito da lise mediada pelo sistema complemento (BRITTINGHAM et al., 1995). Esta glicoproteína também foi encontrada interagindo com receptores de fibronectina, o que facilitaria a aderência das promastigotas ao macrófago (BRITTINGHAM et al., 1999). No amastigota a GP63 também parece ter um papel importante na sobrevivência desta forma parasitária no interior do fagolisossomo. Um estudo mostrou que proteínas revestidas com GP63 extraída da *Leishmania mexicana* e aprisionadas no fagolisossomo ficavam protegidas da degradação fagolisossomal (CHAUDHURI et al., 1989). Ainda, a redução na expressão de GP63 resulta em diminuição da sobrevivência intracelular da *L. (L.) amazonensis* (CHEN et al., 2000). Esses resultados confirmam o importante papel protetivo da GP63 em formas amastigota.

5. Manifestações clínicas.

As leishmanioses podem se apresentar sob duas principais formas: a leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A primeira forma, a LT, é causada por espécies de parasito que não apresentam tropismo por

órgãos, estando assim, relacionadas com o desenvolvimento de manifestações clínicas na pele e/ou mucosas. A segunda forma, a LV, envolve espécies que apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço e medula óssea, apresentando dessa forma, comprometimento desses órgãos (NEVES, 2011).

5.1 *Leishmaniose tegumentar (LT)*

A LT pode acometer tanto humanos quanto animais silvestres e domésticos e é classificada como uma enfermidade polimórfica, uma vez que pode provocar lesões tanto na pele e/ou mucosas (cutânea ou muco-cutâneo, respectivamente) em diferentes áreas do corpo, as quais podem resultar na desfiguração total ou parcial, além de gerar cicatrizes permanentes. (NEVES, 2011). Esta forma da doença apresenta uma elevada probabilidade de causar deformidades comprometendo, dessa forma, a vida psicossocial e econômica do indivíduo afetado. A LT encontra-se entre as seis doenças infecciosas de maior importância no mundo (BRASIL, 2013; SKRABA et al., 2014).

Uma ampla variedade de formas clínicas associadas à LT pode ser encontrada nos pacientes. A espécie do parasito, as condições ambientais e a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção serão de extrema importância para o direcionamento da manifestação clínica (BRELAZ et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Neste contexto, a LT pode ser subdividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (NEVES, 2011).

- Leishmaniose cutânea (LC):

A LC é a forma mais comum da doença, sendo caracterizada por lesões ulcerativas, indolor, com formato arredondado, bordas delimitadas e elevadas, estando confinadas na derme. A LC geralmente está presente em locais do corpo os quais ficam expostos à picada, como por exemplo, braços, pernas e rosto. Quando não tratadas as lesões podem se desenvolver para auto-cura ou podem ainda permanecerem ativas por vários anos, podendo coexistir com

lesões mucosas que podem surgir posteriormente (NEVES, 2011; BRASIL, 2013). As principais espécies associadas LC e prevalentes no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) lainsoni* (NEVES, 2011).

- Leishmaniose cutaneomucosa (LCM):

A LCM compromete de forma parcial ou total a mucosa do nariz, boca e garganta, promovendo uma destruição tecidual progressiva da cartilagem com o aparecimento de lesões desfigurantes associada a uma resposta inflamatória exacerbada (AMATO et al., 2003, 2008, TUON et al., 2008; PALMEIRO et al., 2012). As espécies mais comuns no Brasil associadas com o desenvolvimento desta forma clínica são a *L. (V.) braziliensis* e menos comumente a *L. (V.) guyanensis*. Pacientes com a forma mucosa frequentemente apresentaram no passado lesões compatíveis com a forma cutânea, sendo que uma parte dos pacientes apresentaram ausência de tratamento, ou ainda um tratamento inadequado, os quais resultaram no desenvolvimento da forma mucosa. (NEVES, 2011; BRASIL, 2013).

- Leishmaniose cutânea difusa (LCD):

A LCD é uma forma clínica relativamente rara e que requer muita atenção, já que consiste em uma forma grave da doença, com caráter progressivo e que não responde bem ao tratamento convencional. Esta manifestação clínica é caracterizada por lesões difusas formando nódulos não ulcerados por toda a pele, apresentando um grande número de amastigotas. A principal espécie prevalente no Brasil associada com a LCD é a *L. (L.) amazonensis* (NEVES, 2011; BRASIL, 2013).

Aproximadamente 40% dos pacientes parasitados com *L. (L.) amazonensis* desenvolvem a forma cutânea difusa da doença, uma vez que podem ocorrer metástases do parasito através dos vasos linfáticos ou da migração através dos macrófagos parasitados (NEVES, 2011).

5.2 Leishmaniose visceral (LV)

A LV, também conhecida como Kala-Azar, é uma doença crônica, grave e que apresenta uma alta letalidade quando não tratada. Apesar de existir tratamento disponível, esta forma clínica é responsável por uma alta taxa de mortalidade, sendo classificada pela OMS como uma das doenças mais relevantes transmitidas por vetores. Os sintomas podem variar desde manifestações oligossintomáticas até manifestação graves, as quais incluem febre prolongada e irregular, hepatoesplenomegalia e/ou linfadenopatia, perda de peso e anemia, podendo apresentar ainda desnutrição grave, icterícia, hemorragia e ascite. Os órgãos mais acometidos são o baço, fígado, linfonodos e medula óssea e os fatores de risco que estão associados à esta forma clínica são: desnutrição, coinfeção com HIV e uso de fármacos imunossupressores ou drogas ilícitas (NEVES, 2011; ALVAR 2012). A LV está presente no mundo todo e seus agentes etiológicos compreendem: *L. (L.) donovani*, encontrada principalmente na África e Índia e *L. (L.) infantum*, encontrada na Europa, Norte da África e América Latina (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000 e LUKES et al., 2007)

A LV pode evoluir da forma aguda para forma crônica e ainda apresenta o risco do desenvolvimento de uma forma cutânea crônica conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK). A LDPK é uma manifestação provocada pela espécie *L. (L.) donovani* em pessoas que fizeram o tratamento da LV. É caracterizada pela ocorrência de áreas com hipopigmentação, pápulas ou máculas e às vezes nódulos, além disso, a LDPK ocorre principalmente nas regiões como face, tronco e membros (NEVES, 2011; BRASIL, 2014).

6. Tratamento

A escolha da terapia das leishmanioses está fundamentada em alguns critérios importantes, como por exemplo, a espécie do parasito, sua epidemiologia e os aspectos clínicos do paciente (COELHO, 2010). Neste sentido a OMS preconiza como tratamento farmacológico as seguintes drogas:

antimoniais pentavalentes, pentamidinas, anfotericina B, paramomicina e miltefosina (tabela 2).

Tabela 2: Drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses associadas com dados de eficácia, vantagens, limitações e custo.

Droga	Eficácia	Vantagens	Limitações	Custo (\$)
Anfotericina B	> 95 %	Eficiente contra espécies resistentes ao antimonial pentavalente;	Pode causar miocardite, hipocalemia, toxicidade renal e reações no local da infusão;	~ 100
Anfotericina B lipossomal	~ 100 %	Não foram documentados casos de resistência; Baixa toxicidade;	Elevado custo; Toxicidade renal;	280
Miltefosina	94 - 97 %	Altamente potente; Primeira droga oral contra LV e LT;	Elevada toxicidade, sobretudo no fígado e rins; Complicações gastrointestinais; Causa teratogenicidade;	~ 70
Paramomicina	95 % (Índia) 46 - 85 % (África)	Baixo custo;	Dor no local da injeção; Hepatotoxicidade; Ototoxicidade reversível;	10
Pentamidina	70 - 80 %	Uso potencial em terapias combinadas;	Toxicidade renal; Miocardites; Hipotensão e hipoglicemia; Febre;	~ 100
Antimoniais Pentavalentes: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio	35 - 95%	Baixo custo; Pode ser usado combinado com a Anfotericina B em pacientes grávidas ou em idosos;	Resistência ao fármaco (Observada na Índia); Complicações cardíacas e arritmias fatais; Artralgia, mialgia, pancreatite; Aumento da Toxicidade em pacientes HIV positivos;	50 - 70

Fonte: Modificada de NAGLE, 2014.

6.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalente têm sido extensivamente utilizados na terapêutica das leishmanioses, sendo o mesmo indicado como droga de primeira escolha desde 1945 nos diversos locais do mundo (RAMA et al., 2015). O primeiro relato sobre o uso dos antimoniais em *Leishmania* foi realizado pelo médico brasileiro Gaspar Vianna que mostrou o uso da forma

trivalente (SbIII) para o tratamento da leishmaniose muco-cutânea (VIANNA, 1912). A atividade anti-*Leishmania* foi confirmada posteriormente também para a leishmaniose visceral na Itália e na África (DI CRISTINA; CARONIA, 1915; COLE, 1944). Entretanto, devido à elevada toxicidade produzida por esta droga, anos depois a forma pentavalente do antimonial (SbV) foi descoberta e é utilizada até os dias atuais para o tratamento da maioria das leishmanioses (RATH, 2003).

Os SbV podem se apresentar sob duas formas diferentes, o antimoniato de meglumina, também conhecido comercialmente como Glucantime® e o estibogluconato de sódio, conhecido comercialmente por Pentostan®. As duas exibem uma baixa absorção oral sendo, portanto administradas via parenteral (via intramuscular ou intravenosa) (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; RATH et al., 2003).

Apesar do uso extensivo do SbV o mecanismo de ação da droga ainda não está completamente elucidado. Várias investigações têm sido realizadas a fim de entender sua atuação no parasito. Neste contexto duas hipóteses são consideradas: **I)** A primeira é baseada na possibilidade do SbV se comportar como uma pró-droga a qual sofreria redução biológica para sua forma mais ativa/tóxica, o SbIII. Entretanto, o mecanismo pela qual esta redução ocorre ainda permanece contraditório. O SbIII possivelmente atua na inibição da tripanotiona redutase, enzima que, conforme descrito anteriormente, é responsável por regenerar a tripanotiona reduzida, essencial para a destruição do H₂O₂ pelo sistema tripanotiona/triparredoxina peroxidase. Assim, o SbIII resultaria na morte do parasito por interferir no balanço redox do parasito. Outra possível ação para o SbIII seria a ligação em proteínas envolvidas na replicação e reparo do DNA do parasito, interferindo assim na sua capacidade de multiplicação (HALDAR; SEN; ROY, 2011 FERREIRA et al, 2003). **II)** O segundo modelo prevê que o SbV seja o responsável por produzir o efeito anti-*Leishmania*. Entretanto, é discutido se o SbV atue diretamente no parasito ou se a droga promova ativação dos macrófagos, induzindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Os antimoniais estão associados à uma série de efeitos adversos, tais como mialgia, artralgia, cefaleia, febre, náuseas e vômitos, podendo resultar em efeitos mais graves como hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e toxicidade

renal. Além disso, os pacientes precisam ficar hospitalizados, uma vez que a droga deve ser administrada por via parenteral e com monitoração dos pacientes. A respeito da contraindicação, os antimoniais não devem ser utilizados por pacientes com insuficiência renal e hepática ou por mulheres grávidas (possibilidade de teratogenicidade) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Outro grande problema associado com esta terapia consiste na elevada taxa de resistência que vem sendo observada. Estudos recentes desenvolvidos na Índia mostram que a resistência aos antimoniais pode chegar até 65 % dos casos (CABALLERO; SALAS; SANCHEZ-MORENO, 2015).

No Brasil, preconiza-se o uso dos antimoniais pentavalentes como droga de primeira escolha tanto para LT quanto para LV. Não havendo resposta satisfatória do tratamento ou em casos de contraindicação, as drogas de segunda escolha utilizadas são: as pentamidinas e a anfotericina B para LT e para a LV a anfotericina B e suas formulações lipossomais, as pentamidinas ou ainda imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF) sendo que, as duas últimas formulações encontram-se em fase de investigação (BRASIL, 2013; BRASIL 214).

6.2 Pentamidinas

A pentamidina foi originalmente utilizada para o tratamento da tripanossomíase Africana (LOURIE et al., 1939, 1942). Seu primeiro uso no tratamento da LV foi reportado em 1949 na Índia e em 1950 na Espanha (HAZARIKA, 1949; MARTINEZ; GUASCH; LLAURADO, 1950). Estruturalmente esta droga consiste em uma diamina aromática, disponível em duas formas diferentes: o isotionato de pentamidina ou comercialmente conhecido como pentamidina® e o mesilato de pentamidina, comercialmente conhecido como lomidina® (DE PAULA et al., 2003).

O mecanismo de ação das pentamidinas ainda não está bem esclarecido. Entretanto, acredita-se que a droga possa interferir na biossíntese de macromoléculas tais como DNA, RNA, proteínas e fosfolipídeos

(MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Este medicamento pode levar a um quadro de hipoglicemia seguido de hiperglicemia, já que as pentamidinas podem induzir a citólise das células beta do pâncreas por um mecanismo que ainda não está bem definido. Portanto, o paciente que faz o uso desta medicação deve ser orientado a alimentar-se anteriormente, assim como permanecer em repouso 15 minutos antes e depois da administração do medicamento (BRASIL, 2013).

No Brasil, a pentamidina tem sido utilizada como droga de segunda escolha para o tratamento da LT ou LV (MITROPOULOS;KONIDAS;DURKIN-KONIDAS, 2010). A droga também tem sido empregada como primeira escolha para a leishmaniose cutânea causada pela *L. (V.) guyanensis* na Guiana Francesa e no Suriname (ROUSSEL et al., 2006).

Os efeitos adversos mais comuns associados à terapia com as pentamidinas são hipoglicemia e hiperglicemia, náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, síncope e Lipotímia (perda da força muscular, porém sem a perda da consciência), além de dor e abscessos no local da aplicação. Além disso, as pentamidinas são contraindicadas em caso de gestação, diabetes, insuficiência renal e hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 48 kg (BRASIL, 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

6.3 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico isolado inicialmente do microrganismo *Streptomyces nodosus* na década de 50 com potente ação antifúngica. A ação deste antibiótico foi primeiramente reportada em 1960 por meio de estudos *in vitro* os quais avaliaram o efeito da Anfotericina B em *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FURTADO;CISALPINO;SANTOS, 1960). O primeiro relato associado ao tratamento de pacientes com a Anfotericina B que obteve sucesso foi realizado no Brasil no ano de 1963 em três indivíduos que apresentavam a LV (PRATA, 1963).

A anfotericina B é uma potente droga leishmanicida que atua tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota e apresenta toxicidade

seletiva, devido à sua interferência nos ésteres da membrana citoplasmática (preferencialmente o ergosterol) da *Leishmania*, levando à formação de poros na membrana parasitária, os quais aumentam a permeabilidade e promovem influxo de íons. Esse processo gera alterações no balanço iônico, culminando com a morte do parasito (HANDLER et al., 2015).

Entre os principais efeitos adversos resultantes da utilização da anfotericina B estão: febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão, além de efeitos adversos importantes como anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas. A anfotericina B não deve ser utilizada por cardiopatas, hepatopatas e principalmente nefropatas. Adicionalmente é necessário realizar o monitoramento semanal por meio de exames como o eletrocardiograma, dosagens de enzimas hepáticas (transaminases e fosfatase alcalina), além de dosagem dos marcadores de função renal (ureia e a creatinina) (BRASIL, 2013).

A anfotericina B é utilizada no Brasil como droga de segunda escolha para o tratamento de LT e LV. Entretanto em algumas regiões a droga tem sido comumente utilizada para o tratamento da LV e em situações onde a resistência ao antimonial é muito difundida (BRASIL, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Devido à elevada toxicidade da anfotericina B e aos extensos efeitos adversos causados por ela, uma nova apresentação deste medicamento têm sido desenvolvida, a anfotericina B lipossomal. Trata-se de uma formulação onde a anfotericina B é incorporada em lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nesta formulação a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que a anfotericina B, além de estar relacionada com a diminuição de efeitos adversos. Entretanto, seu valor agregado é elevado, constituindo assim um importante obstáculo para os Órgãos de Saúde (BRASIL, 2013; NAGLE et al., 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

No Brasil, a anfotericina B lipossomal está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o uso no tratamento da LV e não da LT. Entretanto, o uso na LT está restrito aos casos no qual outras terapias são contraindicadas ou quando não apresentam sucesso terapêutico (BRASIL, 2013).

6.4 Paramomicina

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídico de amplo espectro isolado da bactéria *Streptomyces krestomuceticus* que bloqueia a síntese de proteínas ao se ligar ao RNA ribossomal, sendo indicado para infecções do trato gastrointestinal (NAGLE, 2014). As formulações deste medicamento para o tratamento de LV têm sido designadas para uso por via parenteral. Em caso de LT, tanto a via parenteral quanto a via tópica são indicadas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Os efeitos adversos associados à paramomicina incluem: prurido, erupção cutânea e ardência, para as formulações de uso tópico; e ototoxicidade, instabilidade vestibular e nefrotoxicidade, para as formulações de uso sistêmico (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Uma das grandes vantagens deste fármaco está relacionada com o baixo custo do tratamento, uma vez que é necessário o investimento de somente 10 dólares por paciente (tabela 2) (NAGLE, 2014).

6.5 Miltefosina

A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como uma droga anti-câncer, tendo sua ação leishmanicida testada em 1996 por Croft e colaboradores os quais verificaram sua atividade *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996; NAGLE, 2014,).

Seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, entretanto, acredita-se que a droga atue de forma semelhante ao mecanismo de ação em células tumorais, envolvendo a apoptose e a perturbação da via de sinalização celular dependente de lipídeos (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A miltefosina tem apresentando bons resultados, principalmente para o tratamento oral de LT, uma vez que a mesma apresenta uma baixa toxicidade quando comparada com os antimoniais (MACHADO et al., 2010). A droga também é utilizada como segunda escolha para o tratamento de LV em alguns países. Entretanto, no Brasil a miltefosina ainda não é utilizada para o

tratamento de nenhuma das leishmanioses (BRASIL, 2013; BRASIL 2014; NAGLE, 2014).

Os efeitos adversos associados com esta droga são náuseas, vômitos e ocasionalmente hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (NAGLE, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). As limitações desta terapia incluem o custo elevado da droga, necessidade de monitoramento dos efeitos gastrointestinais, teratogenicidade, além da sua elevada vulnerabilidade ao desenvolvimento de resistência ao medicamento (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Diante do exposto, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos os quais apresentem uma menor quantidade de efeitos colaterais, menor custo e facilidade de administração no paciente, uma vez que a maioria dos medicamentos atualmente disponíveis requer administração por via parenteral, com o paciente em um ambiente hospitalar.

7. Potencial terapêutico de complexos metálicos: complexos de rutênio

No âmbito da terapêutica a Química Bioinorgânica ou Bioquímica Inorgânica surge como uma importante área de estudo para a descoberta de novos fármacos. A Química Bioinorgânica teve seu marco na década de 60 por meio dos estudos de Rosenberg e colaboradores, os quais descreveram as propriedades antitumorais exibidas pela cis-platina, um complexo de Pt (III) (ROSENBERG, VANCAMP, KRIGAS, 1965).

O sucesso da cisplatina desencadeou uma intensa busca por metalodrogas que apresentassem atividade biológica. Assim, inúmeros estudos mostraram a utilização de complexos metálicos em diferentes patologias tais como o câncer (KOMEDA; CASINI, 2012; PEREIRA et al., 2015), problemas cardiovasculares (BATES et al., 1991) e parasitoses (SÁNCHEZ-DELGADO, 1993; MARTÍNEZ et al., 2012; BARBOSA et al., 2014).

Protozoários da família Trypanosomatidae são consideradas células altamente proliferativas, assim como as células tumorais. Essa alta taxa replicativa requer uma grande demanda de nutrientes, o que resulta em semelhanças metabólicas entre células tumorais e tais parasitos. Tendo em vista que muitas drogas antitumorais baseiam-se no impedimento de obtenção de nutrientes ou geração de energia suficiente para essa alta demanda

metabólica, é esperado que muitos agentes quimioterápicos apresentem ação contra protozoários tripanosomatídeos, como é o caso de *Leishmania* (BORST, 1977). Desta forma, o uso de complexos metálicos que apresentem atividade antitumoral tem representado uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias antiparasitárias (CABALLERO; SALAS; SANCHEZ-MORENO, 2015).

Os primeiros relatos envolvendo a aplicação de complexos metálicos em doenças parasitárias causadas por tripanosomatídeos foi realizado por Williamson e Farrell que verificaram a atividade *in vitro* de complexos relacionados com a cis-platina contra o *Trypanosoma rhodesiense* (FARRELL, 1989; FARRELL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984).

Várias tentativas de desenvolvimento de metalodrogas com ação antiparasitária estão em andamento e levam em consideração algumas estratégias (NAVARRO et al, 2010; GAMBINO; OTERO, 2012), sendo elas: a inclusão de um centro metálico na estrutura de uma droga antiparasitária para promover um aumento das propriedades farmacológicas devido a uma ação sinérgica entre a droga e o metal, através de múltiplos mecanismos de ação; a coordenação do metal com intercaladores de DNA para promover inibição da multiplicação do parasito; e coordenação do metal com ligantes ou inibidores que atuem especificamente em enzimas parasitárias por permitir o carregamento do metal de forma seletiva para o parasito.

A interação dos complexos metálicos com o DNA foi vista por LOWE e colaboradores através de um estudo que verificou a atividade *in vitro* da platina complexada a um intercalador de DNA (2,2':6',2''-terpyridine) em *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. O complexo sintetizado foi capaz de inibir 100% do crescimento das formas amastigota de *Leishmania donovani* e 78% das formas amastigota do *Trypanosoma cruzi* (LOWE, 1999). Outro estudo realizado *in vitro* utilizando o ouro complexado a intercaladores de DNA mostrou atividade anti-proliferativa dose-dependente em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) mexicana* (NAVARRO et al., 2007).

Inibidores de enzimas do sistema antioxidante presente em tripanosomatídeos também podem ser considerados alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que esses parasitos mantêm seu balanço redox por meio do sistema TR, exclusivo dos

tripanosomatídeos (KRAUTH-SIEGEL; BAUER; SCHIRMER, 2005; NAVARRO et al, 2007). A interferência no balanço redox foi verificada em um estudo realizado *in vitro* com complexos de paládio (II), o qual causou uma elevada inibição no crescimento de *Trypanosoma cruzi*. Os antimoniais possivelmente exercem interferência no balanço redox do parasito. Em 2009 Baiocco e colaboradores descreveram pela primeira vez a capacidade do SbIII, um semi metal, em inibir a tripanotona redutase de *Leishmania (Leishmania) infantum* (BAIOCCO et al., 2009).

A ideia de desenvolvimento de complexos metálicos com alta seletividade para biomoléculas do parasito em detrimento às biomoléculas do hospedeiro constitui um aspecto bastante interessante para o *design* de novos fármacos (NAVARRO et al., 2010). Esse direcionamento alvo-específico levaria o metal diretamente ao local de ação, minimizando as interações inespecíficas e reduzindo os efeitos colaterais (CABALLERO; SALAS; SANCHEZ-MORENO, 2015).

O rutênio (Ru) é um metal de transição e, assim como a platina, apresenta diferentes estágios de oxidação, sendo eles: Ru (II), Ru (III) e Ru (IV). A avaliação do potencial quimioterápico de complexos de rutênio, tanto no estado de oxidação II ou III tem sido amplamente realizada para inúmeras doenças. Seu uso como agente contra o câncer tem mostrado resultados bastante promissores e assim, pode ser considerado como uma alternativa ao tratamento antitumoral envolvendo o uso da platina. Alguns complexos de rutênio já se encontram em estado de triagem clínica para terapia contra o câncer (BRATSOS et al, 2007; HARTINGER et al, 2008).

Entre as principais propriedades químicas e biológicas relacionadas aos complexos de rutênio e que tornam esses complexos bastante interessantes para o desenvolvimento de novas drogas estão:

(1) A geometria octaédrica dos complexos de rutênio que oferece mais possibilidades de coordenação com alvos moleculares mais relevantes, além de favorecer mudanças no estado de oxidação do rutênio sem grandes exigências energéticas (GAMBINO; OTERO, 2012);

(2) Ambos os estados de oxidação biologicamente mais relevantes (II e III) exibem grande versatilidade de coordenação com átomos de enxofre e

nitrogênio, os quais estão presentes em moléculas como o DNA e proteínas (enzimas, proteínas celulares ou plasmáticas) (GAMBINO; OTERO, 2012);

(3) Os complexos de rutênio (III) podem sofrer redução para rutênio (II) por ação de enzimas celulares e, alternativamente, os complexos de rutênio (II) podem ser oxidados por ação do oxigênio molecular e citocromo oxidase, passando a rutênio (III) (ALLARDYCE et al, 2005). A mudança do estado de oxidação poderia ser explorada para o desenvolvimento de pró-drogas, que poderiam ser ativadas por bio-redução em estado de hipóxia em tecidos tumorais e ter sua atividade reduzida pela reoxidação em células normais e com disponibilidade de oxigênio, uma vez que os complexos de Ru (III) parecem ser mais inertes do que os de Ru (II). Inclusive, acredita-se que *in vivo* a ação dos complexos de Ru (III) seja dependente da bio-redução em complexos de Ru (II) (YAN et al, 2005);

(4) A baixa toxicidade em seres humanos, provavelmente devido à mimetização ao metabolismo do ferro, constitui um fator favorável ao uso desses complexos. Isso acontece porque os complexos de rutênio apresentam afinidade de ligação em biomoléculas como proteínas séricas (soroalbumina e transferrina) que contribuíram para diminuição da toxicidade do rutênio. Além disso, as semelhanças metabólicas com ferro contribuem para a absorção desses complexos em células tumorais, uma vez que estas células apresentam alta demanda de ferro em comparação às células normais. Inclusive, células tumorais exibem em sua superfície uma quantidade aumentada de receptores de transferrina, fato que favoreceria a entrada dos complexos de rutênio nas células tumorais (ALLARDYCE; DYSON, 2001; ANG; DYSON, 2006). Interessantemente, protozoários parasitas também apresentam alta demanda de ferro para sustentar as suas funções biológicas essenciais, sendo este mais um ponto favorável à avaliação do potencial desses complexos em parasitos.

O trabalho pioneiro de Sanchez-Delgado, a mais de 20 anos atrás, representou o ponto de partida para o uso de complexos de rutênio como metalodrogas para o tratamento de infecções parasitárias (SÁNCHEZ-DELGADO, 1993). Neste trabalho, a intenção foi elucidar a questão do sinergismo entre droga e metal e a multiplicidade de alvos farmacológicos. Assim, o pesquisador desenvolveu complexos de rutênio coordenados com as drogas clotrimazol (CTZ) – $[RuCl_2(CTZ)_2]$ e, posteriormente com o cetoconazol

(KTZ) (SÁNCHEZ-DELGADO et al, 1993; SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTI, 2004) . CTZ e KTZ são drogas antifúngicas que atuam por meio de inibição na via de biossíntese de esteróis e também exibem atividade moderada contra tripanosomatídeos. $[RuCl_2(CTZ)_2]$ apresentou *in vitro* uma atividade 10 vezes mais potente contra *T. cruzi* quando comparado a ação de CTZ livre (SÁNCHEZ-DELGADO, 1993). Ainda, com relação à hipótese de multiplicidade de alvos, ficou determinado que a ligação de $[RuCl_2(CTZ)_2]$ ao DNA promoveria a liberação de CTZ, o qual apresentaria sua clássica ação na via de biossíntese de esteróis (SÁNCHEZ-DELGADO et al, 1993; SÁNCHEZ-DELGADO et al, 1998; NAVARRO et al, 2000).

Complexos de rutênio coordenados com CTZ também mostraram sinergismo em *Leishmania*. Estudos *in vitro* mostraram que 8 complexos associados ao CTZ exibiram toxicidade contra formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) major* e que esta ação foi notadamente superior à atividade de CTZ livre. Ainda, alguns desses complexos associados ao CTZ apresentaram também atividade contra amastigota intracelular (MARTÍNEZ et al 2012). Em 2013, Iniguez e colaboradores testaram a atividade anti-*Leishmania* de complexos de rutênio coordenados com o KTZ e observaram que tais complexos associados apresentam atividade contra promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania (Leishmania) major* que também é superior a ação de KTZ livre (INIGUEZ;SÁNCHEZ;VASQUEZ, 2013).

Recentemente, outro estudo, mostrou que a coordenação de complexos de rutênio com lapachol, que detem ação antitumoral e antimicrobicida, resultou em complexos com atividade anti-*Leishmania* (promastigota e amastigota intracelular) mais potente do que o lapachol livre (BARBOSA et al., 2014). Os dados de atividade contra tripanosomatídeos obtidos com os complexos de rutênio associados com drogas, em conjunto, confirmam a ação sinérgica entre o metal e a droga e dessa forma, destacam o potencial terapêutico desses complexos metálicos.

Por fim, é evidente a necessidade de desenvolvimento de novas terapias para as leishmanioses, tendo em vista que as drogas atualmente disponíveis para o tratamento muitas vezes estão associadas com uma série de efeitos colaterais e com a possibilidade de resistência parasitária ao medicamento. Essa carência de medicamentos é resultado da falta investimento na pesquisa

voltada para a busca de novas drogas para o tratamento da leishmaniose. Dados publicados em 2013 revelam que nos anos de 2000 a 2011 um total de 850 novos produtos terapêuticos (novas entidades químicas, novas indicações, novas formulações, novas combinações de doses-fixadas e novas vacinas ou produtos biológicos) foram aprovados por diferentes entidades regulares. Deste montante somente 37 produtos (cerca de 4%) estavam relacionados com uso em doenças negligenciadas. Neste mesmo período, considerando somente as novas entidades químicas, de um total de 336 novos compostos, apenas 1% foi indicado para doenças negligenciadas. Tal fato comprova a necessidade de estudos voltados ao desenvolvimento de novas terapêuticas para este grupo de doenças (PEDRIQUE et al., 2013).

Considerando a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose e o potencial terapêutico dos complexos de rutênio, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial anti-*Leishmania* de 3 novos complexos de rutênio (II), bem como verificar seu efeito na interação parasito-hospedeiro.

Referências Bibliográficas

AAGAARD-HANSEN, J; NOMBELA, N; ALVAR, J. Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases, **Tropical Medicine & International Health**, v.15, p.1281 – 1288, 2010.

ALLARDYCE, C.S; DORCIER, A; SCOLARO C; DYSON, P.J. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals, **Bioorganometallic Chemistry**, v.19, p. 1-10, 2005.

ALLARDYCE, C.S; DYSON, P.J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects, **Platinum Metabolism**, v. 45, n.2, p. 62 – 69, 2001.

ALVAR, J; VELEZ, I.D; BERN, C; HERRERO, M; DESJEUX, P; CANO, J; JANNIN, J; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, **Plos One**, v.7, n.5, p. 1 - 12, 2012.

AMATO, V. S; ANDRADE, J. R; DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment, **Acta Tropica**, v.85, n. 1, p. 39 – 49, 2003.

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

ANG W.H; DYSON P.J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy, **European Journal of Inorganic Chemistry**, v.20, p. 4003-4018, 2006.

ANTOINE, J. C; PRINA, E; COURRET, N; LANG, T. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts, **Advances in parasitology**, v. 58, p. 1-68, 2004.

ARGAW, D; MULUGETA, A; HERREO, M; NOMBELA, N; TEKLU, T; TEFERA, T; ZEWDU, B; ALVAR, J; BERN, C. Risk factors for visceral leishmaniasis among residents and migrants in Kaft a-Humera, Ethiopia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.11, p.1 - 9, 2013.

BAIOCCO, P; COLOTTI, G; FRANCESCHINI, S; LLARI, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, n.8, p.2603 – 2612, 2009.

BALAÑA-FOURCE, R; REGUERA, R. M; CUBRÍA, J. C; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis, **General Pharmacology**, v. 30, n.4, p.435-443, 1998.

BARBOSA, M. I; CORREA, R. S; DE OLIVEIRA, K. M; RODRIGUES, C; ELLENA, J; NASCIMENTO, O. R; ROCHA, V. P; NONATO, F. R; MACEDO, T.

- S; BARBOSA-FILJO, J. M; SOARES, M.B; BATISTA, A. A. Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.136, p. 33 – 39, 2014.
- BARI, A. U; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship, **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v.18, p.42 – 48, 2008.
- BATES, J.N; BAKER, M.T; GUERRA, R; HÁRRISON, D.G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required, **Biochemical Pharmacology**, v,42, n.1, p.157 – 165, 1991.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies, **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n3, p.560-586, 1988.
- BESTEIRO, S; WILLIAMS, R. A. M; COOMBS, G. H; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*, **International Journal for Parasitology**, n.37, p.1063-1075, 2007.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BORST, P. Metabolism and chemotherapy of African trypanosomes, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p. 3 - 4, 1977.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2 ed. atual., 3. reimpr. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 180 p.: il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.
- BRATSOS, I; JEDNER, S; GIANFERRARA, T; ALESSIO, E. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations, **International Journal of Chemistry**, v. 61, p.692-697, 2007.
- BRELAZ, M. C. A; DE OLIVEIRA, A. P; DE ALMEIDA, A. F; DE ASSIS DE SOUZA, M; MEDEIROS, Â. C. R; DE BRITO, M. E. F; PEREIRA, V. R. A. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease, **Parasite immunology**, v. 34, n.4, p.236-239, 2012.

BRITTINGHAM, A; CHEN, G; MCGWIRE, B.S; CHANG, K.P; MOSSER, D.M. Interaction of *Leishmania* GP63 with cellular receptors for fibronectin, **Infection and Immunity**, v. 67, p.4477 - 4484, 1999.

BRITTINGHAM, A; MORRISON, C.J; MCMASTER, W.R; MCGWIRE, BS; CHANG, KP; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease GP63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis, **The Journal of Immunology**, v.155, p.3102 – 3111, 1995.

CABALLERO, A. B; SALAS, J. M; SANCHEZ-MORENO, M. Metal-based therapeutics for Leishmaniasis, **Science, Technology and Medicine open Access Publisher (INTECH)**, p.465 – 493, 2015.

CARINI, A; PARANHOS, U. Identification de l'ulcère de Baurú avec le bouton d'Orient, **Bulletin de la Société de pathologie exotique Journal**. v.2, p. 225 – 226, 1909.

CHAUDHURI, G; CHAUDHURI, M; PAN, A; CHANG, K.P. Surface acid proteinase (GP63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages, **Journal Biology Chemistry**, v. 264, p.7483 – 7489, 1989.

CHEN, D.Q; KOLLI, B.K; YADAVA, N; LU, H.G; GILMAN-SACHS, A; PERTERSON, D.A; CHANG, K.P. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of GP63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro, **Infection and Immunity**, v.68, p.80 – 86, 2000.

COELHO, L. I. A. R. C. Caracterização de *Leishmania* spp em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte, Brasil. Tese (Doutorado), 94p. – Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

COLE, A.C.E. Kala-azar in east Africa, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.37, p.409 – 435, 1944.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. J. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.38, n.6, p. 1041 – 1047, 1996.

DE PAULA, C. D. R; SAMPAIO, J. H. D; CARDOSO, D. R; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.3, p.365 - 371, 2003.

DI CRISTINA, G; CARONIA, G. "Sulla terapia della leishmaniosis interna, **Pathologica**, v.7, p. 82 – 83, 1915.

FARRELL, N. P. Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. In: R. Ugo, B. R. James (eds.) *Catalysis by Metal Complexes*, **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, v.11, p. 222-242, 1989.

FARRELL, N. P; WILLIAMSON, J, MCLAREN, D. J. M. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes, **Biochemical Pharmacology**, v.33, p. 961-971, 1984.

FERREIRA, C. S; MARTINS, P. S; DEMICHELI, C; BROCHU, C; OUELLETTE, M; FREZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione, **Biometals**, v. 16, n.3, p. 441–446, 2003.

FURTADO, T.A; CISALPINO, E. O; SANTOS U. M. *In vitro* studies of the effect of amphotericin B on *Leishmania braziliensis*, **Antibiotics and Chemotherapy**, p. 692 – 693, 1960.

GAMBINO D; OTERO L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs, **Inorganica Chimica Acta**, v.393, p. 103-114, 2012.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutânea, **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 96, n. 1, p. 1 - 24, 2005.

GIORGIO, S; SANTOS , M.R; STRAUS, A.H; TAKAHASHI, H.K; BARBIERI, C.L. Effect of glycosphingolipids purified from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes on human peripheral lymphocytes, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.3, p.469 – 472, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOSSAGE, S. M; ROGERS, M. E; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle, **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 1027 – 1034, 2003.

HALDAR, A. K; SEN, P; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions, **Molecular Biology International**, p.1-23, 2011, 2011.

HANDLER,M.Z; PATEL, P.A; KAPILA, R; AL-QUBATI,Y; SCHWARTZ,R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management, **Journal of the American Academy Dermatology**, v.73, n.6, p.911 – 926, 2015.

HARTINGER, C.G; JAKUPEC, M.A; ZORBAS-SEIFRIED, S; GROESSI, M; EGGER, A; BERGER, W; ZORBAS, H; DYSON, PJ; KEPPLER, B.K. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients, *Chemistry & Biodiversity*, v.5, n.10,p. 2140-2155, 2008.

HAZARIKA, A. N. Treatment of kala-azar with pentamidine isothionate; a study of 55 cases, *Indian Medical Gazette*, v.84, n.4, p.140 – 145, 1949.

HIDE, M; BUCHETON ,B; KAMHAWI, S, BRAS-GONÇALVES, R; SUNDAR , S; LEMESRE, J. L; BAÑULS, A. L. Chapter 6. Understanding Human Leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology, *Infectious Diseases*, 2006.

HOLM, A; TEJLE,K; MAGNUSSON,K.E; DESCOTEAUS,A; RASMUSSEN, B. Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation, *Cellular Microbiology*, v.3, n.7, p.439 – 447, 2001.

IIG, T. Proteophosphoglycans of Leishmania, *Parasitology Today*, v.16, n.11,p.489 – 497, 2000.

INIGUEZ, E; SÁNCHEZ, A, VASQUEZ, M.A; MARTÍNEZ, A; OLIVAS,J; SATTLER, A; SÁNCHEZ-DELGADO,R.A; MALDONADO, R.A. Metal-drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v.18, p.779–790, 2013.

KOMEDA, S; CASINI, A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 3, p. 219 - 235, 2012.

KRAUTH-SIEGEL, R.L; BAUER, H; SCHIRMER, R.G. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia, *Angewandte Chemie International Edition*, v.44, n.5, p.690 – 715, 2005.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia, *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, n.2, p. 13 – 32, 2010.

LAINSON, R; SHAW, J. J; SILVEIRA, F. T, BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n.3, p.517,1987.

LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'orient au Brésil, *Bulletin de la Société de pathologie exotique Journal*, v. 2, p. 252 – 254, 1909.

LOURIE, E. M. Treatment of sleeping sickness in Sierra Leone, **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v.36, p.113–131, 1942.

LOURIE, E. M.; ORKE, W. Studies in chemotherapy. XXI. The trypanocidal action of Certain aromatic diamidines, **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v.33, p. 289 – 304, 1939.

LOWE, G; DROZ, A.S; VILAIVAN, T; WEAVER, G.W; TWEEDALE, L; PRATT, J.M; ROCK, P; YARDLEY, V; CROFT, S.L. Cytotoxicity of (2,2':6',2''terpyridine) platinum(II) complexes to *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*, **Journal of Medicinal Chemistry**,v. 42, n.6, p.999 – 1006, 1999.

LUHE M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nachsten Verwandren. In: Mense C, Barth IA, editors. **Hanbuch der Tropenkrankheiten**; p. 203, 1906.

LUKES J; MAURICIO, I. L; SCHONIAN, G; DUJARDIN, J. C; SOTERIADOU, K; DEDET, J.P; KUHLS,K; TINTAYA, K. W; JIRKU, M; CHOCHOLOVÁ, E; HARALAMBOUS,C; PRATLONG,F; OBORNIK, M; HORÁK, A; AVALA, F. J; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.22,p. 9375 – 9380, 2007.

MACHADO, P.R; AMPUERO, J; GUIMARÃES, L.H; VILLASBOAS, L; ROCHA, A.T; SCHRIEFER, A; SOUZA, R.S; TALHARI, A;PENNA, G; CARVALHO, E.M. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.21, n.4, p.1 – 6, 2010.

MAROLI, M; FELICIANGELI, M. D; BICHAUD, L; CHARREL R, N; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern, **Medical and Veterinary Entomology**, v.27, p. 123 – 147, 2013.

MARTINEZ, G. P; GUASCH, J; LLAURADO, F. First cases of infantile kala-azar treated in Spain with diamidines (stilbamidine and pentamidine)], **Revista española de pediatría: clínica e investigación**, v.6, n.3, p.319 – 346, 1950.

MARTÍNEZ, A; CARREON, T; INIGUEZ,E; ANZELOTTI,A; SÁNCHEZ, A; TYAN, M; SATTLER, A; HERRERA, L; MALDONADO, R.A; SÁCHEZ-DELGADO, R.A. Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium – Clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosome cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p.3867–3877, 2012.

MATTA, A.A. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmaniose, Bulletin de la Société de pathologie exotique Journa, v. 9, p. 494-503, 1916.

- MAURÍCIO, I. L, STOTHARD, J. R, MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*, **Parasitol Today**, v.16, n.5, p.188 – 189, 2000.
- MCGWIRE, B. S; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **International Journal of Medicine**, v.107, p. 7-14, 2014.
- MIGONE, L.E. Un caso de kala-azar a Asunción (Paraguay), **Bull Soc Path Exot**, v.6, p. 118 – 120, 1913.
- MITROPOULOS, P; KONIDAS, P; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment, **Journal of American Academy of Dermatology**, v.63, n. 2, p. 309-322, 2010.
- NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis, **Chemical reviews**, v. 114, p. 11305 – 11347, 2014.
- NAVARRO, M, GABBIANI, C, MESSORI, L, GAMBINO, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives, **Drug Discovery Today**, v.15, p. 1070 – 1078, 2010.
- NAVARRO, M; HERNANDEZ, C; COLMENARES, I; FERNANDEZ, M; SIERRAALTA, A; MARCHÁN, E. Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n.1, p.111 – 116, 2007.
- NAVARRO, M; LEHMANN, T. E; CISNEROS-FARJADO, E. J; FUENTES, A; SÁNCHEZ-DELGADO, R. A; SILVA, P; URBINA, J. A. "Toward a Novel Metal Based Chemotherapy Against Tropical Diseases 5. Synthesis and Characterization of New Ru(II) and Ru(III) Clotrimazole and Ketoconazole Complexes and Evaluation of Their Activity Against *Trypanosoma Cruzi*", **Polyhedron**, v. 19, p. 2319-2325, 2000.
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 12 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2011.
- OKWOR, I; UZONNA, Y.E. The immunology of *Leishmania*/HIV coinfection, **Immunologic Research**, v.56, n.1, p.163 – 171, 2013.
- OLIVIER, M; GREGORY, D.J; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view, **Clinical Microbiology. Reviews**, v. 18, p.293 – 305, 2005.
- OLIVIER, M; ATAYDE, V.D; ISNARD, A; HASSANI, K; SHIO, M.T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63, **Microbes and infection**, p. 1 – 13, 2012.

OMS – Organização Mundial de Saúde – Disponível em:
<http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Consulta dia 12/05/2016.

PALMEIRO, M. R; MORGADO, F. N; VALETE ROSALINO, C. M; MARTINS, A. C; MOREIRA, J; QUINTELLA, L. P; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis, **Parasite Immunology**, v. 34, n.1, p. 23 – 31, 2012.

PEDRIQUE, B; STRUB-WOURGAFT, N; SOME, C; OLLIARO, P; TROUILLER, P; FORD, N; PÉCOUL, B; BRADOL, J.H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment, **Lancet Global Health**, v.1, n.6, p.371 – 379, 2013.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil- Medico**, n. 48, p. 949-50, 1934.

PEREIRA, F.C; LIMA, B.A.V; DE LIMA, A.P; PIRES, W.C; MONTEIRO, T; MAGALHAES, L.F; COSTA, W; GRAMINHA, A.E; BATISTA, A.A, ELLENA, J; SILVEIRA-LACERDA, E.P. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene), **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.149, p.91 – 101, 2015.

Pizarro P. Relación de la conquista del Perú. Colección de libros y documentos referentes a la historia del Perú. Vol VI (1st Series). Lima: Collection UrteagaRomero; 1571.

PRATA, A. Treatment of kala-azar with amphotericin B, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, n.4, p.266 – 268, 1963.

RAMA, M; KUMAR, N. V. A; BALAJI, S. A comprehensive review of patented antileishmanial agents, **Pharmaceutical Patent Analyst**, v.4, n1, p.37 – 56, 2015.

RATH,S; TRIVELIN, L. A; IMBRUNITO, T. R; TOMAZELA, D. M; DE JESUS, M. N; MARZAL, P. C; JUNIOR, H. F. A; TEMPENE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte, **Química Nova**, v.6, n.4, p.550 – 555, 2003.

ROBERTS, M. T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment, **British Medical Bulletin**, v.17, p. 115 – 130, 2006.

ROGERS, M.E; IIG,T; NIKOLAEV, A.V; FERGUSON, M.A; BATES, P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG, **Nature**, v. 430, p.463 – 467, 2004.

ROGERS, M.E; KROPF, P; CHOI, B.S; DILLON, R; PODINOVSKAIA, M; BATES, P; MULLER, I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival, **Plos Pathog**, v.5, 2009

ROGERS, M.E; HAJMOVÁ, M; JOSHI, M.B; SADLOVA, J; DWYER, D.M; VOLF, P; BATES, P.A. Leishmania chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice, **Cellular Microbiology**, v.10, n.6, p.1363-1372, 2008.

ROSENBERG, B; VANCAMP, L; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, **Nature**, v.205, p. 698-699, 1965.

ROUSSEL, M; NACHER, M; FREMONT, G; ROTURNEAU, B; CLYTI, E; SAINTE-MARIE, D; CARME, B; PRADINAUD, R; COUPPIE, P. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana, **Annals of Tropical Medicine and Public Health**, v.100, n.4, p.307 – 314, 2006.

SACKS, D; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice, **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.11, p.845 – 858, 2002.

SÁNCHEZ-DELGADO, R.A; NAVARRO, M; LAZARDI, K; ATENCIO, R; CAPPARELLI, M; VARGAS, F; URBINA, J.A; BOUILLEZ, A.; NOELS, A.F; MASI, D. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*, **Inorganica Chimica Acta**, p.275–276, 1998.

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A; LAZARDI, K; RINCH, L; URBINA, J. A. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 1. Enhancement of the Efficacy of Clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by Complexation to Ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, n.14, p. 2041 – 2043, 1993.

SÁNCHEZ-DELGADO, R.A; ANZELLOTTI, A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 23-30, 2004.

SHIO, M.T; HASSANI, K; ISNARD, A; RALPH, B; CONTRERAS, I; GOMEZ, M.A; ABU-DAYYEH, I; OLIVIER, M. Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion, **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.1 – 14, 2012.

SIGNORI, M; CASSINI, R; DRIGO, M; DI FRANGIPANE, R. A; PIETROBELLI, M; MONTARSI, F; STENSGAARD, A.S. Ecological niche model of *Phlebotomus perniciosus*, the main vector of canine leishmaniasis in north-eastern Italy, **Geospatial Health**, v. 9, p. 193 – 201, 2014.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SKRABA, C. M; PEDROSO, R. B; FIORINI, A; ROSADO, F. R; ARISTIDES, S. M; LONARDONI, M. V; TEIXEIRA, J. J, SILVEIRA, T. G. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. An update oh pharmacotherapy for leishmaniasis, **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n.2, p.237 - 252, 2015.

TUON, F. F; GOMES-SILVA, A; DA-CRUZ, A. M; DUARTE, M. I, NETO, V. A; AMATO, V. S. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis, **Clinical Immunology**, v.128, n.3, p.442 – 446, 2008.

VIANNA G. Sobre uma nova especie de *Leishmania* (Nota Preliminar), **Brasil-Medico**; v.25, p.411, 1911.

VIANNA, G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético, **7 Congresso Brasileiro de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 426-428, 1912.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa, **Molecular Aspects of Medicine**, v.25, p.211-220, 2004.

VIEIRA, E. L; KEESEN, T.S; MACHADO, P.R; GUIMARÃES, L.H; CARVALHO, E.M; DUTRA, W.O; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size, **Parasite Immunol**, v. 35, n.2, P.65-72, 2013.

WHO, World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2015.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis: strengthening cross-border collaboration for control in central Asian and middle-eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean Regions, 2014.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"), **Journal of International Medical Research**, v.10, n.3, p.472 – 482, 1903.

YAN, Y.K; MELCHART, M; HABTEMARIAM, A; SADLER, P.J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes, **Chemical Communications**, v. 14, n.38, p. 4764-76, 2005.

YONEYAMA, K.A. Caracterização de microdomínios de membrana resistentes a detergente não-iônico em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Papel dos microdomínios na infectividade. 2006.(148f). Tese (Doutorado em Biologia Molecular – DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

YONEYAMA, K.A; TANAKA, A.K; SILVEIRA, T.G; TAKAHASHI, H.K; STRAUS, A.H. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity, The **Journal of Lipid Research**, v. 47, p.2171 - 2178, 2006.

Capítulo 2

Manuscrito

Anti-*Leishmania* activity of new ruthenium (II) complexes: effect on parasite-host interaction

Mônica S. Costa^a, Yasmim G. Gonçalves^b, Débora C. O. Nunes^{a,e}, Danielle R. Napolitano^{c,e}, Pedro I. S. Maia^d, Renata S. Rodrigues^{a,e}, Veridiana M. Rodrigues^{a,e}, Gustavo Von Poelhsitz^b, Kelly A. G. Yoneyama ^{a*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia–MG, Brazil; ^b Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia–MG, Brazil; ^c Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia–MG, Brazil; ^d Instituto de Ciências Naturais, Exatas e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba–MG, Brazil; ^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901, Belo Horizonte–MG, Brazil.

***Corresponding author:** Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama

Phone.: +3432182203 Fax: +55 34 3225 8436 #21 – Laboratory address: Pará avenue, 1720 CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: kelly.tudini@ufu.br.

Abstract

Objectives: The present study aims to evaluate the anti-*Leishmania* potential of new ruthenium (II) complexes (**1–3**) in the promastigote cytotoxicity and their effect on parasite-host interaction.

Methods: The cytotoxicity of complexes was analyzed by MTT assay on promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum* and murine macrophages cell line RAW 264.7. The effect of complexes on parasite-host interaction was evaluated by *in vitro* infectivity assay performed in the presence of two different concentrations of each complex: IC₅₀ value for promastigote and non-toxic concentration for 90% of RAW 264.7 macrophages.

Results: Complexes **1-3** exhibited potent cytotoxic activity against all *Leishmania* species assayed. The IC₅₀ values ranged from 7.52 – 12.59 µM

(complex 1); 0.70 – 3.28 μ M (complex 2) and 0.52 – 1.17 μ M (complex 3). All complexes caused significant inhibitions on infectivity index for both tested concentrations. The infectivity inhibitions ranged from 37 to 85%. Interestingly, the statistical analysis comparing the infectivity inhibitions due the complex action for both tested concentrations showed no significant difference, except for the complex 2 on *Leishmania (Leishmania) infantum*. The infectivity inhibitions were result of reductions both in percentage of infected macrophages and number of parasites per macrophage.

Conclusions: Taken together the results suggest remarkable leishmanicidal activity *in vitro* for these new ruthenium (II) complexes.

Keywords: cytotoxicity, infectivity inhibition, *Leishmania*, ruthenium (II) complexes.

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoan parasites distributed in more than 21 species of the *Leishmania* genus and its transmission to humans occurs through the bite of infected female sandflies.^{1,2} The disease is endemic in over 98 countries, predominantly in tropical, subtropical and southern Europe regions and it is estimated that 350 million people are at risk of infection.^{2,3} Based on clinical manifestations, leishmaniasis is classified into: Tegumentary Leishmaniasis (TL) that affects the skin (cutaneous) and/or mucous membranes (mucocutaneous), causing ulcers in different areas of the body, which can result in permanent scarring and disfigurement; and Visceral Leishmaniasis (VL), a severe form of the disease that affects organs, especially liver and spleen, and if untreated it can be fatal.⁴ In Brazil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* are the main causative species of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), leading to the cutaneous and mucocutaneous forms, respectively.^{5,6,7} *Leishmania (Leishmania) infantum* is the species most commonly isolated in patients with VL in Latin America and North Africa and recent studies have shown an increase of VL infections worldwide.^{5,8}

The current available treatment for ATL relies on pentavalent antimony as first choice drug, and pentamidines, amphotericin B or paromomycin as second choice drugs. Unlike ATL, the drug of first choice which has been used for VL treatment is amphotericin B.¹ However, the drugs used for treating leishmaniasis present several limitations, including high toxicity, side effects, increased resistance, high cost, complex therapeutic scheme, among others.^{9,10,11,12} In this context, the search for new therapeutic approaches with high efficacy, lower toxicity and cost becomes essential.

Inorganic medicinal chemistry represents a very promising and attractive area in controlling various diseases, through the development of new therapeutic agents based on bioactive metal complexes.^{13,14} This area had its landmark in the 60s with the discovery of antitumoral properties displayed by *cis*-diamminedichloroplatinum (II), also known as cisplatin¹⁵. Several studies have demonstrated the potential use of metal complexes in different pathologies such as cancer^{16,17} and parasitary diseases.^{18,19,20}

In this perspective the ruthenium complexes stand out for their use in various medical applications mainly due to low toxicity and biological activity against some types of diseases.^{21, 22, 23, 24} Some chemical and biological properties exhibited by ruthenium complexes make these molecules very interesting for new drugs development. Among these properties are: (1) versatility in ligand exchange that determines the biological activity of the molecule²⁵; (2) octahedral geometry, which offers possibilities of coordination to relevant molecular targets¹³; (3) variability on redox potential that could be exploited to obtain prodrugs based on ruthenium²⁶; (4) the low toxicity in humans, probably due the mimicking iron metabolism.²⁷ About this last property, the ruthenium compounds are capable to bind to biomolecules like serum proteins (serum albumine and transferrin) which contribute to decrease the toxicity of the ruthenium. Furthermore, the metabolic similarities with iron helped on uptake some ruthenium-based antitumorals selectively into cancer cells once these cells show higher iron requirements when compared with normal cells. As cancer cells, parasitic protozoa presented a demand for iron higher than normal host cells to sustain their essential biological functions. Thus, the effectiveness in iron acquisition is a pre-requisite for parasite survival. Lastly, considering the mimicry iron metabolism by ruthenium compounds, the uptake in parasite could

be favored resulting in a more selective action. In the same way the camouflaged entrance of antiparasitic organic ligands coordinated to ruthenium could be a way to bypass the parasite resistance.¹³

In the search for a new class of lead compounds to treat *Leshmaniasis*, this paper describes the antiparasitic activity of the three new ruthenium complexes, of general formulae $cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CR)(dppm)_2]PF_6$, with $dppm = bis(diphenylphosphino)methane$ and $R = 4\text{-butylbenzoate } \mathbf{1}$, $4\text{-(methylthio)benzoate } \mathbf{2}$ and $3\text{-hydroxy-4-methoxybenzoate } \mathbf{3}$ on *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* species.

2. Materials and methods

2.1. Chemistry

For the synthesis of the three ruthenium complexes, all analytical reagents were purchased and used without further purification. The procedures that specify the preparation of each of them are indicated below.

2.1.1 Synthesis of $cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CR)(dppm)_2]PF_6$ complexes

The precursor complex was synthesized as described in the literature.²⁸ Briefly, an methanolic solution of $cis-[RuCl_2(dppm)_2]$ (0.1063 mmol, 0.1000 g in 20 mL) was added to a methanolic solution containing ligands, for **1** 0.1184 mmol of 4-buthylbenzoate, 0.0211 g in 5 mL; for **2** and **3** 0.1167 mmol of 4-(methylthio)benzoate and 3-hydroxy-4-methoxybenzoate, respectively, 0.0196 g in 5 mL) and followed by the addition of 29 μ L of triethylamine, the mixture was refluxed for 24h. Into the resulting clear yellow solutions for **1** and **2** and green solution for **3**, was added an aqueous solution of ammonium hexafluorophosphate (0.1169 mmol, 0.0190 g) the precipitated was filtered off and dry under reduced pressure before characterization.

Anal. Calcd for $C_{61}H_{58}F_6P_5O_2Ru$ **1**: exptl (calc) C, 61.46 (61.41); H, 4.89 (4.90). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (161.98 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K): δ (ppm) 8.75(t) and -12.22(t); $J_{P-P} = 39.09$ Hz. NMR 1H δ ppm (mult./int.): 7.76(dd, 4H); 7.66(dd, 4H); 7.61(d, 2H); 7.45(m, 4H); 7.38(t, 2H); 7.32(dd, 8H); 7.23(dd, 4H); 7.07(dd, 4H); 6.99(t, 8H);

6.15(dd, 4H); 4.60(m, 2H); 3.90(m, 2H); 2.70(t, 2H); 1.65(m, 2H); 1.39(m, 2H); 0.96(t, 3H).

Anal. Calcd for $C_{58}H_{52}F_6P_5SO_2Ru$ **2**: exptl (calc) C, 58.93 (58.88); H, 4.35 (4.43). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (161.98 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K): δ (ppm) 8.78(t) and -12.14(t); $J_{P-P} = 39.10$ Hz. NMR 1H δ ppm (mult./int.): 7.75(dd, 4H); 7.64 (dd, 4H); 7.60(d, 2H); 7.43(tt, 6H); 7.32(m, 2H); 7.25(d, 2H); 7.23(d, 2H); 7.06(dd, 4H); 6.99(dd, 8H); 6.16(dd, 4H); 4.61(m, 2H); 3.91(m, 2H); 2.55(s, 3H).

Anal. Calcd for $C_{58}H_{52}F_6P_5O_4Ru$ **3**: exptl (calc) C, 58.94 (58.89); H, 4.35 (4.43). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (161.98 MHz, CD_2Cl_2 , 298 K): δ (ppm) 8.74(t) and -12.36(t); $J_{P-P} = 39.12$ Hz. NMR 1H δ ppm (mult./int.): 7.75(dd, 4H); 7.64(dd, 4H); 7.45(m, 4H); 7.37(t, 2H); 7.32(dd, 10H); 7.24 (t, 2H); 7.07(dd, 4H); 6.99(dd, 8H); 6.87(d, 1H); 6.14(dd, 4H); 4.58(m, 2H); 3.98(s, 3H); 3.88(m, 2H).

2.2. Promastigote and macrophage culture

L. (L.) amazonensis (IFLA/BR/67/PH8 strain), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904 strain) and *L. (L.) infantum* (MCER/BR/79/M6445 strain) promastigotes, were cultured in LIT medium, pH 7.4, supplemented with 10% FBS, penicillin (100 UI mL^{-1}) and streptomycin (100 μg mL^{-1}), 2% glucose – complete LIT - at $23 \pm 0.5^\circ C$. Promastigotes used in all experiments were isolated from the stationary growth phase. Murine macrophages cell line RAW 264.7 was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS, 1% penicillin (100 UI mL^{-1}) and streptomycin (100 μg mL^{-1}) – complete RPMI - in incubator with 5% CO_2 at $37^\circ C$.

2.3. Cytotoxicity assay

Promastigotes (5×10^5 cells/well) were placed on 96-well culture plates and incubated at $23^\circ C$ with different concentrations of ruthenium complexes (**1-3**) (2-fold serial dilution from 200 μM) for 24 h. RAW 264.7 macrophages (2.5×10^5 cells/well) were placed on 96-well culture plates and incubated with complete RPMI in 5% CO_2 incubator at $37^\circ C$ for 3 h to cell adhesion. After this time, macrophages were incubated with its respective medium alone (control) or containing different concentrations (2-fold serial dilution from 200 μM) of the

ruthenium complexes for 24 hours at 37°C in 5% CO₂. The cell viabilities were evaluated by MTT assay according to Mosmann (1983)²⁹ with same modifications and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of complexes on cell viability were then determined by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA). The experiments were performed in triplicate and three independent experiments were conducted.

2.4. Infectivity assay

RAW 264.7 macrophages (3.5×10^5 /well) were placed on glass coverslips within a 24-well culture plate and incubated with complete RPMI in 5% CO₂ incubator at 37°C for 3 h to cell adhesion. After this time, promastigotes of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* were added on macrophages adhered to the coverslips at ratio of 10:1 (parasite:macrophage). After 2 h of infection non-internalized promastigotes were removed by washes with phosphate buffered saline (PBS). Infected macrophages were incubated with complete RPMI medium (control) or containing different concentrations of ruthenium complexes in 5% CO₂ incubator at 37°C for 24 h. Then, the coverslips were fixed with 2% formaldehyde, stained with modified Giemsa and analyzed by optical microscopy. The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per infected macrophage were determined by randomly counting of 100 cells in each coverslip. The infectivity index was calculated by multiplying the percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per infected macrophage. The experiments were performed in triplicate and two independent experiments were conducted.

2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by using the statistical GraphPad Prism package. One-way ANOVA (analysis of variance) was followed by the Newman-Keuls post-test and results were evaluated at a statistical significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Synthesis and characterization of *cis*-[Ru^{II}(η^2 -O₂CR)(dppm)₂]PF₆ complexes

The simple reaction of benzoic acid derivatives ligands, in the presence of a base, with ruthenium (II) bisdiphosphine precursor containing two chloride ligands *cis*-[RuCl₂(dppm)₂], resulted in the novel complexes *cis*-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₁₀H₁₃)(dppm)₂]PF₆ **1**, *cis*-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₇H₇S)(dppm)₂]PF₆ **2**, *cis*-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆ **3**, by simple chloride exchange (Figure 1). All complexes showed O-O bidentate coordination mode for carboxylate ligands according to the characterization data.

3.2. Cytotoxic effect of ruthenium complexes

All the ruthenium complexes assayed against *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* promastigotes were cytotoxic, as shown in Table 1. IC₅₀ values are described as follows: 7.52 μ M, 9.09 μ M and 12.59 μ M for complex **1** on *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*, respectively; 0.70 μ M, 3.28 μ M and 3.17 μ M for complex **2** on *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*, respectively and 0.52 μ M, 0.86 μ M and 1.75 μ M for complex **3** on *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*, respectively. Compared to the precursor, all the new ruthenium complexes exhibited increased cytotoxicity for the three *Leishmania* species assayed, except for complex **1** against on *L. (V.) braziliensis*. Cytotoxicity against mammalian host cells were assessed *in vitro* using RAW 264.7 macrophage. The IC₅₀ values were 62.24 μ M for precursor, 8.73, 1.85 and 2.14 μ M for complex **1**, **2**, **3**, respectively (Table 1).

3.3. Effect of ruthenium complexes on parasite infectivity

After determining the cytotoxicity of ruthenium complexes against extracellular parasite, the activity on the intracellular parasite was evaluated by *in vitro* infectivity model. The effect of complexes on parasite infectivity was evaluated

in presence of two different concentrations selected for each complex: (1) concentration able to inhibit 50% of promastigotes viability (IC_{50}) and (2) non-toxic concentration to 90% of host cells (RAW 264.7 macrophages). The analysis of infectivity index showed that the ruthenium complexes caused inhibitory effect on parasite infectivity in macrophage (Table 2). Interesting, the comparative analysis of infectivity inhibition caused by the selected concentrations did not exhibit statistically significant differences between them ($p < 0.05$) (statistical analysis not shown), except for the complex **1** on *L. (L.) infantum*. The non-toxic concentrations to 90% of RAW 264.7 macrophages of complexes (**1-3**) reduced significantly the infectivity index for all assayed *Leishmania* species when compared to controls (untreated). The percentages of inhibition ranged from 37.0 – 46.0 % for complex **1**, 55.0 – 64.0 % for complex **2** and 73.0 – 79.0 % for complex **3** depending on analyzed specie (Figure 2B, 2D and 2F). Regarding infectivity inhibitions caused by IC_{50} for each ruthenium complex, all molecules presented activity and the more effective was the complex **3** which caused reductions ranging from 79.5 – 85.0 % (Figure 2A, 2C and 2E), with the more significant reduction on *L. (L.) amazonensis*. Complexes **1 - 3** (both concentrations) showed infectivity inhibitions statistically significantly when compared to the precursor action on *L. (L.) amazonensis*. For *L. (V.) braziliensis*, complexes **1** and **2** (IC_{50}) and **3** (both concentrations) and for *L. (L.) infantum*, the complex **1** (IC_{50}) and complexes **2** and **3** (both concentrations) the infectivity inhibitions were also statistically significantly when compared to the precursor (Figure 2). The detailed analysis of the factors used to calculate the infectivity index showed that the percentage of infected macrophages in presence of complexes **1-3** (both concentrations) exhibited statistically significant difference when compared with controls for *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum*. Concerning the number of parasites per infected macrophage the results also revealed statistically significant reduction compared to control for complexes **1-3** (both concentrations) in all *Leishmania* species (Table 2).

4. Discussion

This paper presents the anti-*Leishmania* action for three new ruthenium complexes, which caused a remarkable cytotoxic effect against promastigotes and inhibitions on parasite infectivity by an *in vitro* infectivity model. Concerning cytotoxic effect on promastigotes, the complexes **1-3** exhibited increased cytotoxicity when compared to the precursor action. Thus, our data indicate that the structural changes performed in the precursor molecule were significant to the cytotoxic potency of the new complexes against parasites.

The new ruthenium (II) complexes assayed in this paper containing the *cis*-[Ru(dppm)₂] unit are analogous to other described in the literature that displayed relevant biological activity. For example, the complex *cis*-[Ru(pic)(dppm)₂]PF₆, pic = picolinate, is active against mycobacterium tuberculosis³⁰ and *cis*-[Ru(dicl)(dppm)₂]PF₆ and *cis*-[Ru(ibu)(dppm)₂]PF₆, dicl = diclofenac anion; ibu = ibuprofen anion, are active against a series of cancer cell lines.³¹ Interestingly, for these aforementioned cases the biological activity of the precursor *cis*-[RuCl₂(dppm)₂] was much lower than that of the derivatives, just as found for the leishmanicidal activity here presented (Table 1). Clearly, substitution of two chloride ligands for a monocharged chelating ligand is a key factor for increasing biological activity of this class of compounds. Probably the precursor complex reacts readily with biomolecules, due to the lability of one of the chloride ligands,²⁸ thus decreasing its bioavailability. Furthermore, the resulting complexes are positively charged which apparently assists in their solubility in the biological conditions, also contributing for a higher activity. Thus, our data indicates that the structural changes performed in the precursor molecule by adding a chelating carboxylate anion (benzoic acid derivative) were significant to increase the cytotoxic potency of the new complexes against *Leishmania* promastigotes.

Some prenylated benzoic acid derivatives obtained from *Piper* species were evaluated against *L. amazonensis*, *braziliensis* and *donovani* promastigotes. Among 9 evaluated molecules the best result was found for 3-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-4-methoxy-benzoic acid with an IC₅₀ close to 22 μmol L⁻¹ for *L. braziliensis* while the other compounds exhibited slight or no activity.³² Ruthenium complexes **1-3** are 3 to 22 times more active than these

organic molecules suggesting that the observed leishmanicidal activity resulted from a combined effect between the carboxylate ligand and [Ru(dppm)₂] unit.

Similar approach has been described for ruthenium complexes with antiparasitic drugs, such as Clotrimazole³³, Ketoconazole³⁴ and Lapachol.³⁵ This strategy could promote an increase in pharmacological properties due to a synergistic action between the drug and the metal through multiple mechanisms of action.³⁶ It is believed that the complex can interact with DNA through covalent binding. This would lead to release of the antiparasitic drug that then exerts its normal action on parasite.^{34, 37} Ruthenium complexes coordinated with Clotrimazol display high activity against *L. major* promastigotes with IC₅₀ values in micromolar range. Moreover, one of these complexes coordinated with Clotrimazole was 110 times more active than free Clotrimazole.¹⁵ Interestingly, complexes **1-3** exhibited IC₅₀ values very similar to those obtained with ruthenium complexes coordinated with Clotrimazole.

Taken together the IC₅₀ values against *Leishmania* species for complexes **1-3** showed that the effectiveness of these new ruthenium complexes follow the trend **3** > **2** > **1**. Complex **3** exhibited the highest potency against all *Leishmania* species assayed, as comproved by cytotoxicity on promastigotes and infectivity studies. In an attempt to rationalize this trend, it is interesting to compare the structures of complexes **1-3** (Figure 1). In complex **1** the aromatic ring of benzoate hold a butyl substituent at position 4, complex **2** hold a methylthio group at position 4 and complex **3** hold a methoxy (Position 4) and an hydroxyl (Position 3). Thus, it is possible to realize a relationship between the increase in activity against *Leishmania* parasites with the presence of polar groups in the complexes, which occurs in the order **1-3**. It is speculated that the possibility of establishing additional hydrogen bonds with certain biomolecules makes the complex **3** the most active.

As previously mentioned the three new ruthenium complexes also exhibited significant toxicity to the host cell. Notwithstanding, the results presented herein show to be very promising, especially due to the complexes effect on parasite infectivity assay in macrophages. In this study, the approach using two different concentrations showed remarkable results. Although the use of a concentration based on IC₅₀ for promastigote have shown, generally, infectivity inhibition percentages slightly high, the inhibitions in the presence of

concentration non-toxic to 90% of host cells exhibited result as good as using the IC₅₀ for promastigote. Moreover, there was no statistically significant difference between the inhibitions caused by the two concentrations tested, excepted for the complex **1** on *L. (L.) infantum*, as described previously. This result indicates that the complexes displayed anti-*Leishmania* activity even with the use of a concentration that causes low toxicity to the host cell, which is a favorable condition for treatment of this disease. Particularly for complex **3** a 380 nmol L⁻¹ concentration is sufficient to eliminate at least 70% of promastigotes of all assayed species maintaining 90% of host cells viable.

Also, it is noteworthy that the mimicry iron metabolism by ruthenium complexes contributes to the uptake of molecule in parasite, favoring the reduction of side effects in the host. Thus, *in vivo* studies using these new ruthenium complexes can trigger significant results for the leishmaniasis treatment. Further studies should be developed in order to comprehend the toxicity mechanism for these new ruthenium complexes on *Leishmania*, as well as perform studies focused on the therapeutic potential *in vivo*.

Acknowledgements

This paper was supported by Brazilian Research Funding Agencies (FAPEMIG, CNPq and CAPES).

Funding

This paper was supported by the Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG), Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES), The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Federal University of Uberlândia (UFU).

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Meeting of a bi-regional the WHO on Leishmaniasis: strengthening cross-border collaboration for control in central Asian and middle-eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean Regions. WHO. Awaza, Turkmenbashi, Turkmenistan: WHO, November 2014.
- 2 Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. British Medical Bulletin 2006; **17**: 115-130.
- 3 Sanderson L, Yardley V and Croft SL. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania spp.* J Antimicrob Chemother 2014; **69**: 1888–1891.
- 4 Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. International Journal of Medicine 2014; **107**: 7-14.
- 5 Lindgren E, Andersson Y, Suk JE *et al.* Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. AAAS 2012; **336**: 418-419.
- 6 Guerra JA, Prestes SR, Silveira H *et al.* Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2011; **5**: 1-5.
- 7 Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica 1994; **2**: 359–375.
- 8 Lukes J, Mauricio IL, Schonian G *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. PNAS 2007; **22**: 9375-9380.

9 Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; **123**: 399-410.

10 Soto J, Rea J, Balderrama M *et al.* Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008; **2**: 210-21.

11 Sucre AP. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2003; **2**: 1-10.

12 Santos LO, Vitória BS, Branquinha MH *et al.* Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 348–353.

13 Gambino D, Otero L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chimica Acta* 2012; **393**: 103-114.

14 Ramírez-Macías I, Marín C, Salas JM *et al.* Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one against *Leishmania spp.* *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 813–819.

15 Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965; **205**: 698-699.

16 Komeda S, Casini A. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2012; **12**: 235.

17 Pereira FC, Lima BAV, De Lima AP *et al.* Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane,

1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). Journal of Inorganic Biochemistry 2015; **149**:101.

18 Sanchez-Delgado RA, Lazardi K, Rinch L *et al.* Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 1. Enhancement of the Efficacy of Clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by Complexation to Ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$. Journal of Medicinal Chemistry 1993; **36**: 2041-2043.

19 Martínez A, Carreon T, Iniguez E *et al.* Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium – Clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosome cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. Journal of Medicinal Chemistry 2012; **55**: 3867–3877.

20 Barbosa MIF, Correa RS, Oliveira KM *et al.* Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. Journal of Inorganic Biochemistry 2014; **136**: 33-39.

21 Alessio E, Mestroni G, Bergamo A *et al.* antimetastatic agents. Current Topics in Medicinal Chemistry 2004; **4**: 1525-1535.

22 Kostova I. Ruthenium complexes as anticancer agents. Current Medicinal Chemistry 2006; **13**: 1085-1107.

23 Bastos TM, Barbosa MI, Da silva MM *et al.* Nitro/nitrosyl-ruthenium complexes are potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* agents causing autophagy and necrotic parasite death. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014; **58**: 6044–605.

24 Iniguez E, Sánchez A, Vasquez MA *et al.* Metal-drug synergy: new ruthenium (II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells. Journal of Biological Inorganic Chemistry 2014; **18**: 77–79.

- 25** Allardyce CS, Dorcier A, Scolaro C *et al.* Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. *Bioorganometallic Chemistry* 2005; **19**: 1-10.
- 26** Reisner E, Arion VB, Keppler BK *et al.* Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. *Inorg. Chim. Acta* 2008; **361**: 569–1583.
- 27** Ang WH, Dyson PJ. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006; **20**: 4003-4018.
- 28** Sullivan BP, Meyer TJ. Comparisons of the Physical and Chemical-Properties of Isomeric Pairs .2. Photochemical, Thermal, and Electrochemical Cis Trans Isomerizations of $M(Ph_2PCH_2PPH_2)_2Cl_2$ (M = Ru-II, Os-II). *Inorganic Chemistry* 1982; **21**: 1037.
- 29** Mosmann TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunomethods* 1983; **65**: 55-63.
- 30** Pavan FR, Poelhsitz GV, Da Cunha IVP *et al.* In vitro and in vivo activities of ruthenium (II) phosphine/diimine/picolinate complexes (scar) against mycobacterium tuberculosis. *Plos one* 2013; v.8(5), e64242.
- 31** Lopes JCS, Damasceno JL, Oliveira PF *et al.* Ruthenium (II) Complexes Containing Anti-Inflammatory Drugs as Ligands: Synthesis, Characterization and *in vitro* Cytotoxicity Activities on Cancer Cell Lines. *J Braz Chem Soc* 2015; **00**: 1-10.
- 32** Flores N, Jiménez IA, Giménez A *et al.* Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry* 2009; **70**: 621 – 627.

33 Sanchez-Delgado RA, Lazardi K, Rinch L *et al.* Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 1. Enhancement of the Efficacy of Clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by Complexation to Ruthenium in $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$. *Journal of Medicinal Chemistry* 1993; **36**: 2041-2043.

34 Iniguez E, Sánchez A, Vasquez, MA *et al.* Metal-drug synergy: new ruthenium (II) complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and nontoxic to human or murine normal cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2014; **18**: 77–79.

35 Barbosa MIF, Correa, R.S, Oliveira, KM *et al.* Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2014; **136**: 33-39.

36 Gambino D, Otero L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. *Inorganica Chimica Acta* 2012; **393**: 103-114.

37 Martínez A, Carreon, T, Iniguez E *et al.* Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium – Clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosome cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; **55**: 3867–3877.

Legends to figures and tables

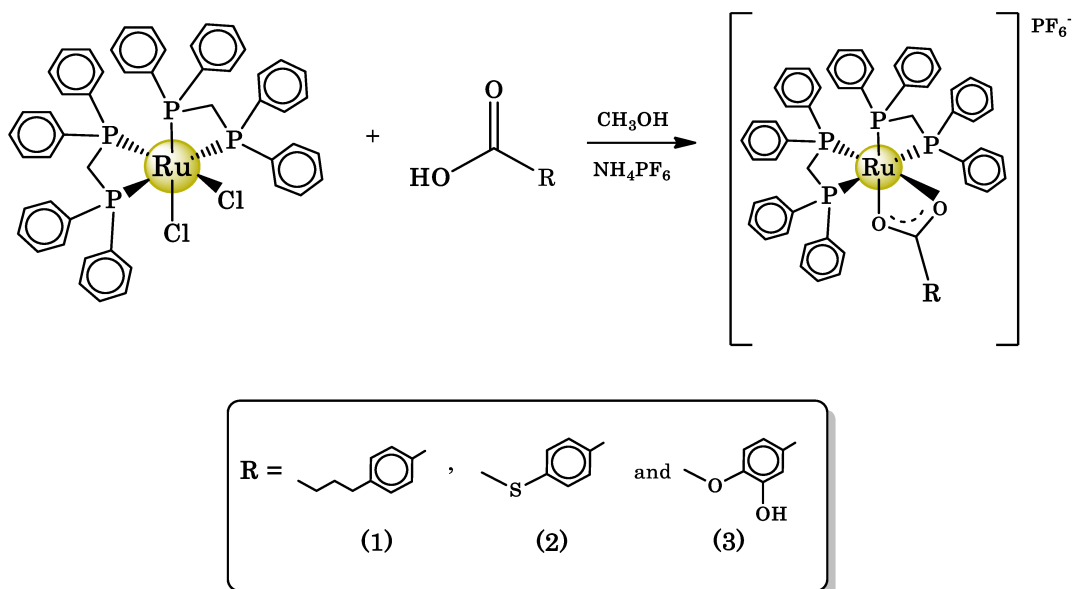


Figure 1: Synthetic route for assayed complexes: a) $\text{cis-[Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_{10}\text{H}_{13})(\text{dppm})_2\text{]PF}_6$ (complex **1**); b) $\text{cis-[Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_7\text{H}_7\text{S})(\text{dppm})_2\text{]PF}_6$ (complex **2**) and 3. $\text{cis-[Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CC}_7\text{H}_7\text{O}_2)(\text{dppm})_2\text{]PF}_6$ (complex **3**).

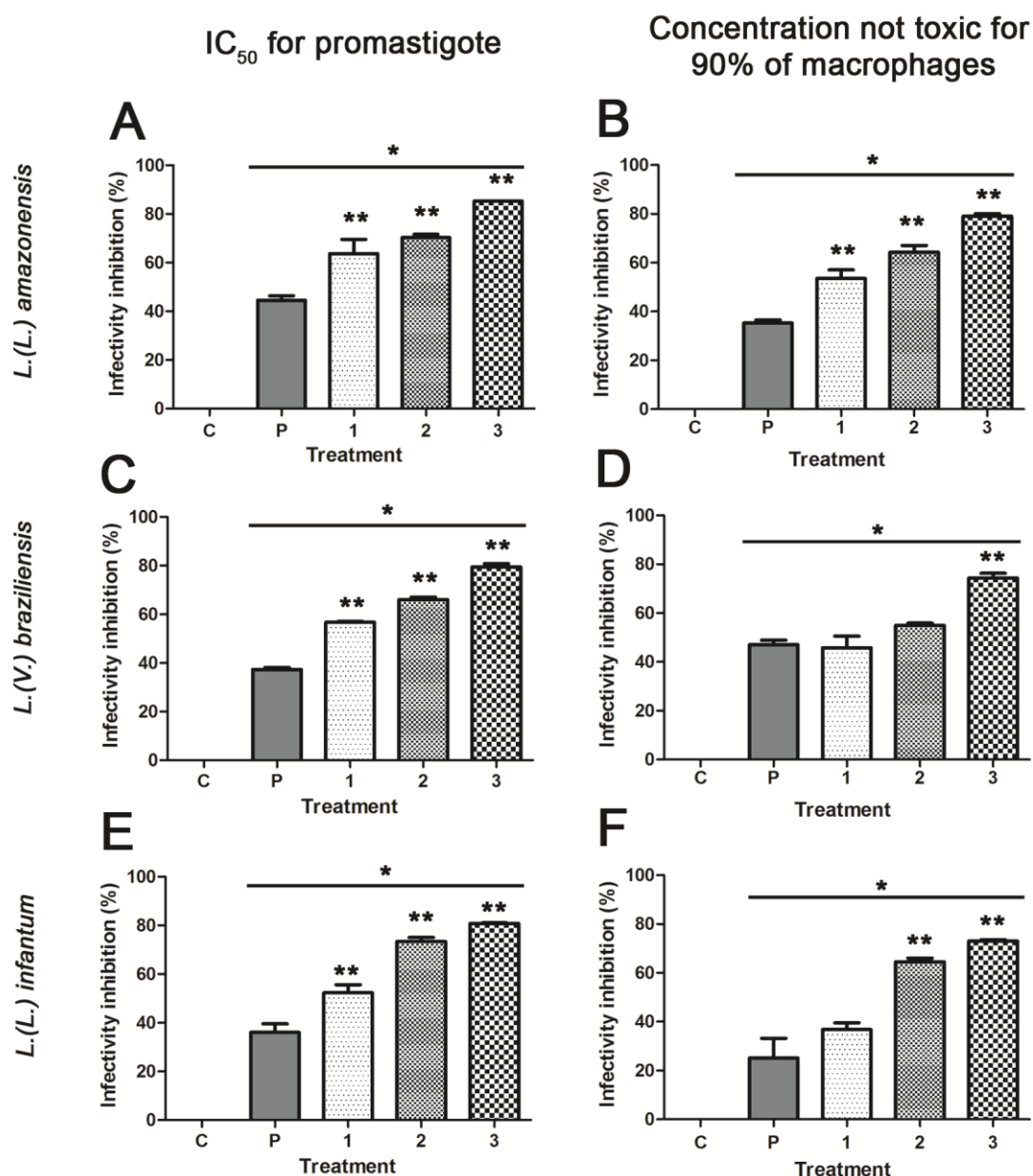


Figure 2. Effect of three new ruthenium complexes on parasite infectivity in RAW 264.7 macrophages. The graphs show the percentages of infectivity inhibition for three *Leishmania* species caused by ruthenium complexes at two different concentrations. Graphs **A** and **B**, infectivity inhibition for *L. (L.) amazonensis*; graphs **C** and **D**, infectivity inhibition for *L. (V.) braziliensis*; graphs **E** and **F**, infectivity inhibition for *L. (L.) infantum*. Graphs **A**, **C** and **E**, infectivity inhibition (%) in presence of concentrations able to inhibit 50% of promastigotes viability (IC₅₀). Graphs **B**, **D** and **F**, infectivity inhibition (%) in presence of concentrations not toxic to 90% of host cells (RAW 264.7 macrophage). X axis, **C**, infectivity control (not treated); **P**, precursor; **1**, complex 1; **2**, complex 2; **3**, complex 3. Data represent mean \pm standard deviation (S.D.) of three

independent experiments performed in triplicate. *Statistically significant difference when compared to the infectivity control ($p < 0.05$). **Statistically significant difference when compared to the precursor ($p < 0.05$).

Table 1. Cytotoxic effects of ruthenium complexes on *Leishmania* promastigotes and RAW 264.7 macrophages.

Complex	IC ₅₀ (95% CI), μ M				Concentration not toxic to 90% of macrophage, μ M
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Macrophage	
Precursor	15.48 (14.29 - 16.77)	3.93 (3.68 - 4.21)	19.46 (18.49 - 20.49)	62.24 (4.76-8.13)	4.16
1	7.52 (6.49 - 8.71)	9.09 (6.74 - 12.20)	12.59 (8.54 - 18.56)	8.73 (8.02 - 9.50)	4.46
2	0.70 (0.59 - 0.82)	3.28 (2.63 - 4.09)	3.17 (2.33 - 4.31)	1.85 (1.55 - 2.20)	0.55
3	0.52 (0.44 - 0.63)	0.86 (0.57 - 1.31)	1.75 (1.48 - 2.06)	2.14 (1.89 - 2.41)	0.38

1. cis-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₁₀H₁₃)(dppm)₂]PF₆

2. cis-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₇H₇S)(dppm)₂]PF₆

3. cis-[Ru^{II}(η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆

Table 2. Ruthenium complexes effect on *Leishmania* infectivity in RAW 264.7 macrophages.

	Complex	Infectivity index ^a			Infected macrophages (%) ^a			Number of parasites / infected macrophages ^a		
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
A	No treatment	492.20 (±33.23)	454.80 (±40.31)	468.20 (±0.71)	93.00 (±2.82)	91.17 (±3.53)	90.83 (±0.70)	5.31 (±0.15)	4.98 (±0.25)	5.15 (±0.04)
	Precursor	273.70 (±31.61)*	285.20 (±30.41)*	299.30 (±22.63)*	76.84 (±2.59)*	79.17 (±11.08)	75.67 (±3.76)*	3.56 (±0.53)*	3.60 (±0.12)*	4.01 (±0.18)*
	1	180.00 (±52.75)*	197.00 (±19.37)*	223.40 (±22.13)*	66.84 (±4.00)*	67.17 (±7.30)	71.50 (±3.53)*	2.67 (±0.61)*	2.93 (±0.02)*	3.06 (±0.08)*
	2	146.50 (±18.67)*	154.80 (±20.51)*	124.70 (±10.82)*	63.67 (±2.35)*	64.83 (±3.53)	57.83 (±0.70)*	2.29 (±0.20)*	2.37 (±0.18)*	2.14 (±0.15)*
	3	73.50 (±6.83)*	93.69 (±16.99)*	90.00 (±1.88)*	42.34 (±3.76)*	48.67 (±3.76)*	45.67 (±0.94)*	1.69 (±0.04)*	1.92 (±0.21)*	1.96 (±0.08)*

A - Concentration based at the promastigotes IC₅₀

^aThe results are expressed as the mean and standard deviation (± SD) of three independent experiments, each one performed in triplicate

*Statistically significant reduction when compared to the control (no treatment)

	Complex	Infectivity index ^a			Infected macrophages (%) ^a			Number of parasites / infected macrophages ^a		
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
B	No treatment	492.20 (±33.23)	454.80 (±40.31)	468.20 (±0.71)	93.00 (±2.82)	91.17 (±3.53)	90.83 (±0.70)	5.31 (±0.15)	4.98 (±0.25)	5.15 (±0.04)
	Precursor	318.50 (±13.01)*	240.40 (±9.40)*	351.50 (±54.45)*	84.33 (±8.48)	77.33 (±16.97)	81.50 (±2.58)*	3.80 (±0.53)*	3.88 (±0.43)*	4.30 (±0.52)*
	1	231.70 (±40.09)*	248.70 (±52.82)*	297.20 (±17.68)*	72.17 (±3.06)*	71.50 (±9.19)	76.33 (±0.00)*	3.19 (±0.41)*	3.46 (±0.29)*	3.89 (±0.23)*
	2	176.40 (±31.61)*	205.50 (±11.03)*	166.40 (±9.40)*	69.17 (±2.12)*	69.34 (±1.88)	63.33 (±2.82)*	2.53 (±0.38)*	2.95 (±0.07)*	2.61 (±0.03)*
	3	103.20 (±0.70)*	117.40 (±23.12)*	126.50 (±3.11)*	51.50 (±0.70)*	54.00 (±1.88)*	53.33 (±0.00)*	2.00 (±0.04)*	2.16 (±0.35)*	2.15 (±0.34)*

B - Concentration not toxic to 90 % of macrophages

^aThe results are expressed as the mean and standard deviation (± SD) of three independent experiments, each one performed in triplicate

*Statistically significant reduction when compared to the control (no treatment)

POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II): EFEITO NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

RESUMO

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de saúde, uma doença negligenciada por vários aspectos, sobretudo em virtude da falta de investimentos em novos agentes terapêuticos mais eficazes e seguros. Ela é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e pode ser classificada em leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose visceral. O tratamento atual apresenta uma série de complicações, como alta toxicidade, elevado custo e resistência do parasito. Nessa perspectiva o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais seguros e menos onerosos torna-se oportuno.

A química inorgânica medicinal representa uma área promissora e atrativa no controle de várias doenças, através do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos baseados na bioatividade de complexos metálicos. Vários estudos tem demonstrado o uso potencial de complexos metálicos em diferentes patologias como, por exemplo, no câncer e doenças parasitárias.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial anti-leishmania de 3 novos complexos de rutênio (II) na citotoxicidade de promastigotas e interação parasito-hospedeiro contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Palavras chaves: citotoxicidade, complexos de rutênio (II), inibição da infecção, *Leishmania*.

Anti-*Leishmania* activity of new ruthenium (II) complexes: effect on parasite-host interaction

ABSTRACT

The leishmaniasis are considered by the World Health Organization, a disease neglected by many ways, mainly because of lack of investment in more effective and insurance new therapeutic agents. It is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *leishmania* and can be classified into cutaneous leishmaniasis, leishmaniasis mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Current treatment has a number of complications, such as high toxicity, high cost and parasite resistance. In this perspective the development of new safer and less costly therapeutic agents becomes appropriate.

Inorganic medicinal chemistry represents a very promising and attractive area in controlling various diseases, through the development of new therapeutic agents based on bioactive metal complexes. Several studies have demonstrated the potential use of metal complexes in different pathologies such as cancer and parasitary diseases.

The present study aims to evaluate the anti-*Leishmania* potential of new ruthenium (II) complexes (**1–3**) in the promastigote cytotoxicity and their effect on parasite-host interaction against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Keywords: cytotoxicity, infectivity inhibition, *Leishmania*, ruthenium (II) complexes.