

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

“Atividade Leishmanicida do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina”

Alexandre Luiz Neves Silva

Uberlândia, 2011

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

“Atividade Leishmanicida do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina”

Dissertação apresentada ao colegiado do programa
de Pós graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como parte da obtenção do título de
mestre.

Alexandre Luiz Neves Silva

Orientadora:

Maria Aparecida de Souza

Co-orientador

Claudio Vieira Silva

Uberlândia, 2011

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus familiares, meus amigos e meus colegas de laboratório
pelo apoio, paciência e o incentivo durante essa jornada*

Agradecimentos

Agradeço antes de tudo à minha família pelo apoio e suporte fundamentais, sem eles nada disso seria possível. Minha mãe Heloisa, pessoa mais importante da minha vida; meu irmão Jorge, exemplo de honestidade e simplicidade; minha irmã Isabella, que os atritos demonstraram o quanto somos parecidos; meu padrasto Aias por fazer parte da família; aos meus avós Olinda e Luiz, tios e primos pelos “pitacos” que reconheci como forma de carinho e proteção.

Agradeço imensamente à Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Souza, minha mãe profissional; seus ensinamentos e dedicação me serviram de exemplo como paixão pelo conhecimento e ciência.

Agradeço ao Prof^o Dr^o Claudio Vieira Silva, excelente orientador e um grande amigo exemplo de pesquisador ético, comprometido e apaixonado pela pesquisa.

Agradeço à minha segunda família, os amigos do Laboratório: Fernanda, Cecílio, Adele, Lilian, Flávia, Patrícia, Rafael, Paulo Cesar, Ana Flávia, Aline e Fabrício que me suportaram e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Em especial, agradeço aos meus amigos Cristiano, Ennes, Felipe, Miguel, Thiago, meus fiéis escudeiros que compartilharam momentos bons e ruins, permaneceram a meu lado, procuraram entender meus problemas, principalmente naqueles quando não estive em meu estado mais sóbrio. A todas as pessoas que em algum momento fizeram e fazem parte da minha vida, parte de mim, representando o que sou como pessoa.

Agradeço aos professores do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelo conhecimento e formação acadêmica, aos funcionários do programa, que tornaram tudo isso possível.

Agradeço especialmente ao Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura-UFRJ, à Prof^a Dr^a Thaís Souto Padrón e às suas alunas, principalmente a Camila pela grande contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Saudades das minhas cadelinhas Préia e Brida, que infelizmente hoje não se encontram comigo, mas sempre demonstraram um amor incondicional servindo como apoio emocional.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	10
2-OBJETIVO	25
2.1-Objetivo geral	21
2.2-Objetivos específicos	26
3- MATERIAL E METODOS	26
3.1-Formulação do composto	26
3.2- Animais	26
3.3-Culturas celulares	27
3.3.1-Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	27
3.3.2-Linhagens celulares	27
3.4-Parasitos	27
3.5-Tratamento das células com o composto N-dodecil-1,2-etanodiamina	28
3.6-Ensaio de Multiplicação	28
3.7-Infecção experimental <i>in vitro</i> e tratamento	29
3.8-Dosagem de citocinas	29
3.9-Microscopia eletrônica de transmissão	30
3.10-Microscopia eletrônica de varredura	30
3.11-Análise estatística	31
4-RESULTADOS	32
4.1-Atividade Leishmanicida do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina <i>in vitro</i>	32
4.2-Análise do efeito do N-dodecil-1,2-etanodiamina sobre células de mamíferos	36
4.3-Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> em amastigotas intracelular.....	38
4.4-A influência do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina na produção de citocinas	42
4.5-Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> devido tratamento com composto N-dodecil-1,2-etanodiamina	43
5-DISCUSSÃO	49
6-CONCLUSÃO	53
7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS: Absorbância

AP-1: Activator protein 1

APC: Célula apresentadora de Antígeno

ATP: Adenosina trifosfato

BHI: Brain Heart Infusion

CL: Leishmaniose Cutânea

DCL: Leishmaniose cutânea difusa

DMSO: Dimetilsulfóxido

GUT: N-dodecil-1,2-etanodiamina

HFF: Human foreskin fibroblasts

HIV-LV: Vírus da Imunodeficiência Humana-Leishmaniose Visceral

IFN- γ : Interferon-gamma

IL : Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico síntase

LPG: Lipofosfoglicano

MAP K: Mitogen-activated protein kinases

ML: Leishmaniose Mucocutânea

MTT: (3-(4,5-dimetil- 2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium-bromidico)

NO: Óxido Nítrico

ODC: ornitina descarboxilase

PSG: gel proteofosfoglicano

PTPs : fosfotirosinas fosfatases

SBF: Soro Fetal Bovino

THP-1: human monocytic leukemia cell line

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VL: Leishmaniose Visceral

RESUMO

Leishmaniose é uma doença infecciosa que afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo mundo. Com mais de 2 milhões de novos casos por ano e falhas no tratamento há o surgimento de resistência às drogas. Como prioridades são realizadas pesquisas relacionadas ao ciclo de vida do parasito, interação com o hospedeiro, desenvolvimento de vacinas e novas drogas. A inibição da biossíntese do parasito por poliaminas tem sido uma importante abordagem quimioterápica no desenvolvimento de novas drogas contra leishmaniose. As poliaminas são importantes reguladores do crescimento e diferenciação em vários tipos celulares incluindo protozoários. Nesse trabalho avaliamos *in vitro* o efeito do composto *N*-dodecil-1,2- etanodiamina (GUT) na susceptibilidade de diferentes espécies de *Leishmania* sp. A concentração de 0,31 µg/ml foi altamente eficiente contra *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi*, entretanto em diferentes células de mamíferos (THP-1, HFF, macrófagos murinos J774.G8 e macrófagos peritoneais de camundongos) a mesma citotoxicidade não foi observada. A inibição nos índices de multiplicação e infecção de amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* em macrófagos peritoneais foi observada na presença das concentrações de 1 µg/ml e 0,5 µg/ml de (GUT). Formas promastigotas de *L. amazonensis* mostraram diversas alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão causada pelo tratamento com o composto *N*-dodecil-1,2- etanodiamina. O composto *N*-dodecil-1,2- etanodiamina mostrou ser um novo composto promissor contra a leishmaniose.

Palavras chaves: Leishmaniose, tratamento e poliaminas.

ABSTRACT

With more than 12 million people affected worldwide, 2 million new cases occurring per year, and the rapid emergence of drug resistance and treatment failure, leishmaniasis is an infectious disease for which research on drug and vaccine development, host-pathogen, and vector-parasite interactions are current international priorities. Polyamines are important regulators of growth and differentiation in a variety of cells, including parasitic protozoa. The inhibition of parasitic biosynthesis by polyamines has been an interesting chemotherapeutic approach in the design of novel antiparasitic drugs against mainly leishmaniasis. In this work we evaluate the *in vitro* effect of *N*-dodecyl-1,2-ethanediamine (GUT) on morphology and replication of *Leishmania*. A concentration of 0.31 µg/ml of this compound was highly effective against *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* and no toxicity against mammalian cell lines as well HFF, THP-1, J774.G8 or murine peritoneal cells was observed. So, there was inhibition of multiplication of the *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. chagasi* amastigotes into inflammatory peritoneal cells in presence of 1 µg/ml and 0.5 µg/ml of this compound. Promastigotes form of *L. amazonensis* it was with intracellular disorganization by transmission electron microscope observation following 1 to 24 h of treatment with GUT. Thus, *N*-dodecyl-1,2-ethanediamine shown be a promising drug against *Leishmania*.

Key words: Leishmaniasis, treatment and polyamines.

1.INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais - Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania* (ordem *Kinetoplastida*). Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* são transmitidas por 30 espécies de diferentes flebotomíneos (gênero *Plebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo) são causadoras da leishmaniose em todo mundo (Magill, 1995; Herwaldt, 2001; Desjeux, 2004). A endemicidade estende-se por 88 países, sendo 72 países em desenvolvimento e 13 considerados desenvolvidos. A leishmaniose representa grande impacto na saúde pública e infelizmente negligenciada na maioria dos países. Outro obstáculo é a notificação compulsória, obrigatório em apenas 32 países, com grande número de casos subnotificados e invisíveis às estatísticas mundiais da doença (Guerin *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2005).

Existem 350 milhões de pessoas em áreas de risco em todo mundo com prevalência global estimada em 12 milhões de pessoas e aproximadamente 2 milhões de novos casos por ano. A incidência anual da forma visceral é de 500.000 casos em 61 países, com 90% desses casos registrados em cinco países, dentre eles Índia (especialmente no estado de Bihar e estados vizinhos), Bangladesh, Nepal (região de Terai), Sudão e Nordeste do Brasil (WHO, 2000). Da forma cutânea são reportados aproximadamente 1 a 1,5 milhões de casos por ano e, 90% desses casos estão registrados em 8 países, sendo 6 do velho mundo (Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria) e 2 do novo mundo (Brasil e Peru). Em contraste 90% dos casos da forma mucocutânea estão registrados na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2000).

Desde 1993 há uma expansão considerável nas regiões endêmicas à *Leishmania*, este fato está ligado intimamente ao aumento econômico não planejado e crescente incidência da co-infecção HIV-LV. A incidência da leishmaniose cutânea no Brasil tem

aumentado consideravelmente e progressivamente: a partir de 1998, 21.000 casos; em 1999, 30.550 casos e em 2000 35.000 novos casos. Tendência similar é relatada em Kabul, Afeganistão, onde o crescimento foi de 14.000 em 1994 para 200.000 casos em 1999 (TDR, 2003-2004).

1.2- Leishmaniose e manifestações clínicas

A Leishmaniose é conhecida como uma doença de ampla variedade sintomatológica; desde uma simples lesão indolor com bordas elevadas (forma cutânea), a forma mucocutânea potencialmente desfigurante e a forma visceral, fatal se não tratada.

A leishmaniose Cutânea (LC) ocorre tanto no velho mundo (*Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, embora *Leishmania infantum* e *Leishmania donovai* também sejam implicadas em casos de reincidência pós-tratamento) como no novo mundo (*Leishmania Mexicana* e uma variedade de espécies do subgênero *Vianna*).

As lesões são a partir de nódulos e pápulas que desenvolve uma lesão ulcerativa com uma depressão central e bordas elevadas que ocasionam cicatrizes atróficas. Pode desenvolver lesões não ulceradas, persistentes com nódulos ou placas. Outra variação é a forma cutânea difusa (LCD) que são lesões disseminadas, mas não ulcerativas.

Outras variações sintomatológicas incluem a leishmaniose mucocutânea (LM), causada principalmente pelo subgênero *Vianna*, geralmente *Leishmania (V.) braziliensis*. Entretanto as espécies *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, podem apresentar a mesma sintomatologia (Grevelink & Lerner, 1996).

As manifestações ocorrem após disseminação hematogênica ou linfática de amastigotas, da pele para a mucosa nasofaríngea, culminando na destruição da nasofaringe, nariz, boca e garganta (Grevelink & Lerner, 1996).

A forma visceral ou leishmaniose visceral (LV) é causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no velho mundo e *Leishmania chagasi* no novo mundo. LV abrange de sintomatologia caracterizada por períodos irregulares de febre, perda de peso substancial, hepatoesplenomegalia, e pancitopenia predominante (anemia, leucopenia, trombocitopenia, linofocitose e monocitose) associada à hipergammaglobulinemia concomitante com hipoalbuminemia. Essa infecção sistêmica é geralmente fatal se não tratada (Herwaldt, 1999).

1.3- Ciclo de Vida

Mamíferos são infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, que são subdivididos em dois subgêneros *Leishmania* (*Leishmania*) ou *Leishmania* (*Viannia*), que diferem em seus ciclos de desenvolvimento dentro do vetor flebotomíneo. A transmissão vetorial de diferentes espécies de ambos os subgêneros de *Leishmania* para o hospedeiro mamífero requer diferenciação do parasito para uma forma flagelada não replicativa promastigota metacíclico.

As formas metacíclicas são inoculadas durante o repasto sanguíneo por fêmeas de flebotomíneos contaminadas que se alimentam de sangue para maturação dos ovos. Os parasitos inoculados são internalizados por macrófagos residentes da derme, diferenciando em formas replicativas intracelulares denominadas amastigotas. Outros tecidos podem ser invadidos induzindo uma resposta imune que varia de acordo com a espécie de *Leishmania*. O destino destas formas durante essa fase no hospedeiro, também determina a forma doença e sua sintomatologia (Murray, 2005).

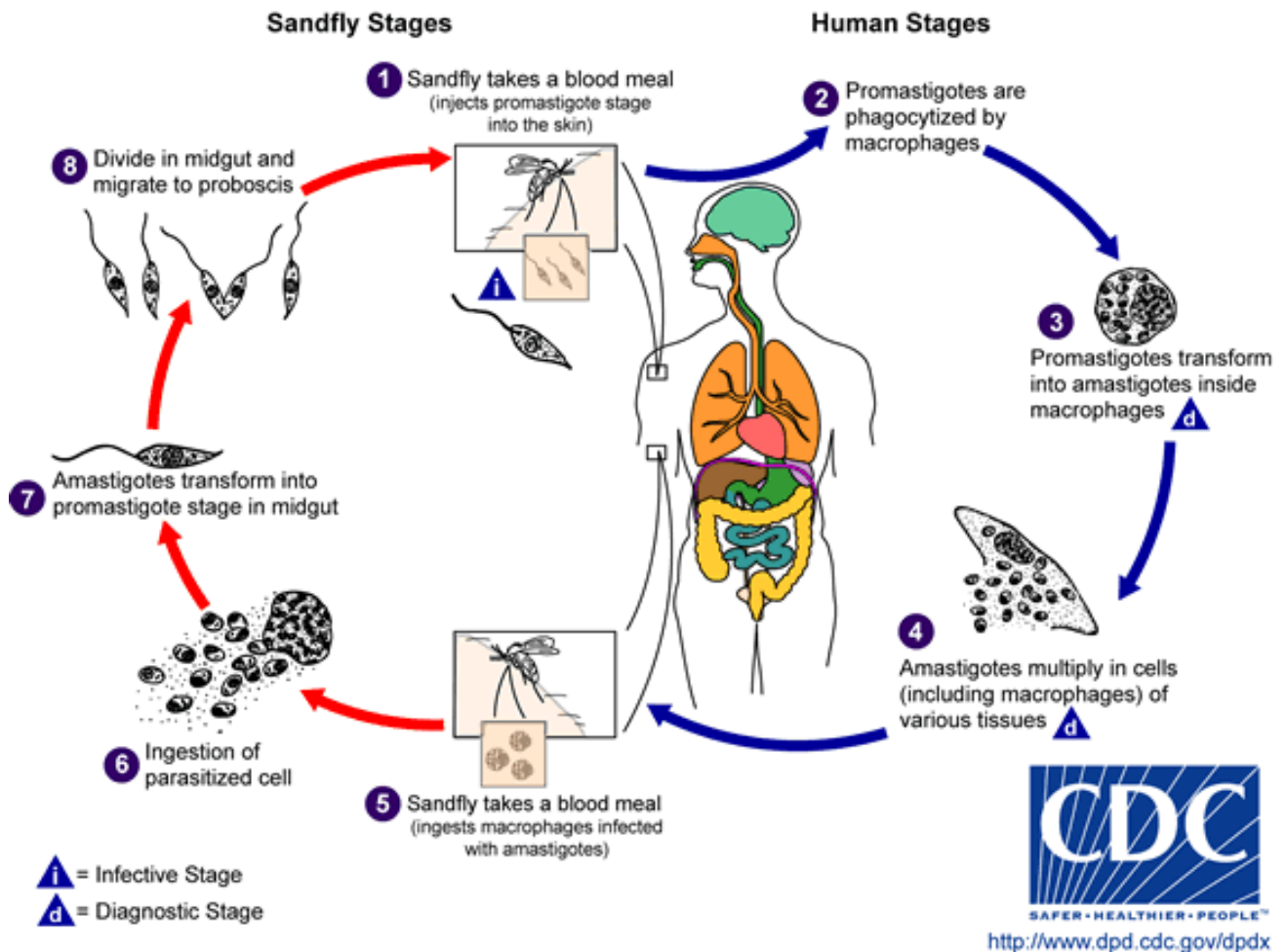


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania* spp.: Formas alongadas de *Leishmania* spp., denominadas promastigotas metacíclicas, são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotômíneos contaminadas. Essas formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema imune, e se diferenciam em formas amastigotas intracelulares obrigatórias. Formas amastigotas de *Leishmania* conseguem se multiplicar, podendo infectar outros insetos vetores durante o repasto sanguíneo de indivíduos infectados.

Após repasto sanguíneo de hospedeiros vertebrados infectados, as formas amastigotas de *Leishmania*, passam por etapas de replicação e desenvolvimento no intestino do vetor flebotômíneos, onde se diferenciam novamente para um estágio metacíclico infectivo para hospedeiros mamíferos (Kamhawi, 2006).

Contudo, após o repasto sanguíneo, amastigotas ingeridas, são rapidamente cercadas por uma matriz quitinosa constituída de proteínas em associação com

carboidratos, essa substância peritrófica é secretada pelas células epiteliais do intestino médio dos flebotomíneos (Pimenta *et al.*, 1997).

As formas amastigotas nessa fase se diferenciam em promastigota procíclica, essa transformação inicial, garante a sobrevivência do parasito às proteases intestinais (Ramalho-Ortigao *et al.*, 2003) e peptídeos antimicrobiais (Boulanger *et al.*, 2004). Após alguns dias a matriz peritrófica perde consistência, os parasitos escapam, migram e aderem nas microvilosidades do intestino do vetor (Sacks *et al.*, 2000).

A adesão é parte essencial do ciclo de desenvolvimento da *Leishmania* no vetor, pois permite que o parasito não seja expulso do intestino, quando há a defecação do material remanescente da ingestão do sangue do hospedeiro vertebrado. Nesse período os parasitos multiplicam-se várias vezes no intestino médio abdominal e gradualmente migram para o intestino médio torácico e válvula estomodeal (Bates, 2007).

A válvula estomodeal está localizada entre o intestino e o esôfago, garantindo assim ao parasito uma proximidade ao fluxo dos alimentos. Durante a infecção nesse estágio final, os parasitos provocam alterações patológicas no intestino que facilita a transmissão ao hospedeiro vertebrado (Schlein, 1993).

Sendo assim, a *Leishmania* também consegue bloquear o intestino anterior pela produção de um gel viscoso filamentosos constituído por proteofosfoglicanos (gel-PSG), além de se ligar ao revestimento quitinoso da válvula estomodeal, consegue também destruir o revestimento da válvula com uma quitinase (Rogers *et al.*, 2004).

Devido ao comprometimento da válvula e a oclusão do intestino anterior pelo Gel-PSG, as fêmeas altamente infectadas, dificilmente iram se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado sem regurgitar promastigotas metacíclicos durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick *et al.*, 1977).

Outras localizações de promastigotas metacíclicos de *Leishmania* no trato gastro-intestinal também foram repetidamente encontradas como nas glândulas salivares e nas probóscide, levantando questões sobre formas alternativas de transmissão (Bates,2007).

Durante o processo de inoculação de promastigotas de *Leishmania*, a saliva do vetor também é inoculada, esta contém uma série de moléculas com propriedades vasodilatadoras, anticoagulante e antiinflamatória. Essas moléculas são importantes para facilitar a alimentação das fêmeas de flebotomíneos, mas também desempenham um papel crucial na transmissão da *Leishmania* (Titus & Ribeiro, 1988).

A saliva modula a resposta imune do hospedeiro “naive”, permitindo assim o estabelecimento da infecção. Por outro lado, a exposição repetida a picadas de mosquito provoca uma resposta imunológica que confere proteção contra a transmissão natural da leishmaniose, sendo esse mecanismo base para diferentes estudos e desenvolvimento de vacinas contra antígenos salivares dos vetores (Kamhawi *et al.*, 2000).

Assim, além da saliva provocar uma modulação da resposta imune no hospedeiro, que favorece a infecção, próprio parasito efetivamente provoca uma imunossupressão, executado não somente por uma subversão ativa mais também por um desvio do sistema imune que resulta em falha da resposta.

1.4- Resposta celular e imunológica frente à infecção

Macrófagos são células do sistema imunológico, responsáveis por eliminar diferentes tipos de patógenos. Contudo, mesmo apresentando um ambiente intracelular hostil a diferentes tipos de microrganismos, as diferentes espécies de *Leishmania* conseguem se estabelecer e multiplicar. Mecanismos adaptativos do parasito interferem com a sinalização intracelular da célula hospedeira. Diferentes funções efectoras

desencadeadas pelos receptores de reconhecimento de patógenos, são ativamente suprimida ou alterada para provocar repostas que resultam na sobrevivência do parasito (REINER, 1994).

Algumas das formas que a *Leishmania* direta ou indireta modula as funções celulares são através da sinalização e interação entre moléculas de superfície CD40 (presente em macrófagos, e também em células dendríticas e células B) com o seu ligante CD40 (CD154) presentes em células T.

Consistente com essa informação, classicamente a resposta imune protetora contra *L. major* é do tipo Th1. Camundongos deficientes em CD40 falham em desenvolver resposta Th1 e são suscetíveis a infecção por *Leishmania*, entretanto administrando interleucina 12 (IL-12) nesses esses camundongos deficientes, uma resposta do tipo Th1 é desenvolvida. Indicando que a ligação entre CD40 e CD154 é requerida para a produção de IL-12 que polariza as células Th para o Tipo Th1 (Kamanaka, 1996).

Além de seu papel na resposta imune do tipo Th1, as interações entre CD40-CD40L também são importantes para estimular macrófagos na produção de uma serie de citonas e mediadores inflamatório, incluindo o óxido nítrico (NO), que desempenha um papel chave na morte do parasita (Suttles & Stout, 1996).

A ligação em CD40 e CD40L aciona diferentes cascatas de sinalização intracelular, resultando em fosforilação de MAP Kinases (ERK-18, p38MAP e JNK, três dos principais grupos de MAP Kinases em células de mamíferos). Estas fosforilam de proteínas intracelulares, incluindo fatores de transcrição que posteriormente regulam a expressão gênica, mecanismos transcripcionais e pós-transcricional (Su & Karin, 1996).

Vários estudos mostram que MAPKs são ativamente reprimidas e não podem ser ativadas quando macrófagos são infectados por *Leishmania* e diferentes estudos

mostram que a LPG uma importante molécula de superfície e fator de virulência está envolvida nessa inativação de MAPKs. Assim a inibição da fosforilação de MAPKs resulta em menor expressão de IL-12 e iNO2 (a enzima que catalisa a produção de NO). Ambas mostram papel crucial no desenvolvimento da imunidade contra *Leishmania* (Privé & Descoteaux, 2000).

Além da inibição dessa via de MAPKs, diferentes fatores de transcrição também são inibidos tais como: Elk-1, c-fos, IRF-1, AP-1, and NF- κ B, resultando na subversão de uma resposta imune eficiente (Bhardwaj et al., 2010).

Outra via de sinalização também modulada durante o processo de infecção é a via JAK1/JAK2. Sabidamente IFN- γ possui um papel crucial no controle da infecção por *Leishmania*, induzindo atividade leishmanicida do macrófago e o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1. As funções biológicas do IFN- γ são mediadas pelo seu receptor IFN- γ que ativa JAK1/JAK2. A ativação dessa via resulta na fosforilação de STAT-1, que transloca-se para o núcleo, levando a ativação de genes que aumenta da atividade microbiana dos macrófagos. A inativação de JAK1/JAK2 e STAT1 depende da ativação fosfotirosinas fosfatases (PTPs), em particular PTP e SHP-1, essas ativadas durante o processo de infecção por *Leishmania*; a glicoproteína de superfície de membrana GP63, de grande importante para a virulência parece ser também responsável por essa ativação (Gomez et al., 2009).

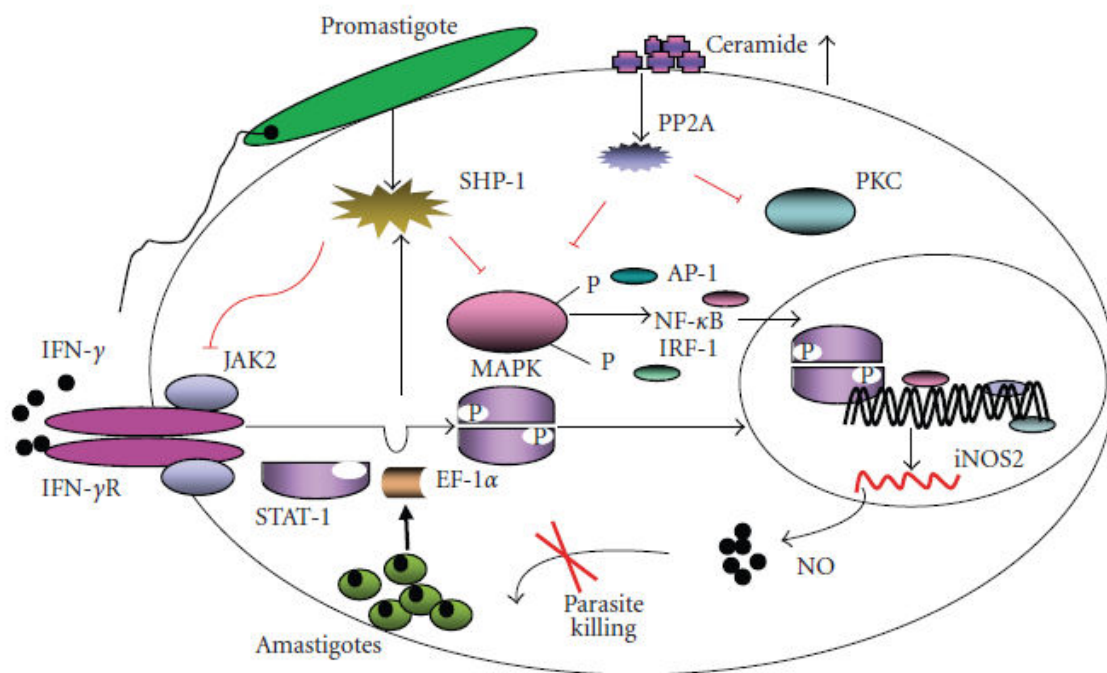


Figura 2: Sinalização intracelular durante infecção por *Leishmania* spp. Durante a infecção, o parasito do gênero *Leishmania* possui mecanismos evolutivos que modulam a resposta e sinalização intracelular. Há a ativação de tirosinas fosfatases (principalmente SHP-1) que inibe diferentes vias de sinalização, como por exemplo as vias de MAPKs e JAK2. Essa modulação intracelular favorece o estabelecimento e multiplicação do parasito.

Os primeiros estudos com *L. major*, definiu em grande parte o paradigma Th1/Th2 em relação à resistência/susceptibilidade a infecção e o papel da IL-12 e IL-4, respectivamente na condução do desenvolvimento de celular Th1 e Th2 (Reiner & Locksley, 1995). Estudos mais recentes utilizando camundongos geneticamente deficientes corroboram com a atividade protetora da IL-12 e da resposta Th1 no controle da infecção, entretanto o papel inicial da IL-4 na exacerbação da doença foi significativamente questionado (Sacks & Anderson, 2004).

Como as principais espécies de *Leishmania* divergiram entre 40-80 milhões de anos, não é surpreendente que diferentes fatores de virulência fossem identificados para as diferentes espécies e conseqüentemente as diferentes espécies estão sujeitas a diferentes controles imunológicos (Stevens et al., 2001).

Os papéis das diferentes citocinas produzidas durante a infecção por diferentes espécies *Leishmania* são dicotômicos. A produção de IL-4 implica na susceptibilidade de camundongos BALB/c infectados por *L. mexicana* e *L. amazonensis* (Alexander et al., 2002), entretanto não parece ser importante para promover a forma crônica da infecção causada por *L. donovani* (Satoskar et al., 1995) como parece desempenhar um papel protetor (Alexander et al., 2000).

Portanto, já é bem estabelecido que a resposta protetora contra a leishmaniose cutânea causada por *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e leishmaniose visceral causada por *L. donovani* é dependente do desenvolvimento e potente resposta imune do tipo Th1. O consenso geral é que IL-12 (produzidas principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (APC) macrófagos, células dendríticas), possivelmente influencia na produção das citocinas IL-1, IL-18 e IL-23 e IL-27, que potencializa e dirige a diferenciação e proliferação de células Th1 (Dinarello, 2002; Langrish et al., 2004; Artis et al., 2004).

E a incapacidade de produzir IL-12 ou, alternativamente a produção de IL-4/IL-13 auxilia na replicação do parasito dentro das células do hospedeiro facilitada pela produção de IL-10. A produção de IL-10 por linfócitos TCD4+CD25+ e de células T regulatórias, pode facilitar a continuidade da infecção e a cronicidade da doença (Alexander & Bryson, 2005).

Conhecendo toda a capacidade de causar morbidade e mortalidade que as diferentes espécies de *Leishmania* causam ao homem e que milhões de pessoas estão em

áreas de risco em todo o mundo, o tratamento e cura dos pacientes infectados devem ser uma preocupação e prioridade para a saúde pública dos os países.

1.5- Drogas usadas no tratamento de Leishmaniose.

A primeira linha de quimioterápicos utilizados contra as diferentes manifestações clínicas, principalmente da leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral, baseiam em um arsenal limitado, incluindo o estiboglucanato de sódio, antimoniato de meglumina, anfotericina B e miltefosina; entretanto esses implicam em problemas emergentes de resistências, graves efeitos colaterais, e custos elevados (Chappuis et al., 2007).

Uma vez que, uma vacina contra a leishmaniose ainda não esteja disponível com eficácia comprovada para todas as espécies (Palatnik-de-Sousa, 2008) a manutenção e melhoria dos tratamentos existentes, combinada com iniciativas de descoberta de novos medicamentos, parecem até o momento ser as únicas formas de garantir o controle contínuo desta importante doença (Rijal et al., 2003; DNDi; 2008).

A Anfotericina B (fungizona) é eficiente contra LV, entretanto é nefrotóxico e necessita de pelo menos 30 dias de internação do paciente. Já a formulação lipomossal da anfotericina B (AmBisoma) é também eficiente e menos tóxica que a fungizona, mas seu custo é muito mais elevado que outras drogas leishmanicidas (Olliaro & Sundar, 2009).

Um fosfolípido análogo a miltefosina é utilizado como tratamento oral na Índia, embora a miltefosina fosse a primeira droga de utilização oral contra *Leishmania*, suas limitações incluem toxicidade no trato gastrointestinal, teratogênese e alto custo (Berman, 2006).

Recentemente, dados mostrados após avaliar a susceptibilidade de cepas *L. donovani* isoladas de pacientes da Índia utilizando anfotericina B, miltefosina e Gluconato de Sódio Antimônio, indicam que pode haver resistência à essas três drogas (Kumar, 2009). Outro composto, que também vem sendo utilizado desde 2006 na Índia, para o tratamento da LV é a paromomicina, um antibiótico, de administração via parenteral (2008).

Embora as opções terapêuticas para o tratamento da leishmaniose visceral tenha melhorado ao longo da última década, ainda é necessário uma droga oral, que venha proteger contra o problema de resistência e possa ser utilizada em combinação ou isoladamente com a miltefosina. O desenvolvimento de um agente oral, ou de administração tópica também é necessário se faz necessário para o tratamento da leishmaniose cutânea, substituindo as drogas administradas via parenteral que atualmente possuem alta toxicidade. Assim, novos compostos estão sendo testados para alcançar esses objetivos. Esses novos compostos incluem desde substâncias naturais provenientes de plantas, produtos de animais peçonhentos à novos produtos sintéticos.

Segundo Vermeersch e cols, (2009), substâncias leishmanicidas, são aquelas que possuem como “gold standar” (padrão ouro) a capacidade antiparasitária sobre formas amastigotas intracelulares *in vitro*. Deste modo, alguns novos compostos e/ou reformulações dos compostos já utilizados, mostram nos últimos anos dados promissores e possíveis novos fármacos.

Podemos citar como exemplo, alquifosfoclorinas que possui maior atividade contra *L. donovani* que a miltefosina. Já a amiodarona possui efeito contra *L. mexicana* interferindo com a homeostase do cálcio.

Outros exemplos de compostos são as 4-Arilocoumarins, que além de possuir atividade antitumoral, teve sucesso na eliminação e multiplicação de amastigotas

intracelular em macrófagos THP-1. E diferentes arilimidamidas compostos que possuem grupamentos de amidinas são eficiente contra amastigotas de *Leishmania*.

Outras substâncias como, quinolinas, quinazolinas, pirimidinas, triazinas, corantes de rodacianina e inibidores do metabolismo de esterol, demonstram boa atividade leishmanicida (Richard & Werbovetz, 2010).

1.6- Poliaminas

Poliaminas são substâncias policationicas, simples e alifáticas. Entre as poliaminas, as diaminas são moléculas que possuem dois grupos NH_2 . Comopostos dessa natureza, mostraram recentemente, grande potencial para o tratamento antiparazitário (Giordani et al., 2011).

O metabolismo de poliaminas é uma promissora via explorada nos últimos anos para combater diferentes tipos de doenças, desde diferentes tipos de câncer à doenças autoimunes. Poliaminas (principalmente putrescina, espermidina e espermina) são essenciais para o crescimento celular e proliferação em todos os organismos (Heby et al., 2003).

Em condições fisiológicas, o papel das poliaminas é essencial nos parasitos como em seus hospedeiros, sendo essas moléculas protonadas facilmente no pH intracelular. Essa propriedade permite que poliaminas interajam espontaneamente com longas macromoléculas aniônicas, tais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Muitos processos celulares são poliaminas-dependente. Os níveis intracelulares das poliaminas são máximos durante a proliferação celular em processos tumorais ou infecciosos, e são alvo-chave no desenvolvimento de substâncias quimioterápicas análogas que podem interferir com essa via intracelular (Reguera et al., 2005).

Todos os vertebrados, eucariotos menos derivados incluindo fungos e a maioria dos protozoários, sintetizam poliaminas “de novo” de dois precursores aminoácidos: L-ornitidina e L-metionina. Putrescina (1,4-diaminobutano) é enzimaticamente sintetizado a partir de L-ornitina pela ornitina descarboxilase (ODC). A síntese de espermidina por sua vez, envolve a condensação da putrescina com uma metade de aminopropil da decarboxi-S-adenosilmetionina, mediada pela enzima espermidina sintase na ausência de ATP. Entretanto, os mecanismos pelos quais as poliaminas são adquiridas e sintetizadas em protozoários são diferentes daqueles utilizados por células de mamíferos, e a interferência com essa via causaria maiores e severas consequências nos parasitos que em seu hospedeiro (Muller, et al., 2001).

Assim, a síntese e o uso de substancias análogas as poliaminas podem interferir com esse sistema poliamina/diamina e o seu transporte, podendo fornecer ferramentas que interfiram na sobrevivência do parasito intracelular (Heby et al., 2003).

Deste modo, Del Olmo e cols. (2002) relataram a atividade leishmanicida de diferentes diaminas e amino alcoóis alifáticos sintetizados, Labadie e col. (2004), Costa et al., (2009) tiveram o mesmo sucesso em mostrar efeito leishmanicida a partir de diferentes diaminas sintetizadas. Já Vannier-Santos et al., (2008) mostraram que a putrescina análoga 1,4-diamino-2-butanone afetou a síntese de poliaminas, transporte, provocando alterações ultraestruturais e diminuição da sobrevivência intracelular de *Leishmania amazonensis*.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

2.1.1 Avaliar o efeito *in vitro* do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina sobre diferentes espécies de *Leishmania*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a atividade do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina sobre a viabilidade celular das células HFF-1 (“human foreskin fibroblasts”), THP-1 (“human monocytic leukemia cell line”), e macrófagos J774. G8 e macrófagos peritoneais estimulados com Tioglicolato de camundongos BALB/c, pelo método MTT.

2.2.2 Avaliar a atividade do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina sobre a viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* pelo método MTT e azul de tripano.

2.2.3 Verificar as alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura nas promastigotas de *Leishmania* utilizadas e em macrófagos J774.G8

2.2.3 Avaliar a ação do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina no tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L.amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* quanto a produção de citocinas e índice de multiplicação e índice de infecção.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Formulação do Composto

N-dodecyl-1,2-etanodiamina(GUT-1); $C_{14}H_{32}N_2$; MM: 228,32g/mol foi sintetizado e purificado como descrito por Costa e col. (2009). Analisando por infravermelho ^1H e ^{13}C NMR a espectroscópica indica que o rendimento foi de 53%. Esse composto foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida da Univesridade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, para a realização desse trabalho. O composto foi adicionado a diferentes culturas celulares (Promastigotas de *Leishmania* e Culturas de células de mamíferos) em solução com DMSO, sendo que a concentração final de DMSO nunca excedeu 0,01% de DMSO (vol/vol) a qual não possui efeito algum sobre as culturas celulares.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas, mantidos no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA-UFU).

3.3 Culturas Celulares

3.3.1 Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Setenta e duas horas antes da obtenção dos macrófagos peritoneais, dois ml de solução tioglicolato 3% foram injetados intraperitoneal nos camundongos. Macrófagos peritoneais inflamatórios foram coletados da cavidade peritoneal desses animais por

lavagem com RPMI-1640 gelado, suplementado com antibiótico. As células coletadas foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm a 4°C. As células obtidas após centrifugação foram contadas utilizando câmara de Neubauer e ajustadas à concentração de 2×10^4 células/porço e dispostas em placas de 96 poços, ou a concentração foi ajustada para 2×10^5 células/poço e dispostas em placas de 24 poços. As placas de cultura foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina e estreptomicina à 37°C e tensão de 5% de CO₂. Após 12 horas as células não aderentes foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640.

3.3.2 Linhagens celulares

Human foreskin fibroblasts (HFF-1), human monocytic leukemia cell line (THP-1), e macrófagos J774. G8 foram cultivados a 37°C em tensão de 5% de CO₂, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) contendo 0,37% de bicarbonato de sódio e 1% penicilina/streptomicina e 1mM de L-glutamina.

3.4 Parasitos

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania (V) brasiliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania (L) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivados em garrafas de cultura de 25cm³ à 28°C em meio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, UK), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% penicilina/streptomicina e 1mM de L-glutamina, até atingirem a fase estacionária.

3.5 Tratamento das células com o composto N-dodecil-1,2-etanodiamina

Os diferentes tipos celulares (mamíferos e diferentes espécies de *Leishmania*) utilizadas foram incubados e cultivados em placa de 96 poços. Diferentes concentrações do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina (10, 5, 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 µg/ml) foram adicionadas as triplicata de HFF, THP1, macrófagos peritoneais e macrófagos J774.G8 na concentração de 2×10^5 célula/poço e *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* na concentração de 5×10^6 promastigota/poço. A viabilidade celular foi analisada por teste MTT (3-(4,5-dimetil- 2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium-bromidico) em todos os tipos celulares durante 24, 48 e 72 horas. Para a reação de MTT 10µL de solução (5mg/ml) foi adicionada a cada triplicada, a reação ocorreu durante 4 horas, no escuro e em seguida a reação foi interrompida com 100µL de isopropanol-ácido (2,5mM ácido clorídrico em Isopropanol) e incubada por 10 minutos. As leituras foram feitas a 540 nm em leitor de placas (Molecular Devices, USA). O mesmo ensaio foi realizado três vezes em momentos diferentes e com as mesmas condições. A taxa de viabilidade será calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \text{ABS teste} \times 100 - 1000 / \text{ABS controle}$$

3.6 Ensaio de Multiplicação de formas promastigotas

Promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* na concentração de 5×10^6 promastigota/poço, foram cultivadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina (10, 5, 2,5; 1,25; 0,62; 0,31 e 0,15µg/ml) durante 24, 48 e 72 horas. Em cada tempo analisado 10µl de cada triplicata era coletado e contado em câmara de Neubauer com azul de tripano (4%).

3.7 Infecção experimental *in vitro* e tratamento

Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c foram dispostos na concentração de 2×10^5 células/poço, em placa de 24 poços e cultivados sobre lamínulas de vidro a 37°C em tensão de 5% de CO₂, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) contendo 0,37% de bicarbonato de sódio, 1% penicilina/streptomicina e 1mM de L-glutamina. Após 24 horas estas células foram infectadas na proporção 10:1 com formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Após 3 horas a 37°C os promastigotas não internalizados foram lavados com meio RPMI 1640. Foi novamente adicionado meio RPMI completo, complemento com 1µg/ml ou 0,5µg/ml do composto N-dodecil-1,2-etanodiamina ou 1 µg/ml de anfotericina por 24, 48 e 72 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂. Para observação microscópica de campo claro, as lamínulas com as células foram fixadas em metanol 15 minutos e coradas com solução de Giemsa por 1 hora. Após contagem das células em câmara microscópio óptico, os resultados foram expressos através dos seguintes parâmetros de infecção:

1. Taxa de infecção: número de células infectadas por 200 células examinadas (%)
2. Taxa de multiplicação intracelular: número de parasitos por célula infectada

Houve um controle para efeito de comparação entre células infectadas e não tratadas em relação a células infectadas e tratadas com os compostos químicos.

3.8 Dosagem de citocinas

O sobrenadante das culturas do ensaio de infecção e tratamento forma coletados para dosagem das citocinas após 24, 48 e 72 h, e os níveis de IL-12p40 e TNF-α foram

mensurados por ELISA de captura (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

3.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Parasitas tratados ou não tratados com 0,5µg/ml em 1, 3 6, 12 e 24 horas foram fixados por 3 horas a 4°C em solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemical Co.) em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Após fixação, as células foram pós fixadas por 30 minutos em solução contendo 1% de OsO₄ e 0,8% ferrocianida de potássio em tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente a esse processo as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações crescentes de acetona (50%-100%) e embebidas em Epon-acetona até somente Epon. Cortes Ultrafinos, obtidos por ultramicrotomos foram marcados com uranil acetado e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico FEI MorgagniF268 (Eindhoven, The Netherlands).

3.10 Microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura, as mesmas amostras para a microscopia de transmissão foram utilizadas. Para retirar totalmente a solução contendo glutaraldeído, as amostras foram lavadas seis vezes consecutivas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 e então pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas com o mesmo tampão por seis vezes consecutivas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), 20 minutos em cada concentração, sendo que, na última, as amostras foram lavadas por três vezes consecutivas, 20 minutos em cada lavagem. Depois da desidratação, o material passou pela câmara de secagem do secador de ponto crítico, mediante a utilização de dióxido

de carbono. O material foi então montado em porta objeto apropriado, recoberto com uma camada de 30 nm de ouro e finalmente, elétronnicrografado em microscópio eletrônico de varredura (Modelo JEOL JSM 5310), operando em 25 KV.

3.11 Análise estatística

Comparações estatísticas foram realizadas por análises das variâncias (one-way-ANOVA) e as diferenças estatísticas dos dados foram analisadas por teste de comparação múltipla de Tukey. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade Leishmanicida do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina *in vitro*.

A atividade do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina foi avaliada sobre formas promastigotas de *Leishmania* em diferentes concentrações (10ug/ml a 0,15ug/ml) e diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Essa atividade foi analisada pelos ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT e multiplicação por contagem em câmara de Neubauer, na presença de corante vital azul de tripan. Foi observado que em ambas os métodos de avaliação as formas promastigotas demonstraram ser susceptíveis ao composto. Houve redução estatisticamente significativa da porcentagem de viabilidade e multiplicação de promastigotas axênicas das espécies *L. amazonensis* (Figura 4 A e B), *L. chagasi* (Figura 6 A e B) *L. braziliensis* (Figura 5 A e B) em comparação aos parasitos não tratados com *N*-dodecil-1,2-etanodiamina.

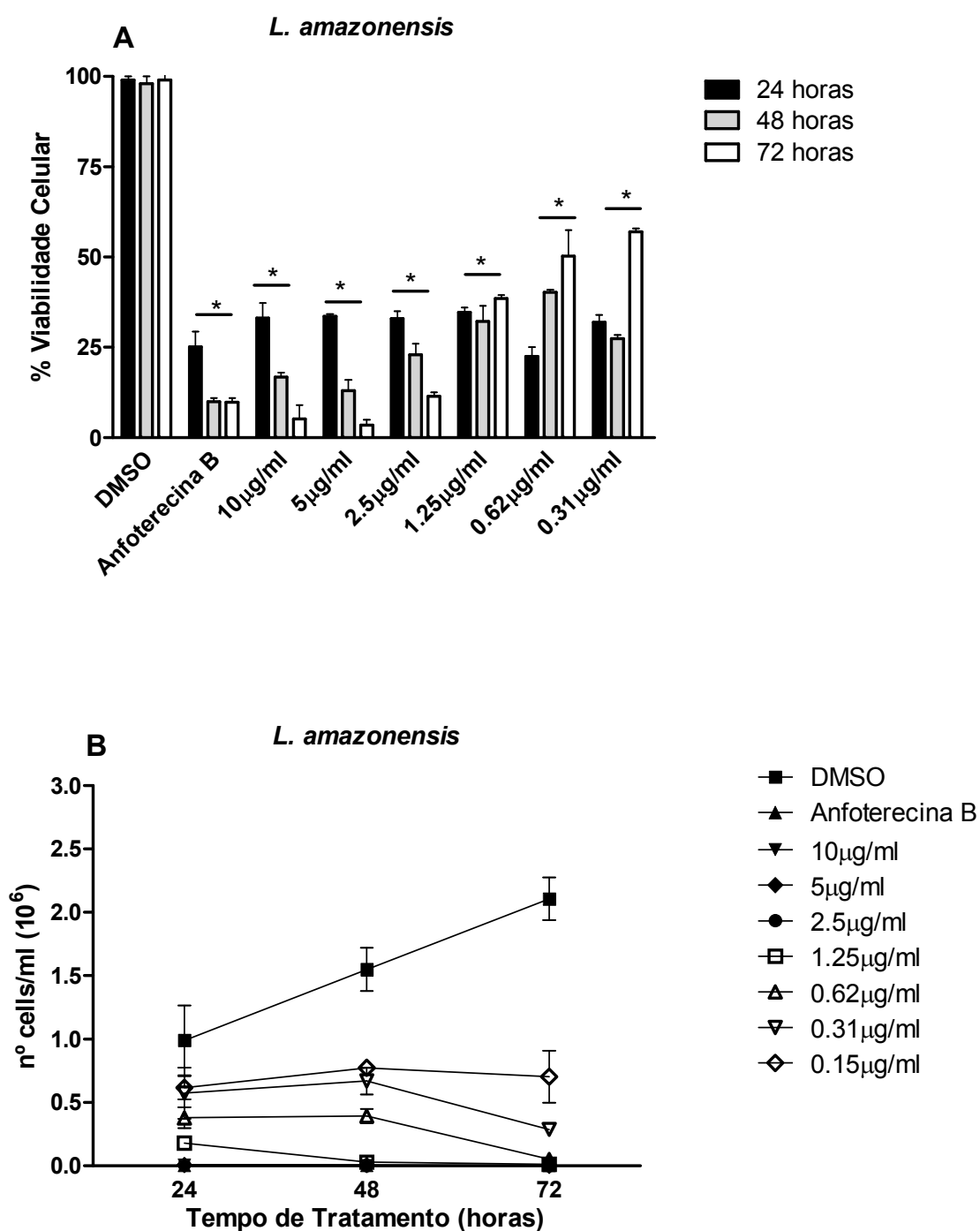


Figura 4- Viabilidade celular de *Leishmania amazonensis* após 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina. A porcentagem de viabilidade celular obtida do método MTT foi calculada através da equação: %viabilidade = $\frac{\text{ABS testex}100-1000}{\text{ABS}}$, em todos os tempos e concentrações analisadas foi possível observar diferença estatisticamente significativa do grupo com tratamento * $p < 0.05$. (B) Curva de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* tratada com diferentes concentrações de f GUT-1 in 24, 48 e 72 horas. Os dados representa a média $\pm$ o desvio padrão $p < 0.01$.

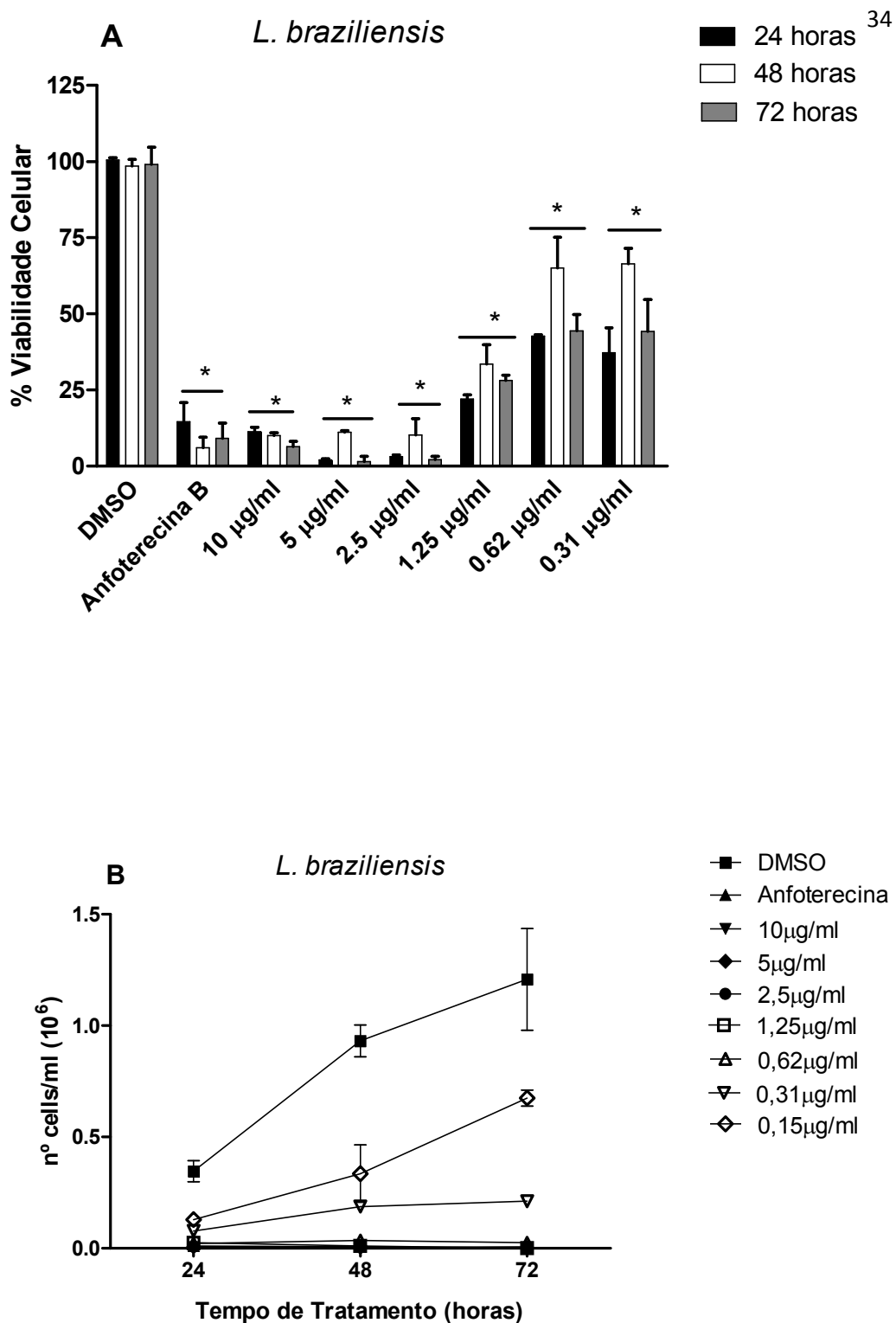


Figura 5. Viabilidade celular de *Leishmania chagasi* após 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina. A porcentagem de viabilidade celular obtida do método MTT foi calculada através da equação: %viabilidade = $\frac{\text{ABS test} \times 100 - 1000}{\text{ABS}}$, em todos os tempos e concentrações analisadas foi possível observar diferença estatisticamente significativa do grupo com tratamento * $p < 0.05$. (B) Curva de crescimento de promastigotas de *L. chagasi* tratada com diferentes concentrações de f GUT-1 in 24, 48 e 72 horas. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão $p < 0.01$.

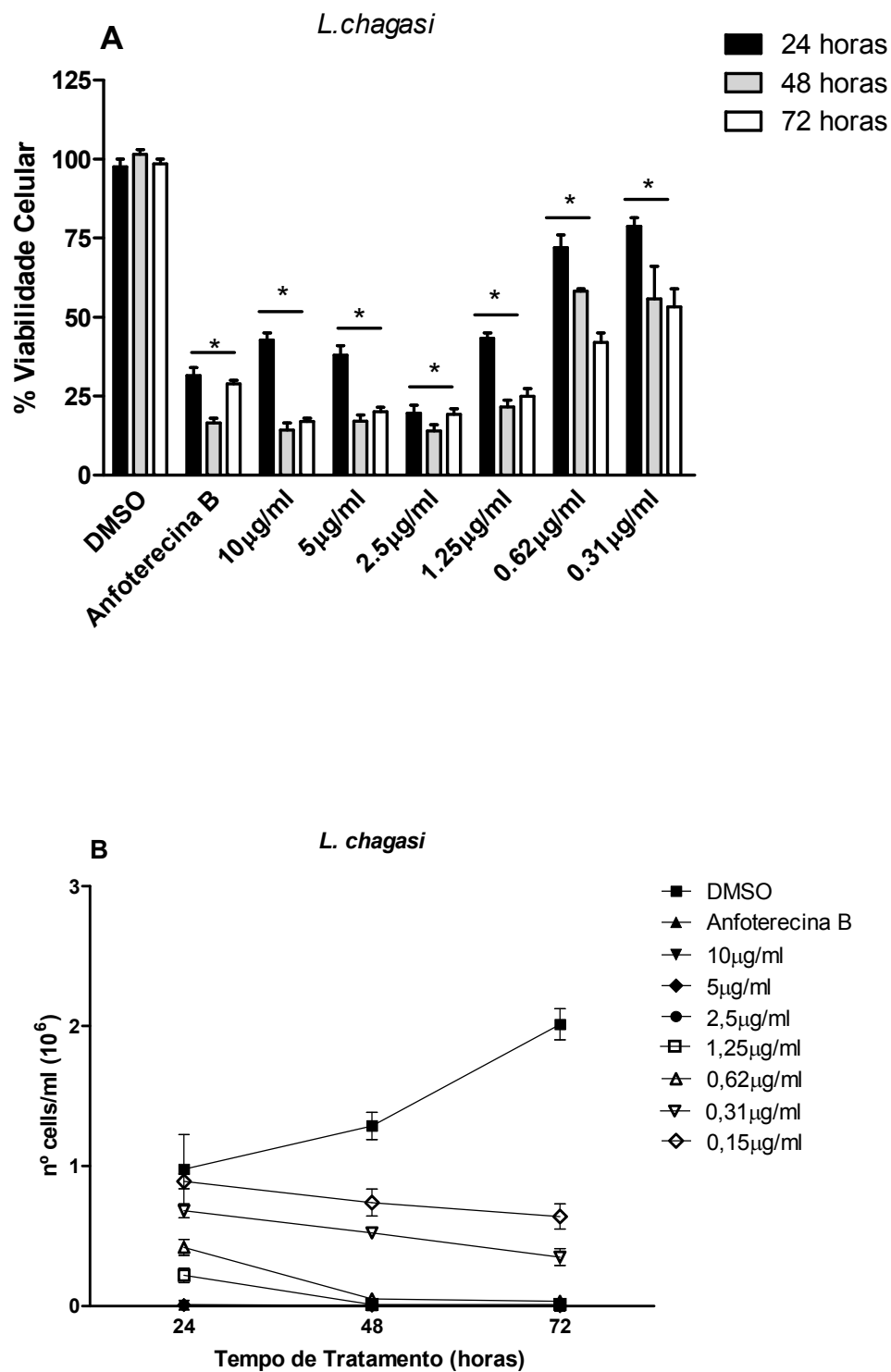


Figura 6- Viabilidade celular de *Leishmania braziliensis* após 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina. A porcentagem de viabilidade celular obtida do método MTT foi calculada através da equação: %viabilidade = $\frac{\text{ABS testex}100-1000}{\text{ABS}}$, em todos os tempos e concentrações analisadas foi possível observar diferença estatisticamente significativa do grupo com tratamento * $p < 0.05$. (B) Curva de crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* tratada com diferentes concentrações de f GUT-1 in 24, 48 e 72 horas. Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão $p < 0.01$

4.2 Análise do efeito do *N*-dodecil-1,2-etanodiamina sobre células de mamíferos

Para verificar o efeito do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina sobre células de mamíferos utilizou-se as mesmas concentrações (10µg/ml à 0,15µg/ml) as quais tiveram efeitos sobre as diferentes espécies de *Leishmania*. Para tanto, foram utilizadas macrófagos peritoneais de camundongos (células primárias), macrófagos J774.G8, HFF e THP-1 (células de linhagens). Foi observado que apenas concentrações muito altas (10 µg/ml e 5µg/ml) afetaram a viabilidade dessas células (Figura 7), observando principalmente no período 48 horas após tratamento. Entretanto, todas as células avaliadas mostraram maior resistências ao composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina nas demais concentrações, apresentando viabilidades semelhantes à aquelas onde as células foram cultivadas na ausência do composto (células controles). Concentrações abaixo de 5µg/ml não reduziram estatisticamente em nenhum dos tempos analisados a viabilidade celular quando comparado ao controle não tratado (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D).

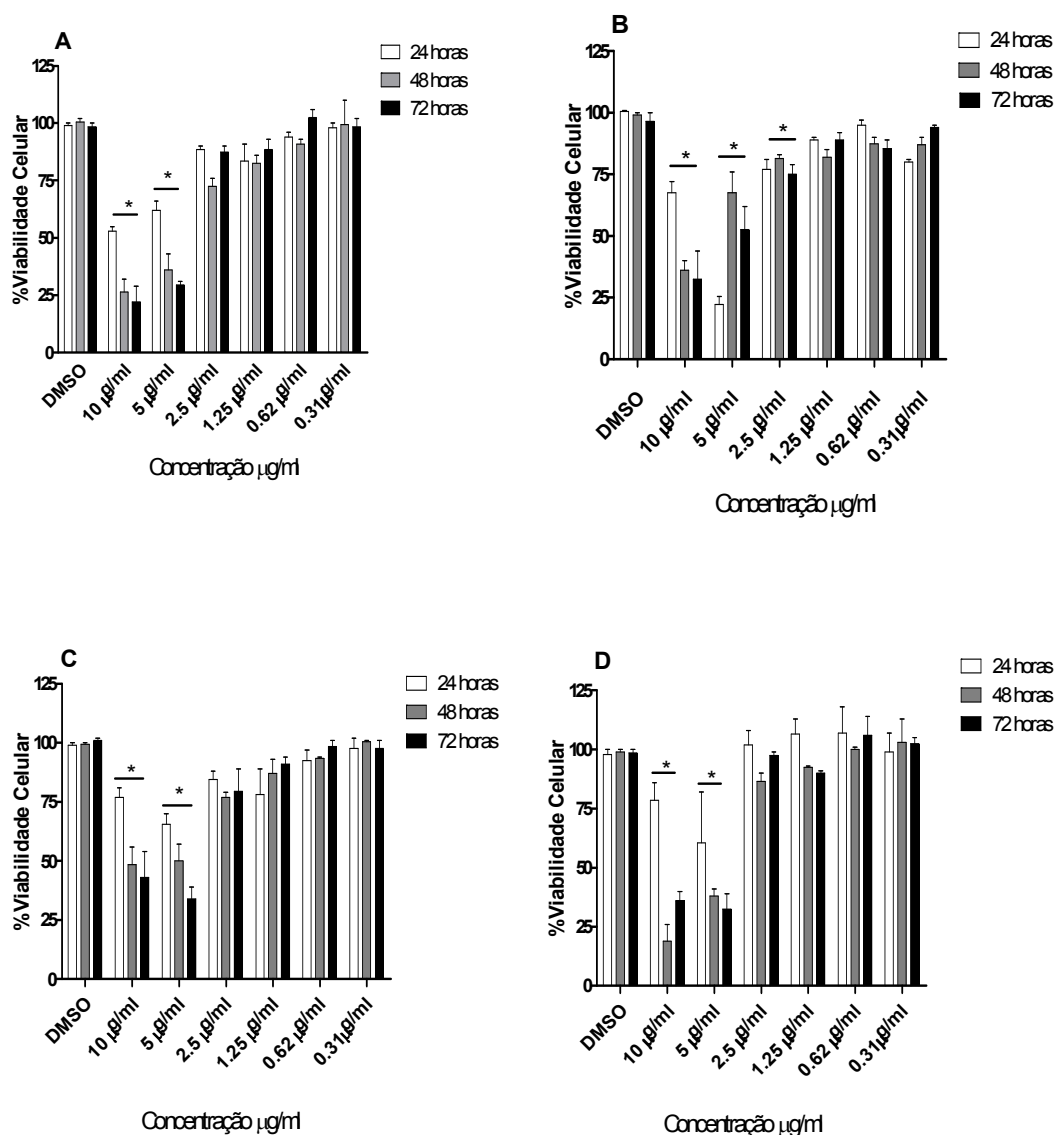


Figura 7- Viabilidade celular de diferentes tipos de células de mamíferos após 24, 28 e 72 horas de tratamento com diferentes concentrações do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina. (A) macrófago murino inflamatório; (B) Fibroblasto humano (HFF); (C) Leucemia mielocítica aguda (THP-1); (D) Macrófago J774G-8. Porcentagem da viabilidade obtida através do Método MTT e calculada através da equação: %viabilidade = $\frac{ABS_{testex} - 1000}{ABS}$. Somente as concentrações 10 e 5 µg/ml mostraram diferentes estatisticamente significativa com * $p < 0.05$.

4.3 Atividade leishmanicida *in vitro* em amastigotas intracelular

Após verificar o efeito leishmanicida do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina em concentrações inferiores à 1,25µg/ml, sendo que nessas concentrações não observase efeito citotóxico nos diferentes tipos celulares analisados; foram estabelecidas as concentrações de 1 µg/ml e 0,5 µg/ml para o tratamento de macrófagos inflamatórios de camundongos infectados com *Leishmania*.

Foram analisados os índices de infecção e de multiplicação após 24, 48 e 72 de infecção e tratamento. Nestas condições, o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina apresentou atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas intracelulares (Figura 8, 9 e 10). Foi observada redução estatisticamente significativa do número de parasitos intracelulares, quando comparando o grupo de células infectadas e tratadas, com o grupo de células não tratado e infectadas com *L. amazonensis* ($p<0,05$; Figuras 8A e 8B). Já macrófagos infectados com *L. chagasi* (Figuras 9A e 9B) e *L. braziliensis* (Figuras 10A e 10B) a redução nos índices de infecção e multiplicação apresentam de forma variada.

Diferenças estatisticamente significantes do efeito dos composto sobre as espécies de *Leishmania* foram observadas nos tempos acima de 48 horas e na concentração de 1 µg/ml (Figuras 6 e 7). Utilizando como controle de tratamento anfotericina B em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, não houve diferença entre macrófagos infectados e tratados com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina (Figuras 5 A e B). Porém, esse efeito não se observa quando as são células infectadas com as outras espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis* ou *L. chagasi*) recebem o tratatamento com anfotericina B (Figuras 6 e 7).

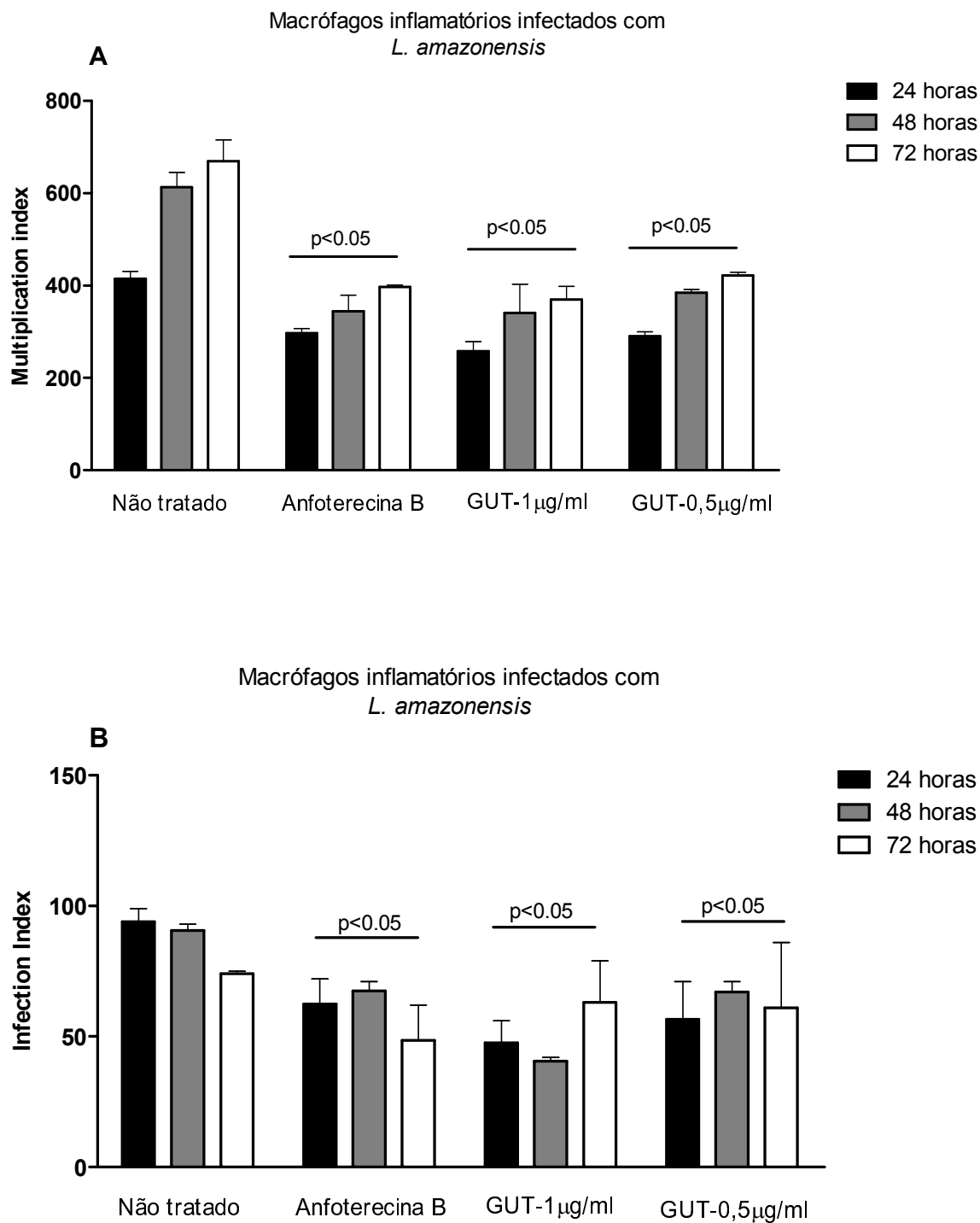


Figura 8- Macrófagos peritoneais de camundongos obtidos com tioglicolato, infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com 1 µg/ml ou 0,5 µg/ml de GUT-1 ou anfotericina, durante 24, 48 e 72 horas. Número de amastigotas intracelular a cada 200 células (A) e o número de macrófagos infectados com pelo menos uma amastigota (B). Os valores representam a média das duplicatas $\pm$ o desvio padrão. * valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) do grupo controle não tratado utilizando teste estatístico ANOVA.

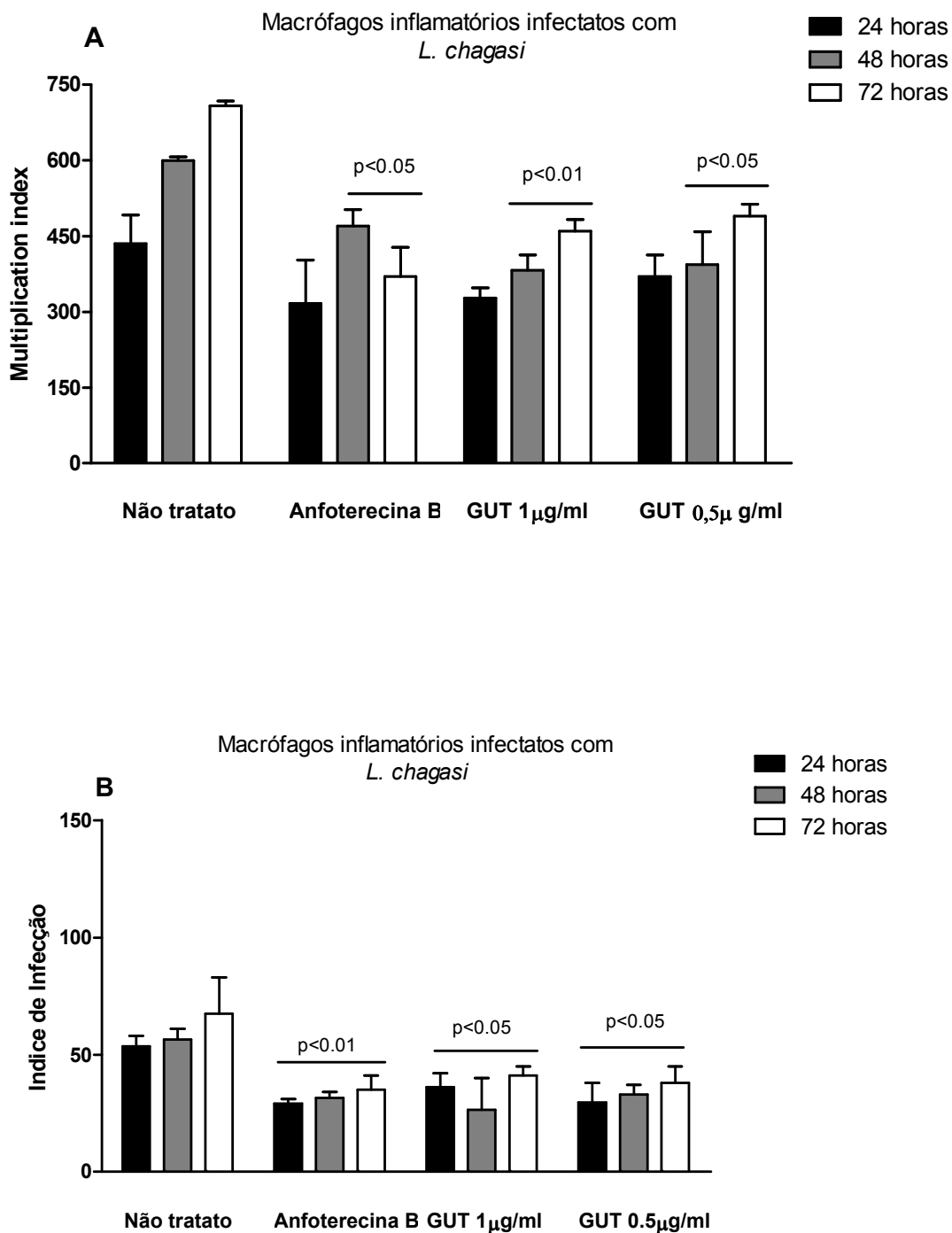


Figura. 9- Macrófagos peritoneais de camundongos obtidos com tioglicolato, infectados com promastigotas de *L. chagasi* e tratados com 1µg/ml ou 0.5µg/ml de GUT-1 ou anfotericina, durante 24, 48 e 72 horas. Número de amastigotas intracelular a cada 200 células (A) e o número de macrófagos infectados com pelo menos uma amastigota (B). Os valores representam a média das duplicatas $\pm$ o desvio padrão. * valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) do grupo controle não tratado utilizando teste estatístico ANOVA.

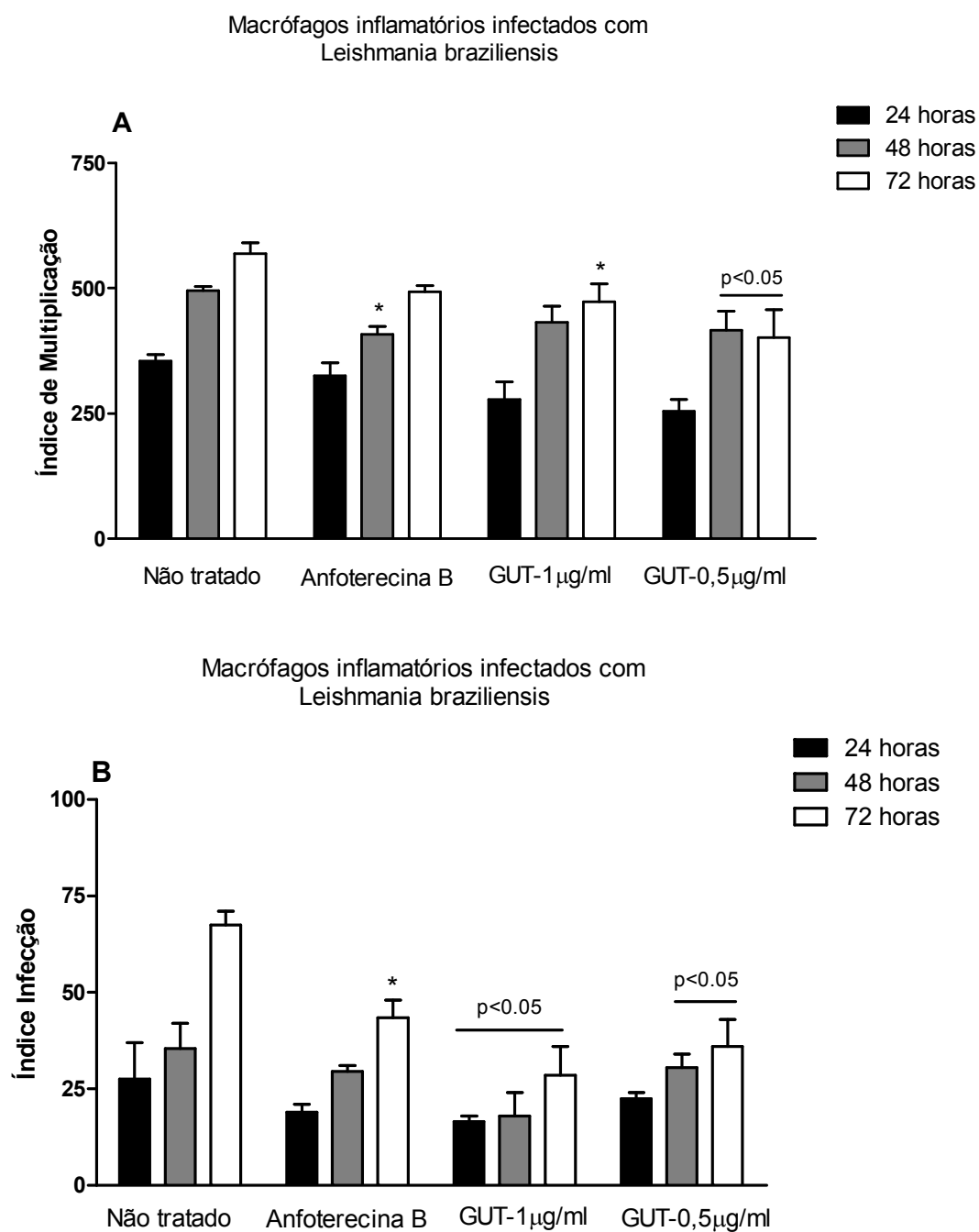


Figura 10- Macrófagos peritoneais de camundongos obtidos com tioglicolato, infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e tratados com 1µg/ml ou 0.5µg/ml de GUT-1 ou anfotericina, durante 24, 48 e 72 horas. Número de amastigotas intracelular a cada 200 células (A) e o número de macrófagos infectados com pelo menos uma amastigota (B). Os valores representam a média das duplicatas $\pm$ o desvio padrão. * valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) do grupo controle não tratado utilizando teste estatístico ANOVA.

4.4 A influência do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina na produção de citocinas

Sobrenadantes dos macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania* e tratados com composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina foram coletados nos períodos de 24, 48 e 72 horas de cultivo e os níveis das citocinas IL-12p40 e TNF- α foram mensuradas por ensaio ELISA de captura. Nesses sobrenadantes dos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*, não houve detecção de IL-12p40 nos em nenhuma das condições de tratamento (*N*-dodecil-1,2-etanodiamina 1 μ g/ml e 0,5 μ g/ml ou anfotericina B 1 μ g/ml) inclusive nos controles (tratados e não infectados). Contudo, em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos não infectados e não tratados, houve detecção de IL-12p40, com aumento dos níveis estatisticamente significante nos períodos de 48 e 72 horas ($p < 0,05$; Tabela 1). Por outro lado, a detecção de TNF- α só foi observada em macrófagos infectados e tratados com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina (Tabela 1).

TABELA 1. Macrófagos Peritoneais de camundongos BALB/c infectados ou não com *L. amazonensis* em diferentes condições de tratamento.

Grupos	IL-12p40 pg/ml			TNF- α pg/ml		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tratado ^a	48 216 $\pm$ 18.53*	108.194 $\pm$ 5.36	134 770 $\pm$ 21.47	ND	ND	ND
Não infectado ^b	58 89 $\pm$ 4.89*	57 234 $\pm$ 12.58	121 456 $\pm$ 33.67	ND	ND	ND
Infectado ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Anfotericina ^d	ND	ND	ND	463.686 $\pm$ 112.4	688 50 $\pm$ 6.4	597.41 $\pm$ 14.1
GUT-1 1 μ g/ml ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GUT-1 0,5 μ g/ml ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Dados representam a média $\pm$ o desvio Padrão

* $P < 0,05$ O valor de p é estatisticamente significante

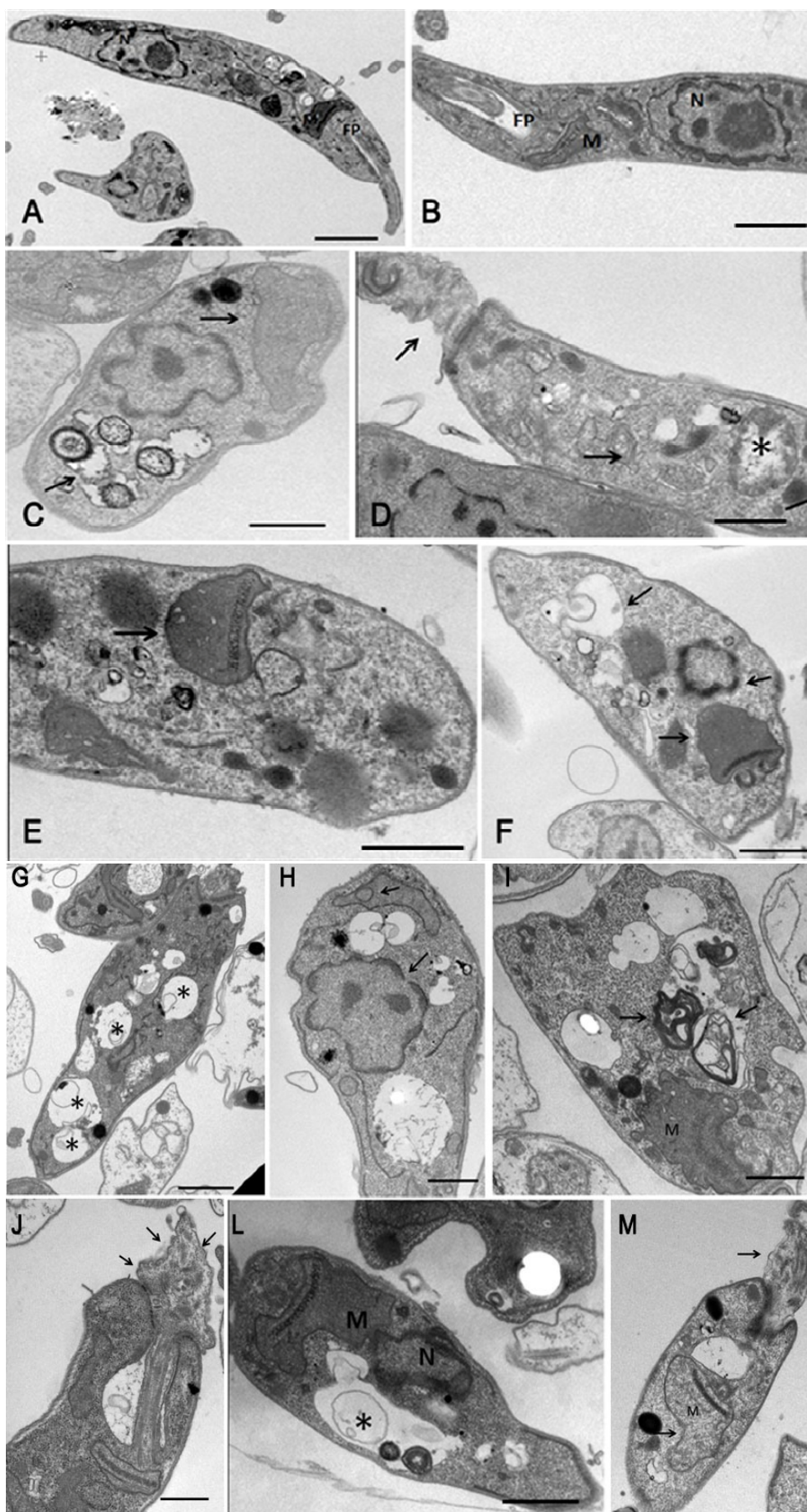
ND: Não determinado

a= Macrófagos peritoneais não infectados e tratados com 1 μ g/ml do composto GUT, b= macrófagos peritoneais não infectados e não tratados; c= macrófagos infectados com *L. amazonensis* sem tratamento; d, e e f= macrófagos infectados com *L. amazonensis* com diferentes esquemas de tratamento.

4.5 Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania amazonensis* devido tratamento com composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina

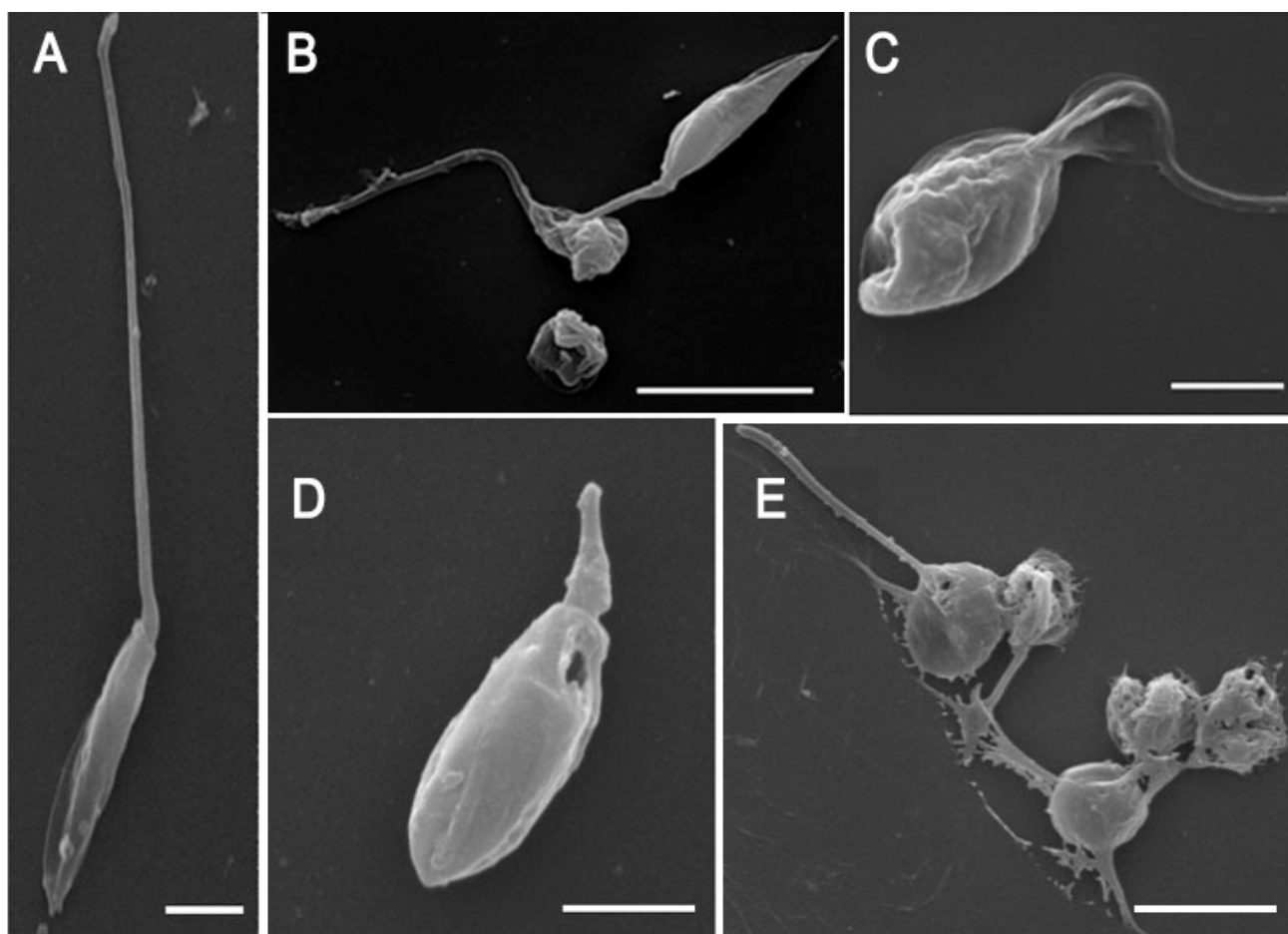
As alterações ultraestruturais de formas promastigotas de *L. amazonensis* devido o tratamento com composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina estão representadas na figura 9. Formas promastigotas não tratadas (Figura 9A e 9B) ou tratadas com 0,5µg/ml do composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Nos parasitos previamente tratados, a partir de 1 hora de tratamento já se observa alterações ultraestruturais em algumas promastigotas com formação de vacúolos intracelular (Figura 9C), alterações na membrana flagelar (Figura 9D) início de desorganização citoplasmática e inchaço mitocondrial (Figura 9E), além do início da formação de estruturas membranosas (“retículos-like”) (Figura 9D). Com 3 horas de tratamento já se observa grandes alterações ultraestruturais em grande parte das promastigotas de *L. amazonensis*. Observa-se maior inchaço mitocondrial conjuntamente com alterações na condensação do DNA (Figura 9F), intensifica-se a formação de vacúolos intracelulares (Figura 9G), além da formação de um numero cada vez maior de estruturas “retículo-like” tanto no citoplasma (Figura 9I), com o aparecimento desse tipo de estrutura dentro de mitocôndrias (Figura 9H). Após 6 horas de tratamento há poucas formas promastigotas com sua morfologia sem nenhuma alteração, e o aumento da desorganização citoplasmática e formação de estruturas membranosas é ainda mais evidente além da perda da característica flagelar com deformações nas membranas (Figura 9J). A partir de 12 horas de tratamento observa-se grandes vacúolos que ocupam quase todo o citoplasma (Figura 9L). E, com 24 horas de tratamento grandes partes das formas promastigotas já são consideradas “fantasmas” devido a perda da eletrodensidade, pouca presença de material citoplasmático, perda de morfologia e alterações nucleares e mitocondriais irreversíveis (Figura 9M).

Figura 11: Sessões ultrafinas analisadas por microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em diferentes tempos tratados ou não, com GUT na concentração de 0,5µg/ml. (A e B) grupo sem tratamento com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina e sem alterações aparentes em sua morfologia. O cinetoplasto (K), mitocôndria (M) e a bolsa flagelar (FP) são observadas sem alterações ultraestruturais. (C-E) cortes ultrafinos de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas por 1 hora com o composto GUT. Após esse período de tratamento observam-se alterações ultra-estruturais tais como: inchaço mitocondrial (C e E) início da formação de vacúolos (C) formação de estruturas membranares (D). (F-I) Formas promastigotas tratadas por 3 horas. Alterações nucleares e desorganização citoplasmática (F) aumento das alterações estruturais, com aumento do número de vacúolos intracelulares (G) estrutura membranas dentro de mitocôndrias (H) aumento de estruturas membranosas “retículo-like” em todo o citoplasma celular (I). (J) 6 horas de tratamento membrana flagelar com alterações acentuadas. (L) Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com por 12 horas, grande vacúolo intracelular ocupando grande parte do citoplasma celular. (M) 24 horas de tratamento, na qual se observa perda completa da morfologia normal, perda de eletrodensidade, alteração mitocondriais e na bolsa e membrana flagelar.



Alterações superficiais observadas a partir da análise de imagens de microscopia de varredura, mostram forma convencional de promastigotas sem alterações aparentes quando não tratadas com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina (Figura 10A), entretanto quando há o tratamento já em 1 horas observa-se em algumas promastigotas o arredondamento com perda de sua característica alongada (Figura 10B). Com 3 horas de tratamento observa-se “ruffles” na membrana (Figura 10C). Nesse período, observa-se também que após o tratamento, há formação de poros na membrana (Figuras 10D e 10E), perda flagelar (Figura 10D) e formas arredondadas. A perda completa da morfologia foi observada ao longo de todo o tratamento (Figuras 10B, 10C, 10D e 10E).

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura. (A) *L. amazonensis* sem tratamento. (B-E) Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 0,5µg/ml do composto N-dodecil1,2-etanodiamina em diferentes tempos. (B) 1 horas de tratamento com o composto GUT, promastigotas apresentando formas arredondadas. (C) 3 horas de tratamento, presença de “ruffles” em toda a extensão corporal na membrana de formas promastigotas. (D) 6 horas de tratamento, formação de poros na membrana celular, perda flagelar e inchaço na região próxima a bolsa flagelar. (E) 24 horas de tratamento, perda completa da morfologia corporal, com formação de diversos poros.



5. DISCUSSÃO

Diferentes abordagens tem sido adotadas pelos pesquisadores para descobrir uma substância leishmanicida eficiente, segura, de baixo custo e baixa citotoxicidade. O atual arsenal quimioterápico para leishmaniose é insatisfatório devido à administração parenteral dos antimoniais e pentamidinas, que promovem grande toxicidade e significativas taxas de insucesso.

Em buscas de novos fármacos leishmanicidas eficazes Tempone e cols. (2009) demonstraram pela primeira vez na literatura que nimodipina, uma droga usada para prevenir e tratar a lesão isquêmica causadas por espasmos arteriais cerebral e hemorragia subaracnóide, apresenta atividade específica às espécies causadoras da leishmaniose cutânea e visceral.

Além disso, Martinez e col. (2008) mostraram que a hidroxiuréia, uma droga utilizada no combate ao câncer é altamente eficaz contra amastigotas intracelular de *L. mexicana in vitro*. Nesse contexto, Al-adbely (1998) utilizando o antifúngico KY62, apresentou potente atividade contra a leishmaniose cutânea experimental causada por *L. amazonensis* e contra leishmaniose visceral causada por *L. donovani*.

Outro foco da pesquisa terapêutica também é reformular os fármacos leishmanicidas já utilizados, a fim de melhorar seus mecanismos de ação com a redução da toxicidade e maior eficiência em menor tempo de tratamento dos hospedeiros (Manandhar et al., 2008; Muller et al., 2001).

Vale também ressaltar os estudos realizados com os compostos derivados de extratos de plantas (Panunto-Castelo et al., 2001; Afonso-Cardoso, et al., 2007) e toxinas de animais (Passero, et al., 2008) que mostram resultados promissores no tratamento não somente da *Leishmania* mas também outros protozoários.

Outras pesquisas focam no design de compostos que atacam as diferentes vias metabólicas dos parasitos, nesse sentido Sem e cols (2008) utilizando quercetina (Qr) *in vitro* interferiram no metabolismo de ferro dos parasitos, mostrando atividade antiparasitaria em combinação com a albumina, sugerindo um promissor composto para o tratamento das leishmanioses.

No presente trabalho, utilizamos o composto catiônico *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, um análogo às poliaminas. Similar aos vertebrados, a grande maioria dos tripanossomatídeo, possui em sua via metabólica a aquisição e metabolização de poliaminas para diferentes processos celulares, incluindo crescimento e diferenciação. Entretanto, essas vias são distintas e a manipulação da via de poliaminas pode causar mais danos aos protozoários à células de mamíferos.

Nesse sentido, a inibição da biossíntese do parasita utilizando diaminas análogas pode ser uma interessante abordagem terapêutica no design de novos compostos antiparasitários (del Olmo, et al., 2002; Labadie, et al., 2004; Tavares, et al., 2005).

Nossos estudos *in vitro*, sugerem que o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, suporta a afirmação anterior, sendo um promissor composto para o tratamento das leishmanioses, uma vez que, em baixas concentrações houve alta toxicidade contra promastigotas axênicas de diferentes espécies de *Leishmania* (Figuras 4, 5 e 6) e por outro lado, somente em altas concentrações (cerca de dezesseis vezes maior), o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina foi citotóxico as diferentes células de mamíferos testadas e somente após 48 horas (Figura 7).

Além disso, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e tratados com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, mostraram menores índices de infecção de multiplicação de amastigotas do que macrófagos não tratados (Figuras 8, 9 e 10).

O tratamento em macrófagos infectados com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, apresentou carga parasitária semelhante aos macrófagos tratados com anfotericina B. Um importante aspecto demonstrado pela dosagem de citocina foram os níveis de TNF- α detectados; apresentando níveis significativamente mais altos em macrófagos infectados e tratamento com anfotericina B, do que em macrófagos tratados com o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, nessa ultima situação a produção da citocina não foi detectada (Tabela 1). I

Indícios sugerem que, a produção de TNF- α pode ser um componente tóxicos, no local de infecção, provocado por um excesso de inflamação. Por outro lado não observou a produção de IL-12p40, importante citocina no controle da infecção.

Danos ultraestruturais causados em promastigotas de *L. amazonensis* pelo composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina revelaram progressivo formação de vacúolos intracitoplasmáticos, inchaço mitocondrial, desorganização intracelular com formação de estruturas de membranas (“retículos-like”) no citoplasma e dentro de mitocôndrias, alterações no núcleo e na morfologia da membrana flagelar também foram observadas (figura 11).

Contudo, os danos observados são consistentes com alterações ultraestruturais semelhantes causadas pela putrescina análoga 1,4-diamino-2-butenone, que interfere com o metabolismo e síntese das poliaminas (Vannier-Santos et al., 2008). Algumas das alterações observadas como formação das estruturas de membranas e de vacúolos intracelulares, podem sugerir que o composto provoca danos que levam a apoptose, consistente com essa suposição o composto Aziridina-2,3-Dicarboxilato causa alterações ultraestruturais semelhantes às observadas em *Leishmania major* pela indução apoptótica (Schurigt et al., 2010).

Em adição, microscopia de varredura mostrou “ruffles” e formação de buracos na membrana, perda flagelar, arredondamento e perda total da morfologia corporal. Entretanto nas mesmas concentrações utilizadas para o tratamento da *L. amazonensis*, macrófagos J774. G8 foram tratados, mas não mostrando nenhuma alteração ultraestrutural em sua morfologia. Assim, o comprometimento do metabolismo do parasito demonstrado com os ensaios de viabilidade, multiplicação, de infecção e das alterações ultraestruturais, leva a morte do parasito.

Em conclusão, o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina, como muitos outros compostos encontrados na literatura, são ferramentas promissoras contra leishmaniose. Ensaios *in vivo* utilizando o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina sozinho ou em combinação com outras drogas devem ser realizados, para desenvolvimento de um composto que realmente seja de baixo custo e toxicidade.

6. CONCLUSÕES

Diante os resultados do presente estudo, concluimos que o composto *N*-dodecil-1,2-etanodiamina apresenta atividade citotóxica sobre formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* sp., e o tratamento de formas promastigotas provoca alterações ultraestruturais em *L. amazonensis*. Contudo, a mesma citotoxicidade não é observada em diferentes tipos de células de mamíferos, sendo necessário concentrações cerca de 16 vezes maiores para provocar perda de viabilidade. O composto também foi eficiente na diminuição das taxas de infecção e multiplicação de formas amastigotas em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO-CARDOSO S.R., F.H. RODRIGUES, M.A. GOMES, A.G. SILVA, A. ROCHA, A.H. GUIMARAES, I. CANDELORO, S. FAVORETO JR, M.S. FERREIRA, M.A DE SOUZA. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. Korean. J. Parasitol. 45:255-266. 2007.

AL-ABDELY H.M., J.R. GRAYBILL, R. BOCANEGRA, L. NAJVAR, E. MONTALBO, S.L. REGEN, P.C. MELBY. Efficacies of KY62 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(10):2542-2548. 1998.

ALEXANDER J, BROMBACHER F, MCGACHY HA, MCKENZIE AN, WALKER W, CARTER KC. An essential role for IL-13 in maintaining a nonhealing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol*;32:2923–33. 2002.

ALEXANDER J, CARTER KC, AL-FASI N, SATOSKAR A, BROMBACHER F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol.* v.30, p:2935–43. 2000.

ALEXANDER J, SATOSKAR AR, RUSSELL DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*;112:2993–3002. 1999.

ARTIS D, VILLARINO A, SILVERMAN M, HE W, THORNTON EM, MU S, SUMMER S, COVEY TM, HUANG E, YOSHIDA H, KORETZKY G, GOLDSCHMIDT M, WU GD, DE SAUVAGE F, MILLER HR, SARIS CJ, SCOTT P, HUNTER CA. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol.* v.173, p:5626–34. 2004.

BATES P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *Int. J. Parasitol.* v.37; p.1097-1106. 2007.

BERMAN, J. Development of miltefosine for the leishmaniasis. *Minirev Med Chem.* 6:145-151. 2006.

BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, N.; SUDAN, R.; AND SAHA, B. Leishmania Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* V.2010.

BIEDERMANN T, ZIMMERMANN S, HIMMELRICH H, GUMY A, EGETER O, SAKRAUSKI AK, SEEGMULLER I, VOIGT H, LAUNOIS P, LEVINE AD, WAGNER H, HEEG K, LOUIS JA, ROCKEN M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol.* v.2, p:1054–60. 2001.

BOULANGER N., LOWENBERGER C., VOLF P., URSIC R., SIGUTOVA L., SABATIER L., SVOBODOVA M., BEVERLEY S.M., SPATH G., BRUN R., PESSON B. & BULLET P. Characterization of a defensin from the sandfly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* v.72, p:7140-7146. 2004.

CHAPPUIS, F., S. SUNDAR, A. HAILU, H. GHALIB, S. RIJAL, R. W. PEELING, J. ALVAR, AND M. BOELAERT. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5:873–882. 2007.

COSTA C. F, E.S. COIMBRA, F.G. BRAGA, R.C. DOS REIS, A.D DA SILVA, M.V. DE ALMEIDA.. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-Alkyl Diamines. *Biomed. Pharmacother.* 63:40-42. 2009.

DEL OLMO E., M. ALVES, J.L. LOPÉZ, A. INCHAUSTTI, G. YALUFF, A.L DE ARIAS, A.S. FELICIANO. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and aminoalcohols. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 12:659-662. 2002.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* v.27(5), p:305-318. 2004.

DINARELLO CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clin Exp Rheumatol. V.20, p:S1–13. 2002.

Drugs for Neglected Diseases Initiative. 2008. Annual report, 2007–2008. DNDi, Geneva, Switzerland.

GIORDANI, R.B.; AARAUJO, D.P.; DUARTE, M.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T.; DEALMEIDA, M.V. Anti-protozoal activity of diamine derivatives. 2011.

GOMEZ, M.A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M. L.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. Leishmania GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. *Science Signaling*. v2 (90), ra58. 2009.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control. Diagnosis, and treatment, and proposed reserach and developement agenda. The Lancet, Londres, v. 2, p. 494-501, 2002.

HEBY, O., ROBERTS, S.C., ULLMAN, B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. Biochem. Soc. Trans. 31, 415– 419. 2003.

KAMANAKA, M.; YU, P.; YASUI, T. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cellmediated immunity. *Immunity*, vol. 4, no. 3, pp. 275–281, 1996.

KAMHAWI S. Phlebotominae sandflies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. v.22, p:439-445. 2006.

KAMHAWI S. The biological and immunomodulatory properties of sandfly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.*, v.2, p:1765-1773. 2000.

KILLICK-KENDRICK R., LEANEY A.J., READY P.D. & MOLYNEAUX D.H. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. 4. Transmission of *Leishmania mexicana*

amazonensis to hamsters by bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v.1122, p:105-115. 1977.

KUMAR, D.; KULSHRESTHA, A.; SINGH. R.; SALOTRA. P. In vitro susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:835-838.

LABADIE G.R., S.R CHOI AND M.A. AVERY. Diamine derivatives with antiparasitic activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*14:615-9. 2004.

LANGRISH CL, MCKENZIE BS, WILSON NJ, DE WAAL MALEFYT R, KASTELEIN RA, CUA DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* v.202, p:96–105. 2004.

MAGILL, A.J. Epidemiology of leishmaniasis. *Dermatol. Clin.*, v. 13, p. 5055-5023, 1995.

MANANDHAR K., T.P. YADAV, V.K. PRAJAPATI, S. KUMAR, M. RAI, A. DUBE, O.N. SRIVASTAVA AND S. SUNDAR.. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 376–380. 2008

MARTINEZ-ROJANO H, J. MANCILLA-RAMIREZ , L. QUIÑONEZ-DIAZ, N. GALINDO-SEVILLA. Activity of hydroxyurea against *leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52: 3642–3647. 2008.

MOHRS M, HOLSCHER C, BROMBACHER F. Interleukin-4 receptor alphas deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* v.68, p:1773–80. 2000.

MULLER R.H.,C. JACOBS AND O. KAYSER. Manosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47: 3–19. 2001.

MULLER S, COOMBS GH, WALKER RD. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends Parasitol* 2001;17:242–9.

OLLIARO, P. and SUNDAR, S. Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 2009,14:88-92.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26:1709–1724.2008.

PANUNTO-CASTELO A., M.A. SOUZA, M.C, ROQUE-BARREIRA, J.S. SILVA. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania* major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology*. 11:1035-1042. 2001.

PASSERO L.F., M.D. LAURENTI, T.Y. TOMOKANE, C.E. CORBETT, M.H. TOYAMA. 2008. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol. Res.* 102:1025-1033

PRIVÉ C. AND DESCOTEAUX, A. “*Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naïve macrophages,” *European Journal of Immunology*, vol. 30, no. 8, pp. 2235–2244, 2000.

RAMALHO-ORTIGAO J.M., KAMHAWI S., ROWTON E.D., RIBEIRO J.M.C. & VALENZUELA J.G. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sandfly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect. BiochemMol. Biol.* v.33, p:163-171. 2003.

REGUERA, R. M.; TEKWANI, B. L.;FOUCE, R. B. Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v.140, p:151–164. 2005.

REINER N. E. “Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection,” *Immunology Today*, vol. 15, no. 8, pp. 374–381, 1994.

REINER SL, LOCKSLEY RM. The Regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol*.v.13, p:151–77. 1995.

RICHARD, J. V AND WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology*. v.14, p:447–455. 2010.

RIJAL, S., F. CHAPPUIS, R. SINGH, P. A. BOVIER, P. ACHARYA, B. M. KARKI, M. L. DAS, P. DESJEUX, L. LOUTAN, AND S. KOIRALA. Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97:350–354. 2003.

ROGERS M.E., ILG T., NIKOLAEV A.V., FERGUSON M.A. & BATES P.A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sandflies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. v..430, p:463-467. 2004.

SACKS D, ANDERSON C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev* 2004;201:225–38.

SACKS D.L., MODI G., ROWTON E., SPATH G., EPSTEIN L., TURCO S.J. & BEVERLEY S.M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*- sandfly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, v.97, p:406-411. 2000.

SATOSKAR, A.; BLUETHMANN. H.; ALEXANDER J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*. v.63, p:4894–9. 1995.

SCHLEIN Y. *Leishmania* and sandflies – Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol. Today*. v.9, p:255-258. 1993.

SCHURIGT, U.; SCHAD, C.; GLOWA, C.; BAUM, U.; THOMALE, K.; SCHNITZER, J.K.; SCHULTHEIS, M.; SCHASCHKE, N.; SCHIRMEISTER, T. AND MOL, H. Aziridine-2,3-Dicarboxylate-Based Cysteine Cathepsin Inhibitors Induce Cell Death in *Leishmania major* Associated with Accumulation of Debris in Autophagy-Related Lysosome-Like Vacuoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 5028–5041. 2010.

SEN G., S. MUKHOPADHYAY, M. RAY, T. BISWAS. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. J. Antimicrob. Chemother. 61: 1066–1075. 2008.

STAGER S., ALEXANDER J., CARTER K.C., BROMBACHER .F., KAYE P.M. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. Infect Immun. v.71, p:4804–7. 2003.

STEVENS J.R. and NOYES H.A., Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. Adv Parasitol. v.48, p:1–56. 2001.

STOUT R. D. AND SUTTLES, J. “The many roles of CD40 in cellmediated inflammatory responses,” *Immunology Today*, vol. 17, no. 10, pp. 487–492, 1996.

SU, B .and KARIN, M “Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 8, no. 3, pp. 402–411, 1996.

SUNDAR S, RAI M, CHAKRAVARTY J, AGARWAL D, AGRAWAL N, VAILLANT M, OLLIARO P, MURRAY H: New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. Clin Infect Dis 2008, 47:1000-1006.

TAVARES J., A. OUAISSI , P.K.T. LIN, A. TOMÁS , A.C DA SILVA. Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. Int. J. Parasitol.35:637-646. 2005.

TEMPONE A.G., N.N. TANIWAKI AND J.Q. REIMÃO. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol. Res.* 105(2):499-505. 2009.

TITUS R.G. and RIBEIRO J.M. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science.* v. 239, p:1306-1308. 1988.

Tropical disease research (TDR), progress 2003-(2004). Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

VANNIER-SANTOS M. A.; MENEZES, D.; OLIVEIRA, M. F.; DE MELLO, F.G. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology.* v.154, p:3104–3111. 2008.

VERMEERSCH, M.; da LUZ, R.; TOTE, K.; TIMMERMANS, J.; COS, P.; MAES L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigota and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother.* v.53, p:3855-3859. 2009.

WHO (2000). Fact Sheet No. 116, Rev. May (2000).