



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

Efeito do imidocarb e do levamisol sobre a infecção experimental de camundongos

BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Flávio Hercos Rodrigues

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Efeito do imidocarb e do levamisol sobre a infecção experimental de camundongos
BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte das exigências para obtenção do título
de Mestre

Flávio Hercos Rodrigues

Uberlândia – MG
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Efeito do imidocarb e do levamisol sobre a infecção experimental de camundongos
BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte das exigências para obtenção do título
de Mestre

Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Souza
Orientadora

Uberlândia – MG
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Efeito do imidocarb e do levamisol sobre a infecção experimental de camundongos
BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como
parte das exigências para obtenção do título
de Mestre

Flávio Hercos Rodrigues
Mestrando

Profª Drª Maria Aparecida de Souza
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Co-orientador

Uberlândia – MG
2005

“Dois importantes fatos nesta vida saltam aos olhos; primeiro que cada um de nós sofre inevitavelmente derrotas temporárias, de formas diferentes, nas ocasiões mais diversas. Segundo que cada adversidade traz consigo a semente de benefício equivalente. Ainda não encontrei um homem algum bem sucedido na vida que não houvesse antes sofrido derrotas temporárias. Toda vez que um homem supera os reveses torna-se mental e espiritualmente mais forte... É assim que aprendemos o que devemos, a grande lição da adversidade.”

(Andrew Carnegie e Napoleon Hill)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza por ter aceitado orientar-me, pelas oportunidades, pelos conhecimentos e experiência adquiridos e por sua inestimável amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti pela colaboração na análise das imagens e sugestões.

A Dr^a. Janethe D. O. Penna por receber-me em seu laboratório.

Aos meus pais e a minha família pelo apoio incondicional.

À amiga Sandra Regina Afonso Cardoso pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

A todos os amigos do BIOMOL, especialmente a Carla, Cristiano, Eneida, Márcio, Martha, Miguel e Sandra pelos momentos compartilhados e pela amizade. E dos outros laboratórios, em especial: Sabrina Vaz, Áurea Welter e Dr^a Eloísa A. V. Ferro.

Aos funcionários Neto e Lucileide pelos conselhos e atenção.

A CAPES por propiciar financeiramente a execução desse trabalho.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Márcia Nogueira Hercos Rodrigues, que sempre me incentivou e me apoiou nos momentos mais adversos.

Sumário

ABREVIATURAS.....	1
1.RESUMO.....	2
2.ABSTRACT.....	3
3.INTRODUÇÃO.....	4
3.1. CICLO BIOLÓGICO E VIRULÊNCIA.....	6
3.2. PATOGENIA.....	9
3.3. TRATAMENTO.....	13
4.OBJETIVOS.....	20
5.MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1.PARASITOS E ANTÍGENOS.....	23
5.2.INFEÇÃO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO.....	24
5.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	25
5.4. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA.....	26
5.5.MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	27
5.6.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
6.RESULTADOS.....	28
6.1.EFEITO DO IMIDOCARB E LEVAMISOL NO CURSO DA INFECÇÃO.....	29
6.2. NÍVEIS DE IGG ANTI- <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i>	31
6.3.CARGA PARASITÁRIA.....	33
6.4.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	35
6.5.ÁREA DE VACÚOLO DOS MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	37
6.6.CONTAGEM DE MEGACARIÓCITOS NO BAÇO.....	39
6.7.MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	41
7.DISSCUSSÃO.....	45
8.CONCLUSÕES.....	51
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ABREVIATURAS

CR1	Receptor de componente do sistema complemento
CR3	Receptor de componente iC3b do sistema complemento
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GI-IMD	Grupo I - Imidocarb
GII-IMD+LVS	Grupo II – Imidocarb e Levamisol
GIII-LVS	Grupo III - Levamisol
GIV-controle	Grupo IV - Controle
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
GP63	Glicoproteína de 63 kDa de <i>Leishmania</i>
HBSS	Salina balanceada de Hanks
IE	Índice ELISA
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
LPG	Lipofosfoglicana
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
M2	Macrófagos que induz resposta imune tipo 2
Mac1	Integrina de Leucócitos CD11b:CD18
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MSP	“Major surface protein”
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Salina tamponada com Fosfato
PBST	Salina tamponada com Fosfato Tween 20
PBSTM	Salina tamponada com Fosfato Tween 20 + Leite Desnatado
pH	Potencial hidrogeniônico
RIN	Reativos intermediários de nitrogênio
RIO	Reativos intermediários de oxigênio
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
VP	Vacúolo parasitóforo

1. Resumo

Os efeitos adversos provenientes do uso dos compostos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos. Neste sentido, o presente estudo avaliou os efeitos do imidocarb e do levamisol no tratamento da infecção experimental em camundongos BALB/c por *Leishmania (L.) amazonensis*. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados com 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) na fase estacionária, e subseqüentemente, tratados com imidocarb (GI-IMD), com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS), apenas levamisol (GIII-LVS) e sem tratamento (GIV-controle). A evolução da lesão foi monitorada semanalmente por 10 semanas, após o início do tratamento, no 51º dia pós-infecção. O imidocarb e levamisol foram administrados por via subcutânea nas doses de 34 e 12 mg / kg, respectivamente. No 121º dia após a infecção, foram avaliados os níveis séricos de anticorpos específicos nos camundongos de todos os grupos, bem como, as alterações histopatológicas e morfométricas no coxim plantar, linfonodo e baço destes animais. Os dados obtidos neste estudo demonstraram que o os camundongos tratados com o imidocarb GI-IMD apresentaram menores níveis de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* (34,45%), menor área de vacúolo nos macrófagos infectados (3,75%), menor número de megacariócitos no baço (63,19%) e menor carga parasitária no local da lesão (30,2%) em comparação ao grupo GIV-controle. Deste modo, os achados do presente trabalho validam a utilização do imidocarb como droga em potencial no tratamento da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chaves: leishmaniose, imidocarb, levamisol, *Leishmania (L.) amazonensis*

2. Abstract

The adverse effects proceeding of use of current available drugs for the treatment of leishmaniasis have motivated the search for new therapeutical agents. The aim of this work was to evaluate the effect of imidocarb and levamisole in the treatment of the BALB/c mice experimental infected by *L. (L.) amazonensis*. BALB/c mice were infected with 10^6 promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) on stationary phase and further treated with imidocarb (GI- IMD), imidocarb plus levamisole (GII-IMD+LVS), only levamisole (GIII-LVS) and without treatment (GIV-control). The evolution of lesions was monitored weekly for 10 weeks after the beginning of the treatment, on 51^o day post-infection, with imidocarb and levamisole, subcutaneously dosages of 34 and 12 mg/kg respectively. On 121^o day post-infection the serum levels of specific antibodies of mice of all groups were evaluated as well, the histopathological and morphometric alterations in the footpad, lymph nodes and spleen of these animals. The data obtained in this study demonstrated that mice treated with imidocarb GI-IMD showed lower levels of IgG anti-*L. (L.) amazonensis* (34,45%), smaller area of vacuole in the macrophages (3,75%), lower number of megakaryocytes on spleen (63,19%) and lower parasitic burden on footpad (30,2%) vs control group (GIV-control). Thus the findings in the present work suggest the use of imidocarb as a drug in the treatment of tegumentary leishmaniasis.

Key words: leishmaniasis, imidocarb, levamisole, *Leishmania (L.) amazonensis*.

Introdução

3. Introdução

As leishmanioses são enfermidades infecto-parasitárias, de caráter antroponozoonótico, não contagiosas, de transmissão vetorial, causadas por diferentes espécies morfológicamente semelhantes de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Estes parasitos pertencem à ordem Kinetoplastida, cuja característica principal é a presença da organela cinetoplasto, a qual situa-se junto a base do flagelo contendo seqüências repetidas de DNA (kDNA), sob a forma de maxicírculos e minicírculos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

No mundo as leishmanioses atingem aproximadamente 12 milhões de pessoas, em 88 países, estimando-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção (WHO, 1998). Esta doença é atualmente considerada como uma antroponozoonose emergente nos Estados Unidos da América (ENSERINK, 2000; McHUGH et al., 2003; ROSYPAL et al., 2003), com mais de 500 soldados da força de paz confirmados parasitologicamente (CDC, 2004). No Brasil, assim como em outros países das Américas, as leishmanioses constituem importante problema de saúde pública devido a sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e baixa efetividade das medidas de controle.

Dependendo da espécie envolvida, da interação com a resposta imune do hospedeiro vertebrado, da patogenicidade do parasito, da sua capacidade de invasão e tropismo, a doença pode se apresentar sob diferentes formas clínicas. A leishmaniose tegumentar americana (LTA), uma infecção dermatológica importante, não só pela freqüência e dificuldades terapêuticas, como pela capacidade de desenvolver lesões que conduzem a quadros clínicos

desfigurantes, com repercussão psicossocial (GONTIJO; CRAVALHO, 2003). A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma crônica e mais grave da doença, potencialmente fatal para o homem, quando não se institui o tratamento adequado (DESCOTEAUX; TURCO, 2002; KAFETZIS et al., 2005). A infecção primária, quando curada, normalmente leva a proteção contra futuras infecções, sugerindo que seria possível criar uma vacina contra *Leishmania*, contudo, na prática não existe vacina eficaz contra este parasito (OULLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU et al., 2004). Assim, o controle da doença depende primariamente da utilização de quimioterápicos, os quais estão disponíveis em número limitado e apresentam várias restrições.

A LTA é a forma mais freqüentemente diagnosticada. No Brasil, foi estimado que cerca de 10,45 a 22,94 por 100.000 habitantes nos períodos 1985 a 2000 apresentaram a forma tegumentar de leishmaniose. Já a leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, é menos freqüente. No entanto, foram notificados 1.124 casos em 1983, este número aumentou para 2.572 em 1997 (Brasil, 2003). Observou-se também um coeficiente de mortalidade de 0,04/100.000 habitantes em 1980, subindo para 0,08/100.000 habitantes em 1996, demonstrando o aumento desta forma da doença (VIEIRA et al., 1998).

3.1. Ciclo biológico e virulência

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico do tipo digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, os quais

são os responsáveis pela transmissão do parasito durante o repasto sanguíneo da fêmea. Em seu ciclo (Fig 1), duas formas são observadas; a promastigota, encontrada no intestino médio dos hospedeiros invertebrados, dípteros da subfamília *Phebotominae*, gêneros *Phebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo; e a forma amastigota, encontrada em vacúolos parasitóforos no interior de macrófagos, e raramente em outros tipos celulares, dos organismos vertebrados, onde se multiplicam por divisão binária (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).

Durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos, além das formas promastigotas outros componentes presentes na saliva do vetor são inoculados, como a maxadilina, que favorece ou potencializa a patogenicidade do parasito. O grau de patogenicidade, tradicionalmente definido como virulência, manifesta-se como o espectro de sintomas clínicos proporcionados pela infecção (CHANG; CHAUDHURI; FONG, 1990).

Para a manutenção do seu ciclo intracelular, o parasito desenvolveu várias estratégias de sobrevivência dentro da célula do hospedeiro. A forma amastigota é especialmente adaptado ao ambiente intracelular do vacúolo parasitóforo (VP), estrutura que se assemelha aos lisossomos secundários, com pH 4,5 a 5. Essa capacidade bem sucedida de sobreviver em VP deve-se a sua adaptação ao compartimento lisossomal, portanto demonstrando que estas formas são organismos acidofílicos. Esta adaptação provavelmente está ligada à presença de bombas de prótons envolvidas na captura e transporte de metabólitos, estágio específico (ANTOINE et al., 1998). Outros mecanismos parecem atuar nos VPs, provavelmente evitando a resposta imunológica do hospedeiro, como por

exemplo, reduzindo a expressão de moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, na superfície de macrófagos infectados (ANTOINE et al., 1998).

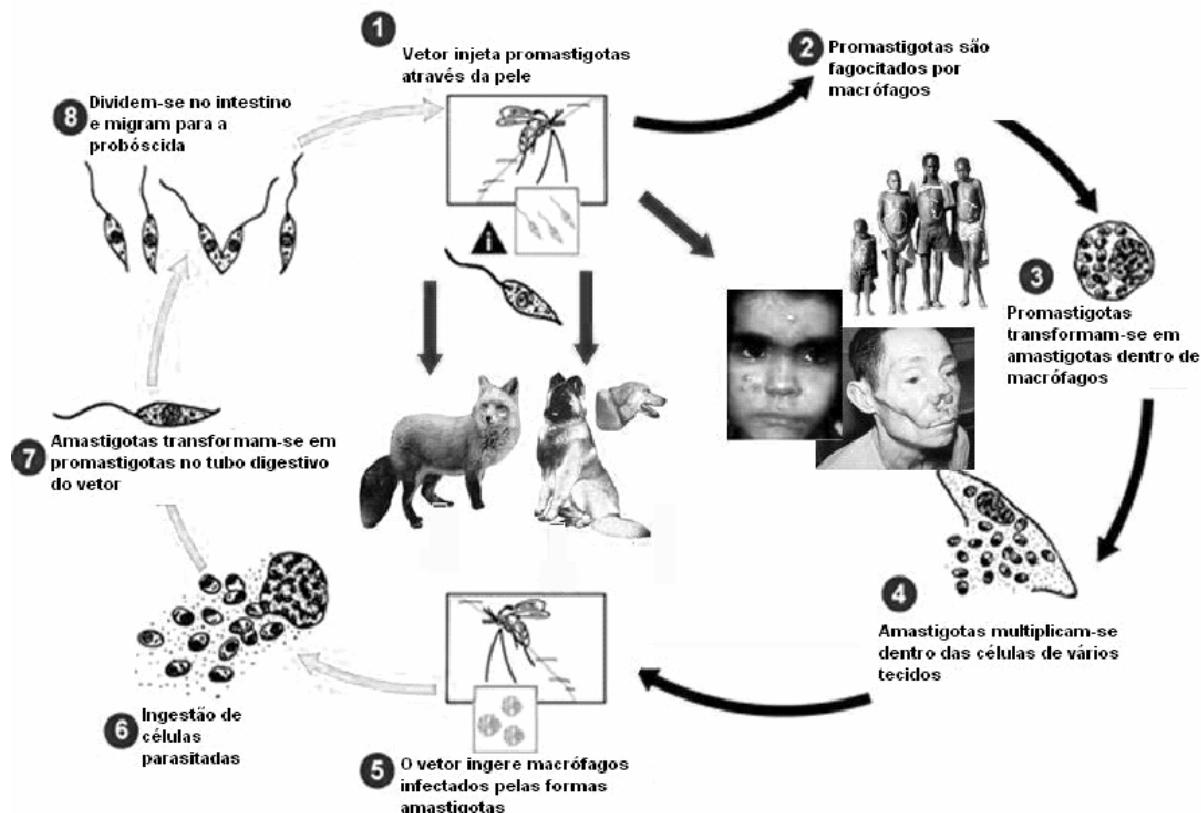


Figura - 1 Ciclo biológico da *Leishmania sp.* (adaptado CDC, 2003)

Embora a virulência da *Leishmania* possa ser modulada por fatores ambientais e genéticos do hospedeiro vertebrado e do inseto vetor, determinantes moleculares do parasito são elementos importantes neste processo (RIBEIRO, 1988; BLACKWELL, 1996; TITUS). Dentre as moléculas envolvidas na patogenia das leishmanioses estão: a lipofosfoglicana (LPG) e a glicoproteína gp63 ou

“major surface protease” (MSP), as quais apresentam grande quantidade de resíduos de manose em sua estrutura (DESCOTEAUX; TURCO, 2002; LODGE; DESCOTEAUX, 2005). A MSP é uma zinco-metaloproteinase, que é expressa na superfície do parasito, de peso molecular de aproximadamente 63 kDa, encontrada em todas as espécies do gênero *Leishmania* conhecidas até hoje, tanto na forma promastigota como na amastigota. Esta molécula tem como substrato uma ampla variedade de proteínas incluindo caseína, albumina hemoglobina e fibrinogênio (BOUVIER et al., 1989; BOUVIER et al., 1990). Além da atividade proteolítica, a GP63 parece atuar ainda como opsonina para o componente C3 do complemento do hospedeiro vertebrado, favorecendo assim, o reconhecimento, a adesão e fagocitose, via receptores CR1 e CR3 (DESCOTEAUX; TURCO, 2002). Além disso, esta metaloproteinase também tem sido implicada na ligação a outros receptores, tais como Mac-1 (van STRIJP et al., 1993) e fibronectina (BRITTINGHAM et al., 1999).

3.2. Patogenia

A inoculação do parasito leva a alterações histopatológicas, que surgem inicialmente com a internalização dos parasitos, por fagócitos. Com o avanço da infecção os parasitos multiplicam-se dentro de vacúolos, que em seguida rompem-se, liberando as formas amastigotas, que irão parasitar novas células. Esse processo promove hiperplasia histiocitária, na qual, o processo infeccioso recruta macrófagos para o local, com formação de edema e infiltrados celulares, devido ao aumento da permeabilidade vascular, via mediadores inflamatórios e migração,

principalmente, de linfócitos e plasmócitos. Além disso, outra alteração muito encontrada é a hiperqueratose, recobrando a região inflamada (REY, 2001).

Clinicamente observa-se a formação de pequeno nódulo ou lesão de aspecto impetiginoso, que pode seguir diferentes cursos. As lesões podem ser do tipo não-ulcerada ou ulcerada, este tipo de lesão geralmente apresenta-se com as bordas salientes, limites internos bem definidos e aspecto granuloso. No entanto, nesta fase os parasitos são pouco abundantes (REY, 2001). Nos processos não ulcerativos ocorrem espessamento da epiderme, hiperacantose e proliferação de papilas dérmicas inflamadas, na qual ocorre crescimento verrucoso ou papilomatoso da pele, na região afetada (REY, 2001).

O parasitismo leva a diferentes manifestações clínicas, podendo acometer pele (leishmaniose cutânea), pele e mucosa (leishmaniose mucocutânea) ou órgãos internos (leishmaniose visceral). A leishmaniose cutânea caracteriza-se por lesões que podem ser do tipo focal, disseminada ou difusa. As lesões apresentam-se com aspecto de úlcera, podendo ter borda elevada e fundo granuloso com ou sem exsudato, em geral, não apresentam sensibilidade (REY, 2001). A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se por lesões típicas que acometem geralmente pele e mucosa, podendo apresentar metástase distante da lesão inicial. Essas lesões geralmente apresentam poucos parasitos (REY, 2001). A leishmaniose visceral caracteriza-se por acometimento de órgãos internos, especialmente o baço e fígado; onde as alterações predominantes são formações granulomatosas (REY, 2001). O quadro 1 denota a atual classificação das espécies, gêneros, subgêneros e complexos das *Leishmania*. As diferentes manifestações clínicas estão associadas às diferentes espécies de *Leishmania*.

Contudo, nem sempre uma determinada forma de lesão tem como agente etiológico a espécie mais comumente causadora desta. Além disso, as interações das células infectadas com outros elementos do organismo do hospedeiro estão fortemente associados às manifestações clínicas (CHANG; McGWIRE, 2002). Antígenos produzidos por células infectadas interagem com o sistema imunológico do hospedeiro, levando a modulação negativa, a qual pode ser responsável pelas manifestações imunopatológicas nas leishmanioses (CHANG; McGWIRE, 2002).

Quadro 1. Classificação das espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.

Espécie	Doença
Subgênero <i>Leishmania</i>	
Complexo <i>L. donovani</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	visceral
Complexo <i>L. aethiopica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) aethiopica</i>	cutânea difusa
<i>Leishmania (Leishmania) garnhami</i>	cutânea
Complexo <i>L. major</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	cutânea
Complexo <i>L. tropica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	cutânea/visceral
Complexo <i>L. mexicana</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	cutânea/mucosa/visceral
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) pifanoi</i>	cutânea
Subgênero <i>Viannia</i>	
Complexo <i>L. braziliensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	cutânea/mucosa
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) colombiense</i>	cutânea/mucosa
Complexo <i>L. guyanensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	cutânea
Complexo não especificado	
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	cutânea

Adaptado de Brasil, 2000; Gontijo et al., 2002; Lainson; Shaw, 1987.

3.3. Tratamento

O antimonial trivalente, tartárico emético, foi o primeiro agente farmacológico utilizado no tratamento da leishmaniose visceral, em 1915 na Itália e Índia. Entre 1920 e 1930 os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na terapêutica da leishmaniose visceral, o que fez decair o período de tratamento de 3-4 meses para algumas semanas (MURRAY, 2000). Posteriormente na década de 1940 surgiram novas formulações dos antimoniais pentavalentes, tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, os quais continuam em uso até os dias atuais (MURRAY, 2000; SOTO et al., 2005). Ainda hoje não existe terapia ideal para as leishmanioses, contudo esta classe de fármacos apresenta-se como a melhor opção terapêutica disponível (HERWALDT, 1999). Apesar de sua comprovada eficácia, essas drogas apresentam problemas como efeitos colaterais, longo período de terapia, administração parenteral e efetividade diminuída em alguns casos (DUBE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005). A ineficácia deste tratamento é observada particularmente na co-infecção HIV-*Leishmania*, onde a eficácia terapêutica diminui durante as recidivas da leishmaniose (FAURATY-GAMBARELLI et al., 1997; SINHA; PANDEY; BHATTACHARYA, 2005). A diminuição da sensibilidade do parasito a estas drogas também foi observada em cães infectados por *L. (L.) infantum* (GRAMICIA; GRADONI; ORSINI, 1992). Embora os antimoniais pentavalentes sejam freqüentemente usados como primeira linha de tratamento para as leishmanioses, apresentam vários efeitos adversos (IRAJI; SADEGHINIA, 2005).

A pentamidina, uma diamidina aromática, foi inicialmente utilizada no tratamento de infecções por *Pneumocystis carinii* e, demonstrou ser efetiva na terapêutica da leishmaniose visceral sendo considerada como droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses e indicada para os casos não responsivos aos antimoniais (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Acredita-se que esse composto atue no DNA do cinetoplasto inibindo suas funções (DONKOR et al., 2001). Com sua utilização na terapêutica da leishmaniose visceral no final da década de 1970, altas taxas de cura (acima de 98%) foram obtidas (JHA, 1983). Com o desenvolvimento de resistência a este fármaco, pelos parasitos, na década de 1980, os índices de cura declinaram (JHA; SINGH; JHA, 1991; THAKUR; KUMAR; PANDEY, 1991; THAKUR, 1999; ANDERSEN et al., 2005). Contudo, em alguns países a pentamidina continua sendo utilizada como único fármaco ou associada a outras drogas (BECKER et al., 1999). O uso da pentamidina freqüentemente resulta em efeitos indesejáveis, como: mialgias, desconforto no local da injeção e hipotensão. Assim, devido a sua maior toxicidade, quando comparada aos antimoniais e ao surgimento de resistência, esta droga tem sido pouco utilizada na leishmaniose visceral (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Nas últimas décadas outras drogas têm sido introduzidas no tratamento das leishmanioses tais como: anfotericina B, paramomicina, alquilfosfocolinas, dentre outras (CROFT; COOMBS, 2003). A anfotericina B, um antibiótico antifúngico, é utilizada freqüentemente em infecções fúngicas sistêmicas, que apresenta atividade contra parasitos do gênero *Leishmania* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Este fármaco tem apresentado altas taxas de cura em pacientes infectados por *L. donovani*, particularmente, quando administradas em criança e gestante e nos

casos de resistência do parasito aos antimoniais (THAKUR et al., 1993; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; KAFETZIS et al., 2005). Acredita-se que a anfotericina B atue ligando-se ao ergosterol da membrana celular de fungos e *Leishmania*, porém, não apresenta afinidade pelo colesterol, da membrana plasmática de mamíferos (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). No entanto, requer longo período de tratamento, apresenta alta toxicidade, necessitando de monitoramento hospitalar, tornando-a uma terapia de alto custo (KAFETZIS et al., 2005). Atualmente, a anfotericina B e suas outras formulações, especialmente a anfotericina B lipossomal, são consideradas altamente ativas contra a LV (KAFETZIS et al., 2005).

O aluporinol, um análogo da hipoxantina, inibe o catabolismo das purinas em mamíferos e o anabolismo em patógenos de gênero *Leishmania*. Este fármaco apresenta atividade citotóxica seletiva aos parasitos, devido a incapacidade destes em sintetizar purinas, necessitando, portanto, de purinas pré-formadas do hospedeiro para a sua sobrevivência (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Embora o alopurinol seja pouco eficaz como terapia isolada no tratamento da leishmaniose cutânea (BERMAN, 1997), o aumento da eficácia foi observado, quando utilizado em combinação com outras drogas (VELEZ et al., 1997; KOUTINAS et al., 2001, PASA et al., 2005;).

A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é produzido pelo *Streptomyces rimosus*, e utilizado em infecções bacterianas, demonstrou capacidade de inibir o crescimento de diversos microrganismos, inclusive protozoários do gênero *Leishmania* (IRAJI; SADEGHINIA, 2005). Esta tem sido usada no tratamento da leishmaniose visceral em humanos, principalmente na África e Europa (CHUNGE, et al., 1990; SCOTT et al., 1992), e a combinação

paramomicina e estibogluconato de sódio elevou a taxa de cura acima de 82% (BERMAN, 1997). A atividade da formulação hidrofílica de paramomicina foi avaliada no tratamento tópico de infecções por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c e demonstrou ser efetiva na cura da lesão, quando comparada aos antimoniais (GONÇALVES et al., 2005).

Os azóis, cetoconazol e o itraconazol, outra classe de antifúngicos têm sido avaliados quanto sua atividade leishmanicida, e têm demonstrado serem efetivos no tratamento das leishmanioses cutâneas (BAHAMDAN et al., 1997; ALRAJHI et al., 2002).

As alquilfosfocolinas, que foram inicialmente desenvolvidas para se utilizarem nos tratamentos de neoplasias, estão sendo avaliadas na terapêutica das leishmanioses e administradas por via oral (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996; GUPTA; RAMESH; SRIVASTAVA, 2005). Esse grupo de fármacos parece atuar sobre proteína quinase C, que também está presente na membrana celular dos parasitos do gênero *Leishmania* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Outros estudos realizados *in vitro* com cepas de *L. (L.) donovani* também apresentaram resultados promissores, quanto sua utilização na terapêutica da leishmaniose visceral (SINGH, 1996; GUPTA; RAMESH; SRIVASTAVA, 2005). Contudo, apresentou efeito teratogênico, e produziu distúrbios gastrintestinais, toxicidade renal e eventual desenvolvimento de resistência, por parte do parasito (SUNDAR, 2001; SUNDAR et al., 2002; SEIFERT et al., 2003;).

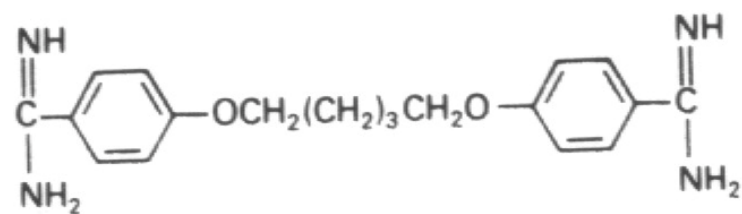
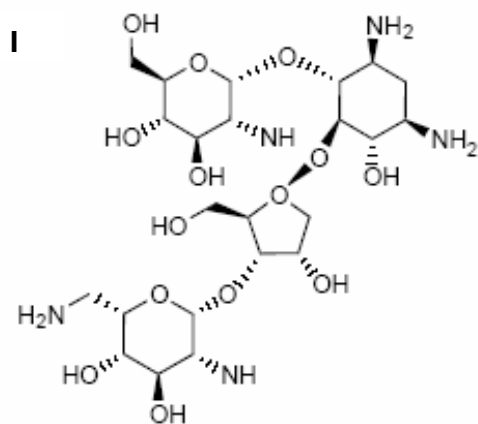
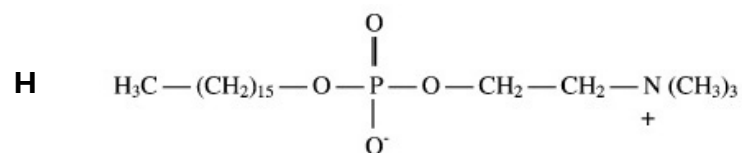
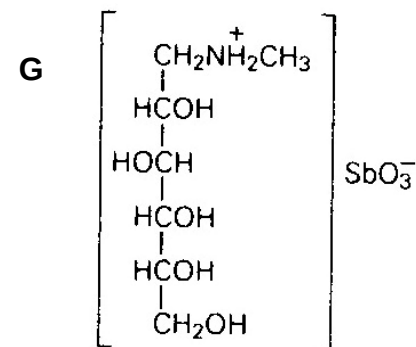
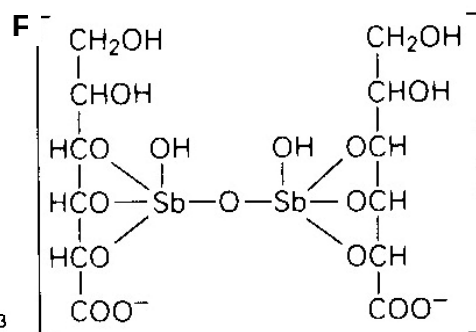
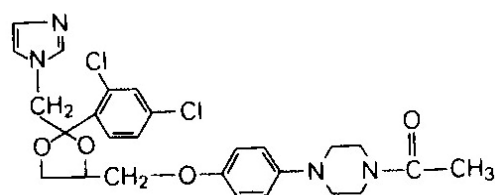
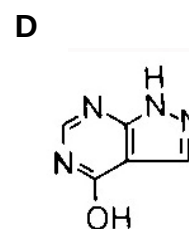
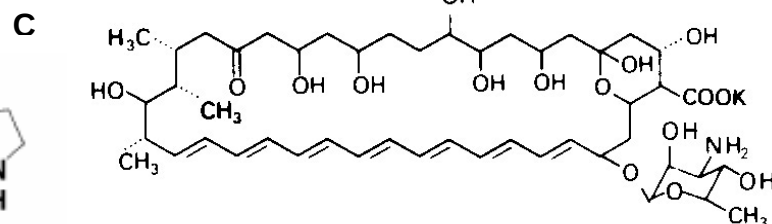
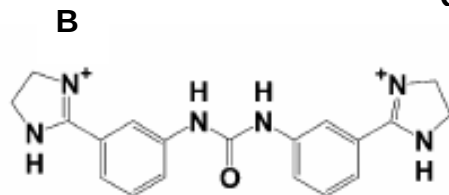
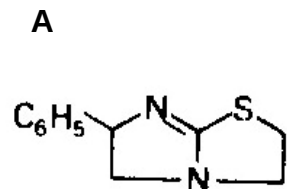
Além das diferentes drogas disponíveis para terapêutica das leishmanioses, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de se obter medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente. Deste modo, a utilização de

citocinas como o interferon gama (IFN- γ) recombinante em associação com os antimoniais aumentou a taxa de eliminação do parasito (BADARÓ, et al., 1994), porém como monoterapia os resultados mostraram-se pouco efetivos (MURRAY, 1995; BERMAN, 1997; SUNDAR). O fator estimulador de colônia granulócitos monócitos (GM-CSF), outra citocina, avaliada como agente terapêutico em infecções experimentais com *L. (L.) donovani* promoveu melhora no tecido parasitado (MURRAY et al., 1995). Esta citocina em associação com antimoniais foi capaz de reverter o quadro de leucopenia, reduzindo a susceptibilidade a infecções secundárias (BADARÓ et al, 1994).

Embora haja várias drogas atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses, nenhuma é efetiva na erradicação da doença, seja por limitações do próprio medicamento, seja devido ao custo, toxicidade ou mesmo pela resistência dos parasitos. Sendo assim, vários pesquisadores têm buscado desenvolver novos compostos que tenham ação sobre o parasito ou potencialize o perfil de resposta imune efetora do hospedeiro, já que a infecção por *Leishmania* suprime a sinalização entre linfócitos T e macrófagos (CROFT; COOMBS, 2003). Além disso, acredita-se que a cura das leishmanioses pela quimioterapia envolva uma resposta imunológica protetora, na qual macrófagos sejam induzidos a produzirem reativos intermediários de nitrogênio (RIN) e de oxigênio (RIO) e, seja efetiva nos mecanismos de sinalização de células CD4+. Para que, desse modo, promova a síntese de citocinas do perfil Th1, e conseqüentemente a eliminação das formas amastigotas do interior das células infectadas (MURRAY et al., 1989; AREVALO et al., 2001). Neste contexto, o presente trabalho avaliou efeito do imidocarb, um derivado da carbanilida que tradicionalmente é utilizado em

medicina veterinária, no tratamento de infecções por *Ehrlichia* sp, *Anaplasma* sp e *Babesia* sp. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (KATAYAMA et al., 2003). E do levamisol um fármaco comumente utilizado como anti-helmíntico, que tem apresentado propriedades imunoestimulantes, propiciando a diferenciação de células T e favorecendo o aumento da hipersensibilidade do tipo tardio (NAYLOR; HADDEN, 2003).

Figura 2. Estrutura química das drogas. (A) Levamisol; **(B)** Imidocarb; **(C)** Anfotericina B; **(D)** Alopurinol; **(E)** Estibogluconato de sódio; **(F)** Antimoniato de meglumine; **(G)** Cetoconazol; **(H)** Hexadecilfosfocolina; **(I)** Paramomicina; **(J)** Pentamidina (adaptado, BALAÑA-FOUCE, et al., 1998; CROFT; COOMBS, 2003).



J

Objetivos

4.Objetivos

1 - Avaliar o efeito do imidocarb e do levamisol no desenvolvimento das lesões no coxim plantar de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis*.

2 – Determinar, por ELISA, os níveis de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* em amostra de soro de camundongos BALB/c experimentalmente infectados e tratados com imidicarb e levamisol.

3 - Avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas em fragmentos do baço, linfonodo poplíteo e coxim plantar, dos animais infectados experimentalmente por *L. (L.) amazonensis* e tratados com imidocarb e levamisol, por microscopia de luz.

4 - Investigar alterações ultraestruturais das células presentes nos fragmentos da lesão do coxim plantar dos camundongos infectados experimentalmente por *L. (L.) amazonensis* e tratados com imidocarb e levamisol, por microscopia eletrônica.

Materiais e Métodos

5. Materiais e métodos

5.1. Parasitos e antígenos

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, UK), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil), 1% de gentamicina e 1% de L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA), a 25°C, até atingirem a fase estacionária. Os parasitos foram utilizados na infecção experimental dos animais ou na obtenção de antígeno. Para tanto 10⁹ parasitos foram lavados por centrifugação em salina balanceada de Hanks (HBSS), ressuspensos em 1ml de salina tamponada com Tris (TBS) a 0,02M, pH 7,2 contendo 1,6 mM de fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF), e mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, foram submetidos a 5 ciclos de congelamento (N₂ líquido) e descongelamento (banho-maria, 37°C). O lisado foi centrifugado a 20.000 x *g* por 1 hora a 4°C. O sobrenadante colhido, filtrado em membrana de 0,22 µm, teve a concentração protéica determinada (LOWRY et al., 1951). O antígeno assim obtido foi estocado a -20°C até o momento do uso.

5.2. Infecção experimental e tratamento

Camundongos BALB/c machos, com idade de 8 a 10 semanas foram distribuídos em 4 grupos de 5 animais cada, os quais foram infectados com 10^6 promastigotas viáveis na fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), por via subcutânea, no coxim plantar esquerdo (50 μ l/animal). No grupo I, os camundongos receberam tratamentos apenas com imidocarb (GI-IMD). Os animais do grupo II foram tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS). No grupo III, os camundongos receberam apenas levamisol (GIII-LVS). Os animais do grupo IV não receberam tratamento (GIV-controle). O imidocarb e o levamisol foram administrados por via subcutânea, nas doses de 34 e 12 mg / kg de peso, respectivamente, calculados por extrapolação alométrica. Os tratamentos com imidocarb foram realizados com dose diária do 51° ao 53° dia e repetidos do 65° ao 69° dia pós-infecção para os animais dos grupos I e II. O levamisol foi administrado uma vez ao dia do 51° ao 53° dia e repetidos 3 vezes por semana, do 58° ao 114° dia pós-infecção. A evolução da lesão foi monitorada semanalmente pela mensuração da pata infectada e da contralateral não infectada com auxílio de paquímetro e expressa como a diferença entre as duas medidas.

5.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Microplacas (Montegrotto Terme, Padova, Italy), de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/ml (50µl/poço) de antígeno anteriormente preparado de *L. (L.) amazonensis*, em tampão carbonato /bicarbonato 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida e, em seguida lavadas com salina tamponada com fosfatos (PBS a 0,15M, pH 7,2) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). As amostras de soros de camundongos (GI-IMD, GII-IMD+LVS, GIII-LVS e GIV-controle e animais não infectados) foram adicionadas (50µl/poço, em duplicata) na diluição 1:1000 em PBS-T contendo 5% de leite desnatado (PBS-TM). Após incubação por 45 minutos a 37°C, as placas foram novamente lavadas e o conjugado imunoenzimático (IgG de cabra anti-IgG murina ligado à peroxidase, Sigma Chemical CO. St. Louis, MO, USA) diluído 1:1000 em PBS-TM foi adicionado (50µl/poço) e posteriormente incubadas por 45 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e o substrato enzimático (peridrol em tampão citrato de sódio/ácido cítrico, pH 5, contendo orto-fenilenodiamina) (OPD) adicionado (50µl/poço). Após o desenvolvimento da cor por 15 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura efetuada em leitor de microplaca a 492nm. Os resultados foram expressos por índice ELISA (IE) calculado pela fórmula $IE = (S - B)/(N - B)$, onde S é a média dos valores da densidade óptica em cada amostra, B a média dos valores da densidade óptica do branco e N, a média dos valores de densidade óptica dos controles negativos (soros de camundongos BALB/c não infectados por *Leishmania*).

5.4. Análises histopatológica e morfométrica

No 121º dia pós-infecção por *L. (L.) amazonensis* e tratamento com imidocarb e/ou levamisol, os animais foram sacrificados conforme os princípios éticos em pesquisa animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Fragmentos do coxim plantar, baço e linfonodo poplíteo foram removidos, fixados em solução de formalina a 10% e em seguida desidratados em concentrações crescentes de álcool (50, 75, 85 e 100%). Após a desidratação os tecidos foram embebidos e incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Leica Instruments Gmbh, Nussloch, Alemanha). Cortes de 7 µm de espessura, foram posteriormente corados em hematoxilina e eosina e analisados por microscopia de luz. Foram analisados os parâmetros, área de vacúolo dos macrófagos parasitados, número de megacariócitos no baço, presença de parasitos em células esplênicas, carga parasitária e alterações histopatológicas. As imagens foram capturadas por câmera Olympus 200 acoplada ao microscópio BX 40 (Olympus Optical Co Ltda, Japan) e analisadas utilizando o software HImage++97 (Western Vision Software, USA) em objetivas de 10, 40 e 100X. A análise da área de vacúolos foi realizada em macrófagos do coxim plantar de camundongos infectados, sendo avaliadas 250 células de cada grupo. O número de megacariócitos foi avaliado no baço dos animais infectados e não infectados, sendo analisados 50 campos por grupo, em objetiva de 10X. A avaliação da carga parasitária foi determinada no coxim plantar dos animais infectados, nos quais

foram analisados 30 campos por grupo, em objetiva de 100X. As alterações histopatológicas nos tecidos foram analisadas nas objetivas de 10, 40 e 100X.

5.5. Microscopia eletrônica

Para a análise ultraestrutural dos tipos celulares e dos parasitos, fragmentos da lesão foram pré-fixados em glutaraldeído a 1,5% dissolvido em tampão cacodilato a 0,1 M (pH 7,2), 8°C por 7 dias. Posteriormente, foram fixados no mesmo tampão acrescidos de OsO₄ a 1%, e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (50% a 100%) e, por último em óxido de propileno. Em seguida, os fragmentos das lesões foram incluído em resina Epon (Fluka, Suíça), seccionados (0,5 µm de espessura) e corados em azul de toluidina a 1%. Os cortes ultrafinos foram depositados em telas de cobre de 250 “mesh”, contracolorados em acetato de uranila (Merck, Darmstadt, Alemanha) e citrato de chumbo (Merck, Darmstadt, Alemanha) e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão EM 109, (Zeiss, Alemanha).

5.6. Análise estatística

Todos os dados foram analisados por comparação entre grupos, utilizando o teste *t* de Student. Foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

6.Resultados

6.1.Efeito do imidocarb e levamisol no curso da infecção

A evolução da lesão no coxim plantar dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* foi avaliada até a 10ª semana após o início do tratamento. Os resultados apresentados na Figura 3 mostraram que houve progressão da lesão nos animais de todos os grupos. No entanto, foi observado menor aumento da lesão no grupo de animais tratados com imidocarb (GI-IMD), no 65º dia pós-infecção e, nos animais do grupo tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS), no 86º e no 100º dias pós-infecção, em comparação ao grupo controle (GIV-controle) (Fig. 3; $p<0,05$). Observou-se ainda, que o levamisol pareceu potencializar o efeito do imidocarb até a 8ª semana após o início do tratamento nos animais do grupo GII-IMD+LVS, devido a menor evolução da lesão nesse período (Fig 3). Além disso, foi observado que o tratamento com levamisol (GIII-LVS) alterou o aspecto das lesões, as quais tendiam a cicatrização, mais evidente no período de 24 a 48 horas após o tratamento em cada semana (dados não mostrados).

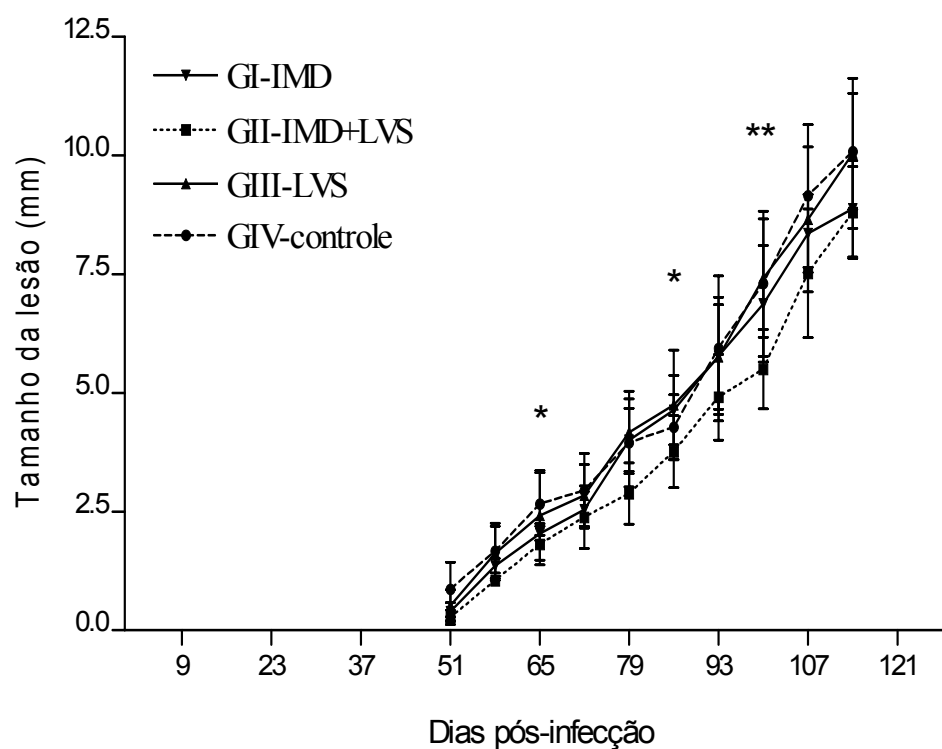


Figura 3: Evolução da lesão no coxim plantar dos camundongos infectados.

GI-IMD, tratamento com Imidocarb; GII-IMD+LVS, tratamento com imidocarb e levamisol; GIII-LVS, tratamento com levamisol; GIV-controle, sem tratamento. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do tamanho da lesão avaliado no período de 10 semanas após o início do tratamento. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.2. Níveis de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*

Os níveis séricos de anticorpos produzidos pelos camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com imidocarb (GI-IMD), imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS), apenas levamisol (GIII-LVS) e sem tratamento (GIV-controle) foram avaliados por ELISA. Houve detecção de altos níveis de anticorpos específicos em todos os animais infectados (Fig 4). No entanto, os valores do índice ELISA (IE) obtidos para IgG anti-*L. amazonensis* mostraram que os animais do grupo GI-IMD produziram menores níveis de anticorpo, quando comparados aos grupos GII-IMD+LVS ($p<0,05$), GIII-LVS ($p<0,01$) e GIV-controle, com redução de 34,45%, ($p<0,02$). Foi observado ainda, que os animais dos grupos submetidos ao tratamento apenas com levamisol (GII-LVS) tenderam a apresentar níveis maiores de IgG anti-*L. (L.) amazonensis* (Fig 4).

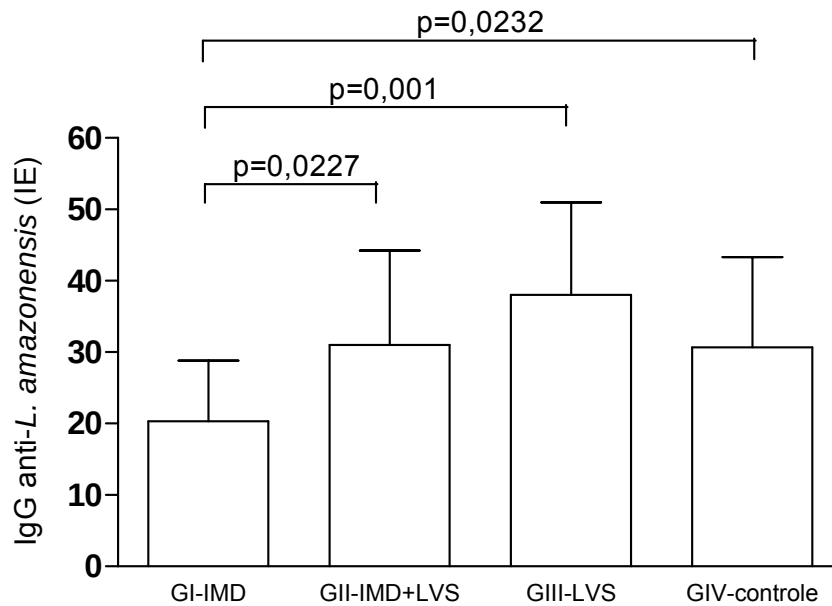


Figura 4: Níveis de IgG anti- *L. (L.) amazonensis* em amostras de soros de camundongos infectados e tratados, no 121º dia pós-infecção. GI-IMD, camundongos infectados e tratados com Imidocarb; GII-IMD+LVS, camundongos infectados e imidocarb e levamisol; GIII-LVS, camundongos infectados e tratados com levamisol; GIV-controle, camundongos infectados e não tratados. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do índice ELISA (IE); p níveis de significância.

6.3.Carga parasitária

A avaliação da carga parasitária no coxim plantar dos animais experimentalmente infectados foi realizada pela contagem de amastigotas presentes no interior de macrófagos. As imagens foram capturadas com auxílio de câmera acoplada ao microscópio, e posteriormente analisadas, com o auxílio do programa HLImage 97++, perfazendo 30 campos por grupo, com área total de 97050 μm^2 . A análise das imagens capturadas revelou que o grupo de animais tratados com imidocarb (GI-IMD) e imidocarb e lavamisol (GII-IMD+LVS) (Fig. 5) apresentaram carga parasitária estatisticamente menor ($p<0,01$) que os grupos de animais tratados apenas com levamisol (GIII-LVS) e sem tratamentos (GIV-controle).

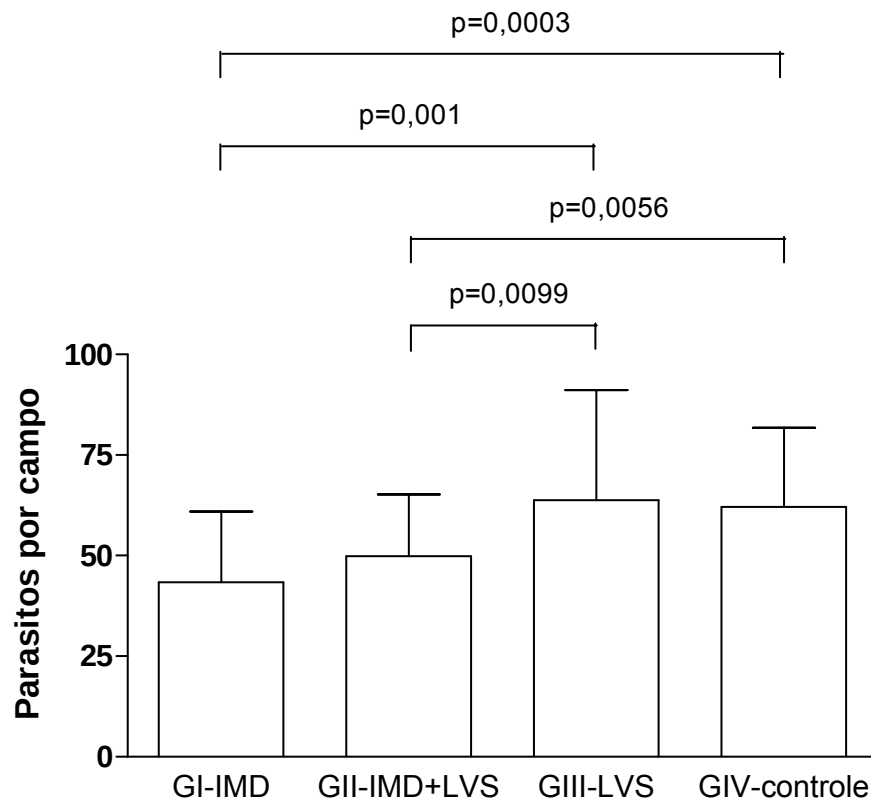
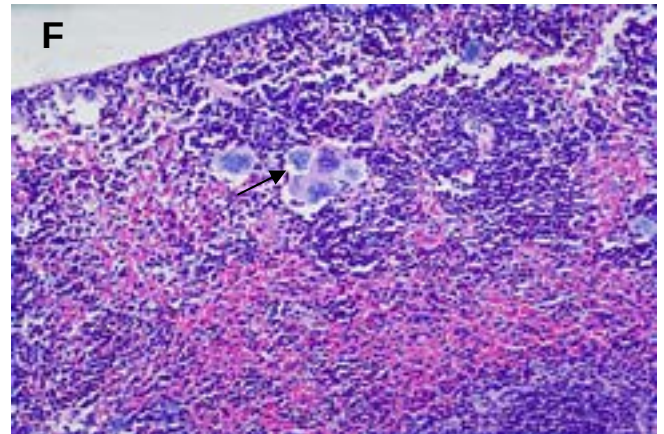
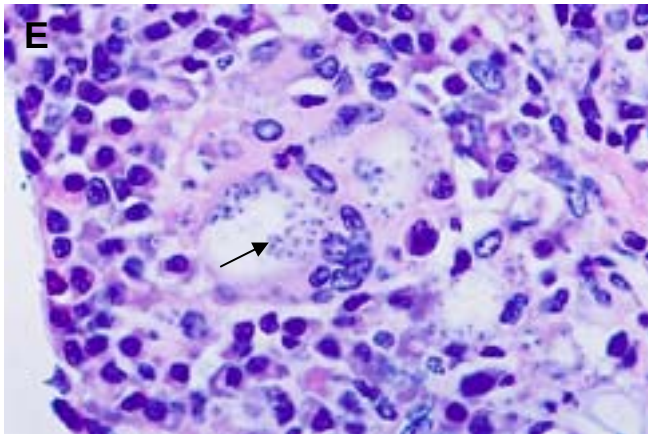
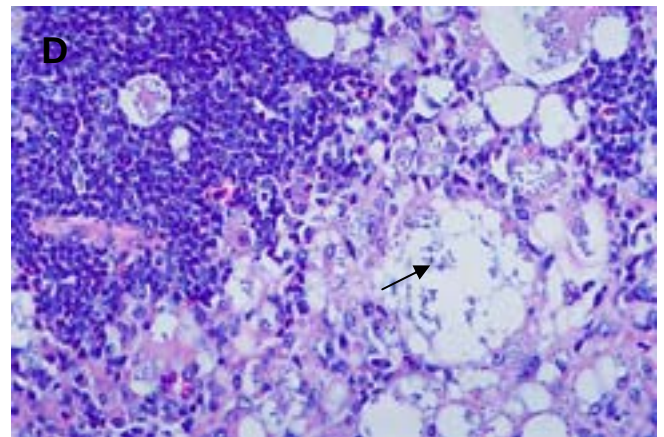
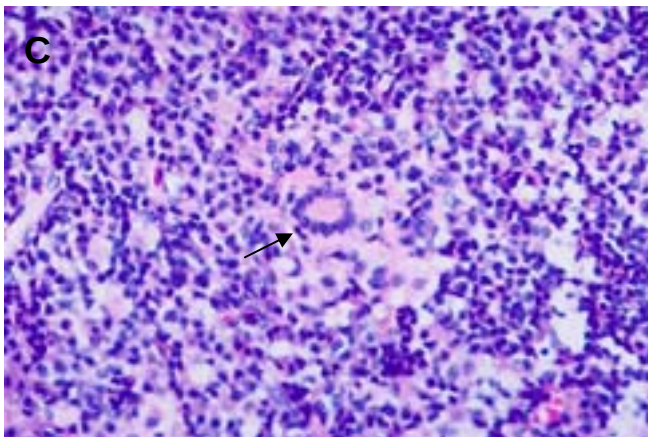
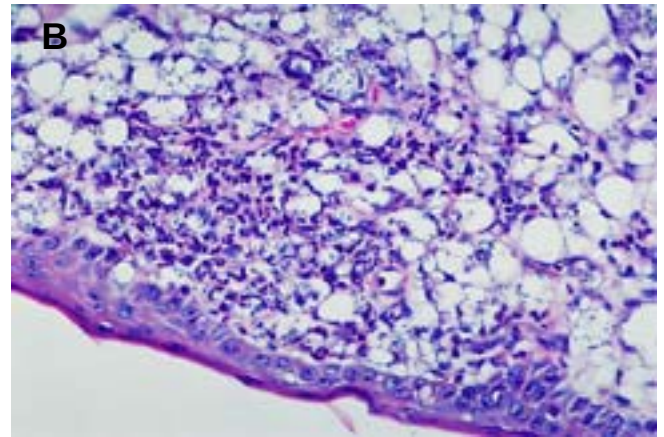
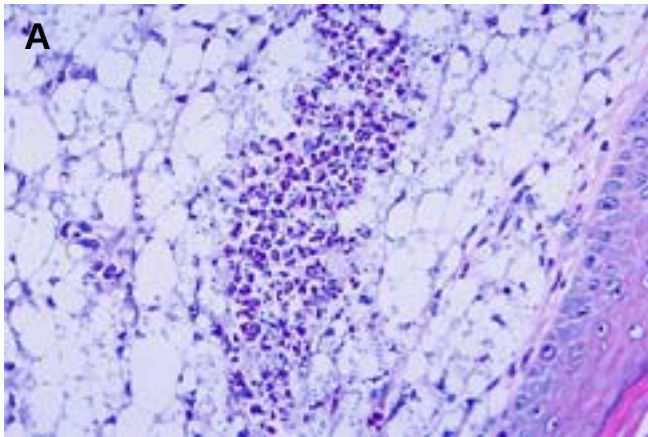


Figura 5: Carga parasitária no coxim plantar dos camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* tratados. GI-IMD, camundongos infectados e tratados com Imidocarb; GII-IMD+LVS, camundongos infectados e imidocarb e levamisol; GIII-LVS, camundongos infectados e tratados com levamisol; GIV-controle, camundongos infectados e não tratados. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de parasitos por campo no interior dos macrófagos infectados. *p* níveis de significância.

6.4. Análise histopatológica

À microscopia de luz mostrou que no 121º dia pós-infecção os camundongos de todos os grupos apresentaram alterações histopatológicas, em intensidade variada (Fig. 6A-6F). As células da epiderme do coxim plantar dos animais infectados não demonstraram estar parasitadas. Entretanto houve aumento na produção de pigmento das células na lâmina basal de epiderme e espessamento da queratina recobrimdo este estrato epidérmico (hiperqueratose) (Fig. 6A). As principais alterações foram encontradas na derme e na hipoderme, a análise histopatológica nos camundongos infectados revelou a presença de alterações típicas de um processo inflamatório crônico granulomatoso (reação inflamatória, reação reparatória e reação degenerativa), tanto no local da lesão como no linfonodo poplíteo adjacente (Fig. 6A-6E). Os principais achados foram: hiperplasia e hipertrofia das células presentes na derme, especialmente histiócitos e fibroblastos; áreas focais de necrose na pele, linfonodo e tecido ósseo; infiltrados celulares compostos de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos e eosinófilos (Fig. 6A); grande número de histiócitos infectados, com parasitismo variável (Fig. 6A-6E). Os histiócitos nas áreas infectadas apresentaram-se túrgidos, com presença de grandes vacúolos; citoplasma e núcleo deslocados para a periferia das células (Fig. 6A-6E). Também foi observada a presença de células gigantes do tipo Langhans nos linfonodos, caracterizando assim lesões com alto nível de renovação celular (Fig. 6C).

Figura 6: Fotomicrografias de órgãos dos camundongos infectados por *L(L.) amazonensis* e tratados. (A) Pele, grupo de animais não tratados (GIV-controle); alto parasitismo, presença de infiltrado linfocitário e neutrofílico e de grandes vacúolos nos macrófagos (objetiva de 40X). **(B)** Pele, grupo de animais tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS); intenso parasitismo, presença de áreas de necrose e de infiltrado inflamatório, e grandes vacúolos nos macrófagos (objetiva de 40X). **(C)** Linfonodo, grupo de animais tratados com levamisol (GIII-LVS); célula gigante (seta) (objetiva de 40X). **(D)** Linfonodo, grupo de animais tratados com imidocarb (GI-IMD); acúmulo linfático e macrófagos com intenso parasitismo (seta) (objetiva de 40X). **(E)** Linfonodo, grupo de animais sem tratamento (GIV-controle); seta - intenso parasitismo (objetiva de 100X). **(F)** Baço, grupo de animais tratados com levamisol (GIII-LVS), presença de grande número de megacariócitos (seta) (hematopoese extramedular) (objetiva de 20X).



6.5.Área de vacúolo dos macrófagos infectados

Para a avaliação morfométrica da área de vacúolo dos macrófagos dos camundongos infectados com e sem tratamentos, imagens dos tecidos do coxim plantar foram capturadas e analisadas utilizando-se o software HLImage 97++(Fig. 7A). Foi observado que a área de vacúolo dos macrófagos infectados dos camundongos do grupo tratado com imidocarb (GI-IMD) estavam significativamente menores (Fig. 7B) que os animais dos grupos tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS; $p<0,005$), tratados com levamisol somente (GIII-LVS; $p<0,05$) e não tratados (GIV-controle, com redução de 3,75%; $p<0,01$).

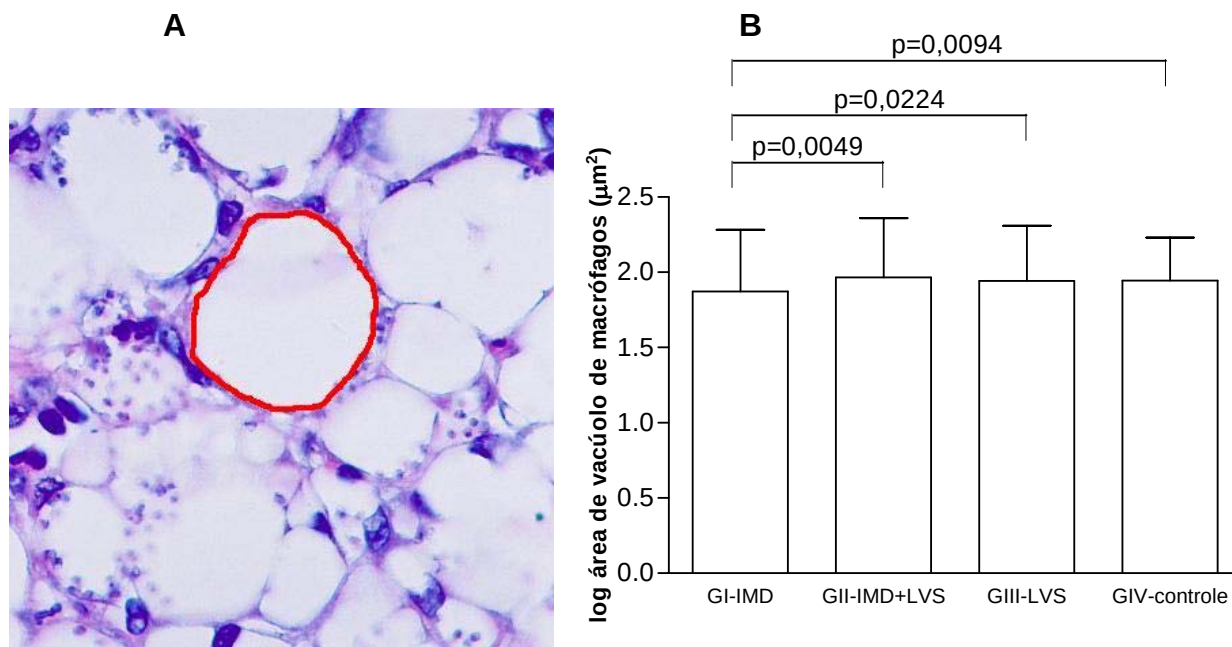


Figura 7: Área dos vacúolos parasitóforos de macrófagos. (A) Determinação da área dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos no coxim plantar de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis* com e sem tratamentos, no 121º dia pós-infecção, pela utilização do software HImage++97. **(B)** Média e desvio padrão do log da área de vacúolos parasitóforos dos macrófagos do coxim plantar infectado. GI-IMD, camundongos infectados e tratados com Imidocarb; GII-IMD+LVS, camundongos infectados e imidocarb e levamisol; GIII-LVS, camundongos infectados e tratados com levamisol; GIV-controle. *p* níveis de significância.

6.6. Contagem de megacariócitos no baço

Para avaliação morfométrica dos megacariócitos no baço de camundongos não infectados e infectados por *L (L.) amazonensis* com e sem tratamento, imagens de tecido esplênico foram capturadas e analisadas utilizando-se o software HLImage 97++. Nos baços dos camundongos infectados foi observado expressivo número de megacariócitos (hematopoese extramedular; 6F). Nos baços dos animais dos grupos tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS), com levamisol apenas (GIII-LVS) e sem tratamento (GIV-controle) houve aumento significativo do número de megacariócitos (Fig. 8; $p < 0,01$) em comparação aos baços do grupo de animais infectados e tratados com imidocarb (GI-IMD). A redução do número de megacariócitos do GI-IMD foi 63,19% em comparação ao grupo GIV-controle (Fig. 8; $p < 0,003$).

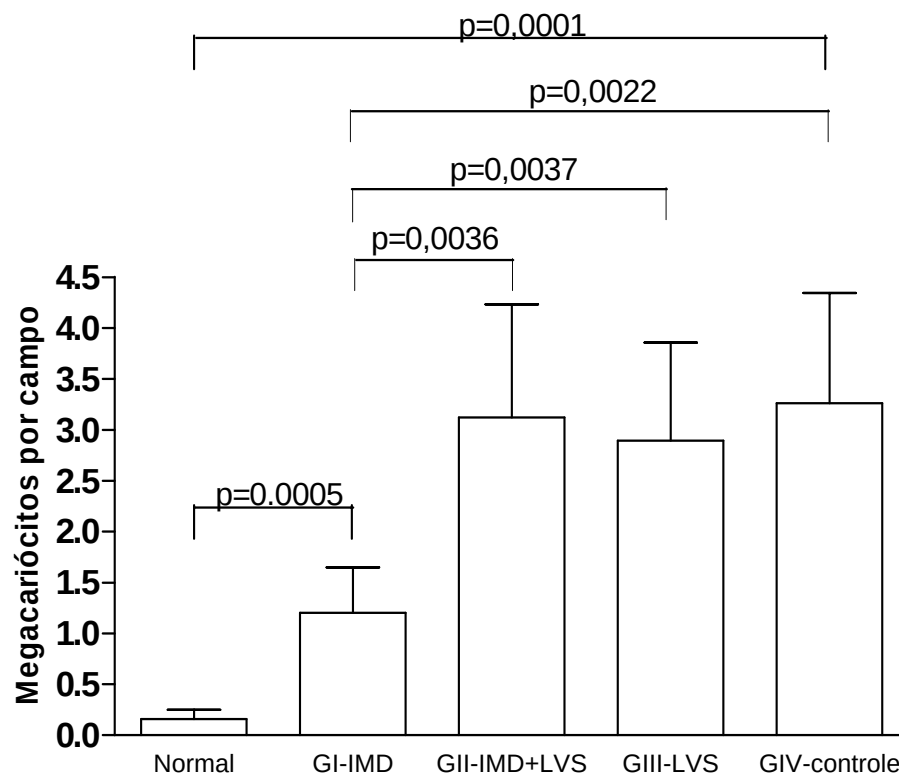


Figura 8: Média e desvio padrão do número de megacariócitos no baço de camundongos BALB/c não infectados ou infectados por *L (L.) amazonensis*, com e sem tratamentos. Normal, camundongos não infectados e não tratados; GI-IMD, camundongos infectados e tratados com imidocarb; GII-IMD+LVS, tratados com imidocarb e levamisol; GIII-LVS; tratados com levamisol somente; GIV-controle sem tratamento. *p* nível de significância.

6.7. Microscopia Eletrônica

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelaram intenso parasitismo na lesão, principalmente em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Figs. 9A e 9B). Os macrófagos foram os tipos celulares predominantes, os quais apresentaram vacúolos fagolisossomais em diferentes graus de desenvolvimento (Fig. 9A). Nos vacúolos parasitóforos foi observada a presença de material eletrodense e debris (9A), além de número variável de amastigota, geralmente ancoradas ou próximas à membrana do vacúolo fagolisossomal (Fig. 10A e 10B). Os parasitos intracelulares mostraram grande variação, quanto ao grau de degeneração (11A e 11B), podendo ser encontrado: danos na membrana celular do parasito, presença de vacúolos nas amastigotas e debris (Fig. 11B). Entretanto, não foi possível observar diferença significativas nas ultraestruturas dos parasitos e tipos celulares presentes nas lesões dos animais, submetidos aos diferentes tratamentos.

Figura 9: Eletromicrografias de células parasitadas do coxim plantar dos camundongos infectados por *L(L.) amazonensis*. (A) Macrófagos infectados e número variável de parasitos dentro dos vacúolos parasitóforos, que estão em diferentes fases de desenvolvimento, grupo de animais tratados com imidocarb (GI-IMD) (aumento 7140X). **(B)** Presença de eosinófilos na lesão, grupo de animais tratados com imidocarb (GI-IMD) (aumento 4430X).

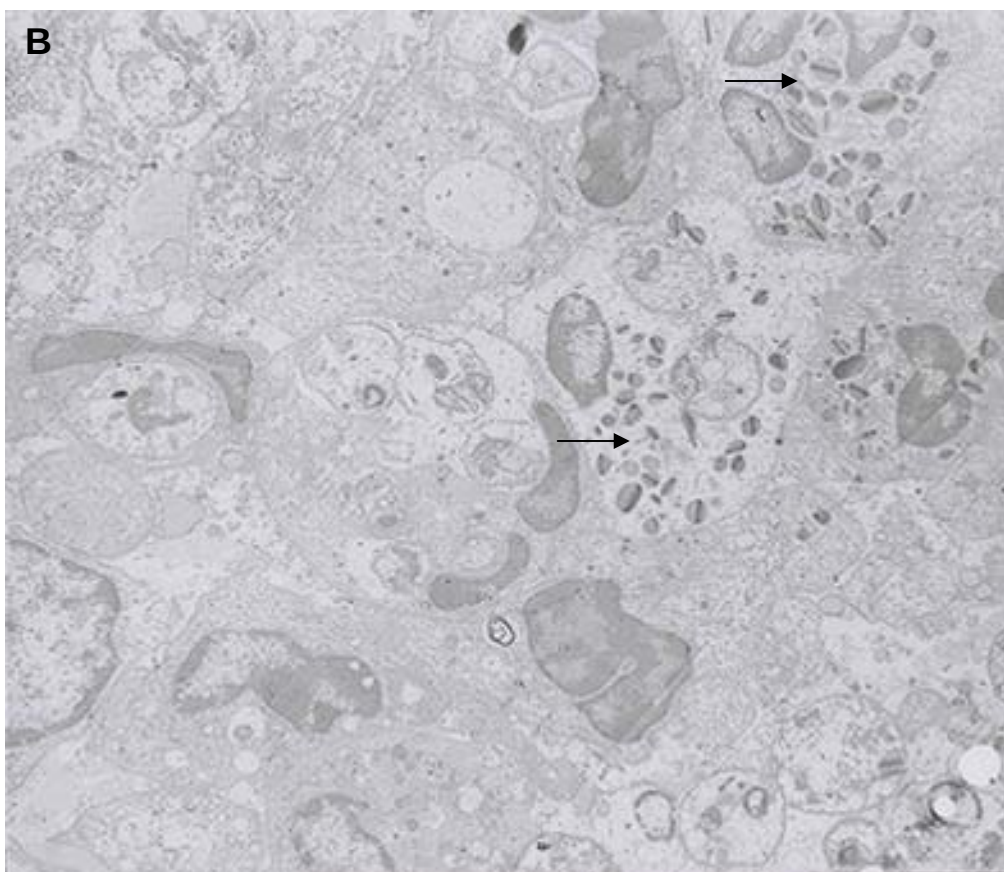
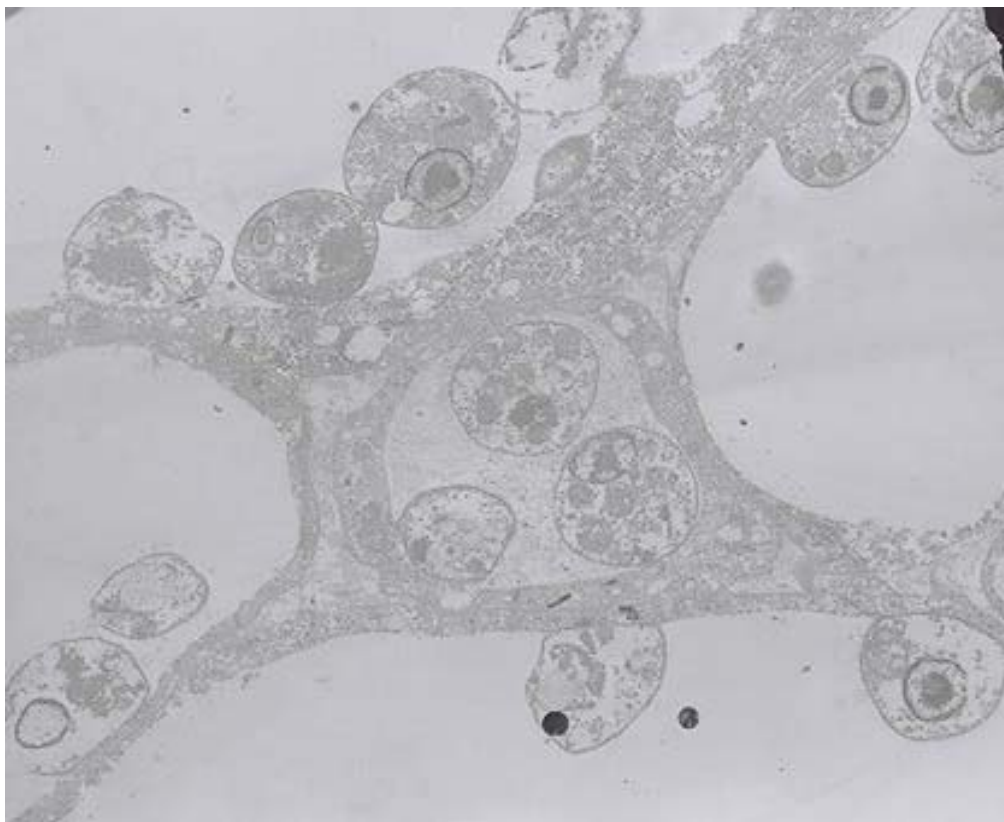


Figura 10. Eletromicrografias de células parasitadas do coxim plantar dos camundongos infectados por *L(L.) amazonensis*. (A) Amastigotas ancoradas no vacúolo fagolisossomal; grupo dos animais sem tratamento (GIV-controle) (aumento de 32000X). **(B)** Detalhe de A. Presença de dupla membrana no contato parasito-membrana do vacúolo fagolisossomal (seta) (aumento 90100X).

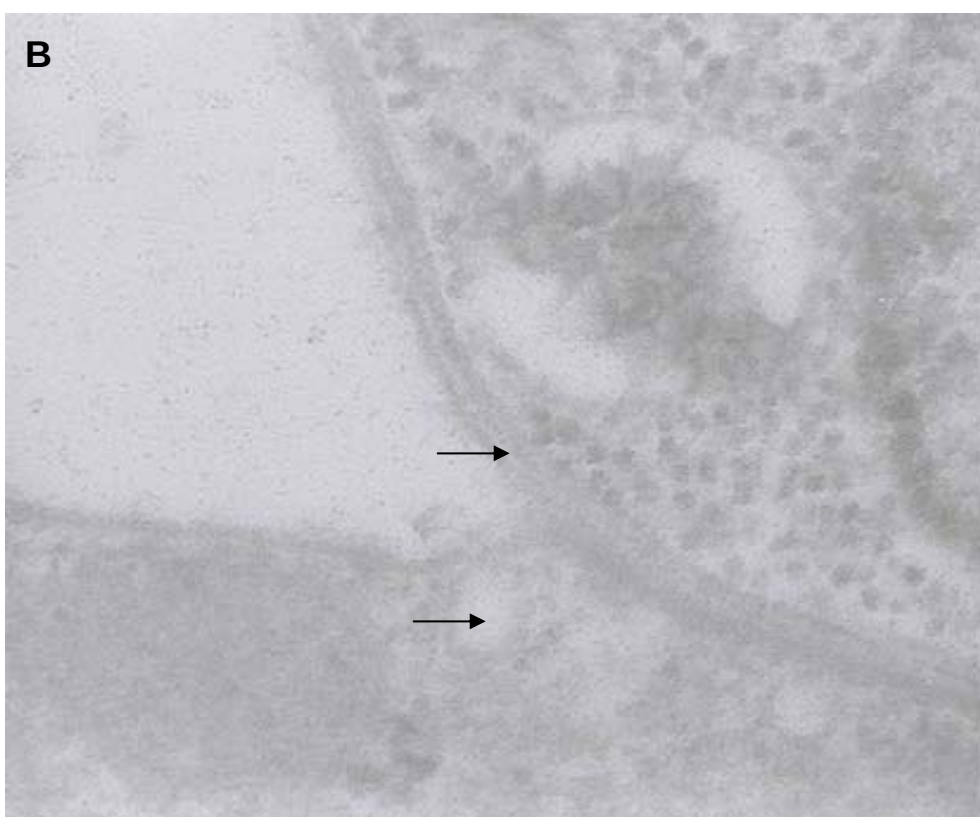
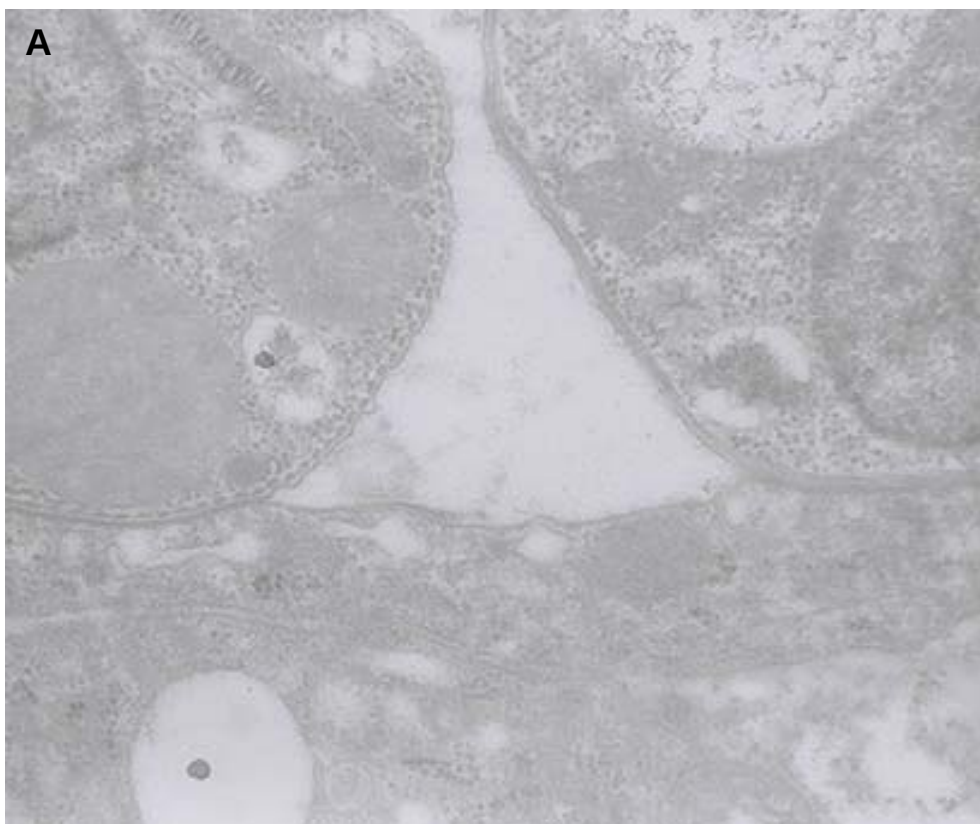
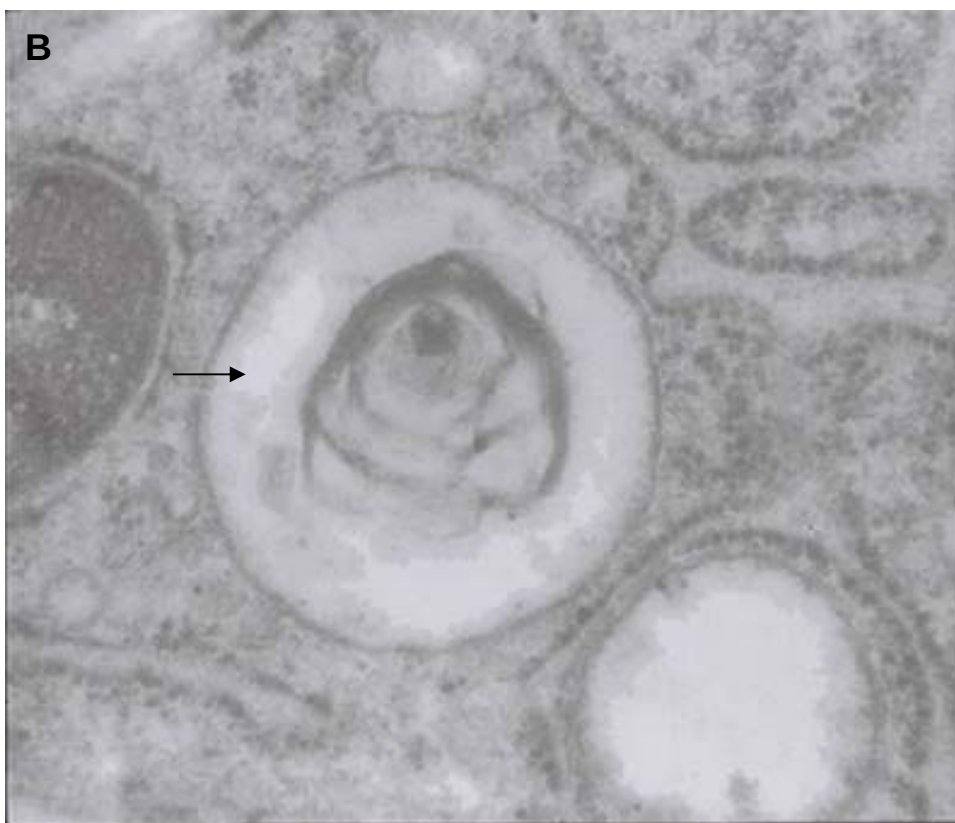
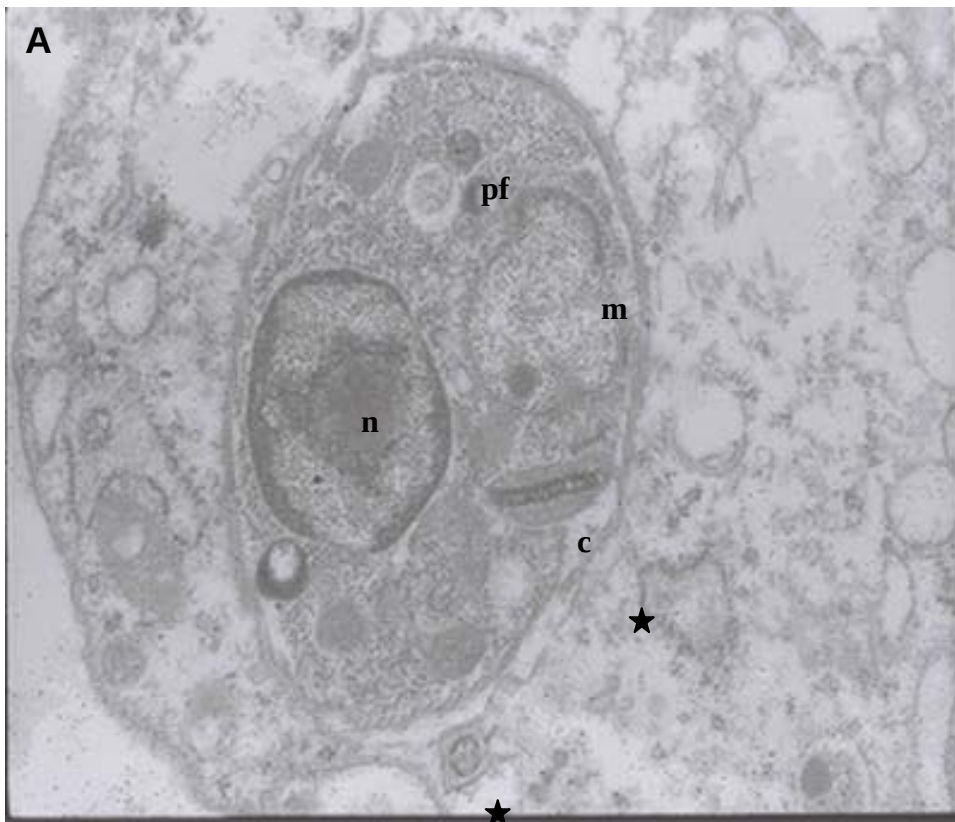


Figura 11. Eletromicrografias de células parasitadas do coxim plantar dos camundongos infectados por *L(L.) amazonensis*. (A) Amastigota parasitando célula, grupo de animais tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS). Núcleo (n), pocket flagelar (pf), mitocôndria (m), cinetoplasto (c), espaço entre as membranas do parasito e do vacúolo parasitóforo (aumento de 23600X). **(B)** Amastigotas degeneradas, grupo de animais tratados com imidocarb e levamisol (GII-IMD+LVS) (seta) (aumento 23600X).



Discussão

7. Discussão

Os efeitos adversos provenientes do uso dos compostos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos (CROFT; COOMBS, 2003; GUPTA; RAMESH; SRIVASTAVA, 2005; OLLIARO; LAZDINS; GUHL, 2002; RAYCHAUDHURY et al., 2005). O presente estudo descreve os efeitos do imidocarb e do levamisol no tratamento da infecção experimental em camundongos BALB/c por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

O imidocarb, uma droga que apresenta semelhança estrutural com as diamidinas catiônicas (NATHAN et al., 1979). A pentamidina, outra diamidina catiônica, compete com as poliaminas, moléculas policatiônicas, pela ligação com a dupla hélice do sulco menor de DNA, especialmente, em sítios ricos em adenina e timina (MOORE et al., 1996). As poliaminas são vitais para a proliferação e diferenciação celular e estão presentes em todos eucariotos (BASSELIN et al., 1997; TETI; VISALLI; McNAIR, 2002). Com base nas semelhanças estruturais entre o imidocarb e a pentamidina, bem como sua afinidade por moléculas intracelulares, como o DNA, é sugestivo que os mecanismos de ação destas substâncias também sejam semelhantes. Assim, neste trabalho os dados obtidos dos animais infectados e tratados com imidocarb, como: menores níveis de IgG anti- *L. (L.) amazonensis* (redução de 34,45%), menor área vacuolar nos macrófagos infectados (redução de 3,75%), número menor de megacariócitos nos

baços dos animais infectados (redução de 63,19%) e menor carga parasitária (30,2%), em relação ao grupo de animais infectados e sem tratamentos, podem ser explicados. Já que as poliaminas parecem ser importantes tanto na multiplicação das formas amastigotas, como nas vias de sinalização, modulação do sistema imunológico do hospedeiro, na regulação de atividades celulares envolvendo a replicação do DNA, expressão gênica (TABOR; TABOR, 1984; KROPF, et al., 2005).

Em contraste com o tratamento por imidocarb (GI-IMD), o levamisol (GIII-LVS) não apresentou baixos níveis de IgG anti- *L. (L.) amazonensis*, em comparação com o grupo GIV-controle. Esses dados podem estar relacionados ao fato de que camundongos BALB/c são altamente susceptíveis e respondem a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* com produção de altos níveis de IgG específica (OLIVEIRA et al., 2004). Além disso, os camundongos do grupo GII-IMD+LVS produziram níveis de anticorpos anti - *L. (L.) amazonensis* mais elevados que os do grupo GI-IMD, sugerindo que o levamisol potencializou a produção desta imunoglobulina, mesmo quando utilizado conjuntamente com o imidocarb, devido sua atividade imunoestimulante. Estes dados estão em acordo como os experimentos de Jin et al., (2003) que observaram aumento nos níveis de IgG utilizando o levamisol como adjuvante. Além disso, Miles et al. (2005), avaliando o efeito da IgG anti-*Leishmania* exógena em camundongos deficientes para IgG, observaram a exacerbação das lesões, demonstrando assim que altos níveis de IgG anti-*Leishmania*, além de não promoverem proteção contra o patógeno, exercem efeito deletério na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Estes dados corroboram os achados no presente trabalho, em que os animais do grupo

GI-IMD apresentaram menores níveis de IgG específicas, entretanto os camundongos do grupo GII-IMD+LVS apresentaram altos níveis de IgG anti-*L. (L.) amazonensis*, sugerindo a participação de outros fatores na patologia da infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, nos animais tratados com levamisol, observou-se melhora transitória no aspecto clínico da lesão, sugerindo que este fármaco atue na ativação dos macrófagos dos camundongos BALB/c, nos quais a resposta deste tipo celular é polarizada para o perfil M2, que está relacionado com o processo de reparo e remodelagem tecidual (MANTOVANI et al., 2002).

As alterações histopatológicas foram observadas nos tecidos de todos os animais analisados, sendo menos evidentes no grupo de camundongos tratados com imidocarb que nos animais tratados com levamisol. Estes dados estão de acordo com os achados de Grimaldi et al. (1980), no qual o levamisol não foi capaz de alterar o curso da doença, bem como as características histopatológicas das lesões de camundongos infectados experimentalmente por *L. (L.) mexicana*, iniciando o tratamento 3 meses após a infecção. Por outro lado, Rezai et al. (1988) utilizando o levamisol no tratamento de camundongos e cobaias, 3 horas antes da infecção dos animais por *L. (L.) major*, observaram melhora no aspecto da lesão e alterações nos parâmetros hematológicos, em relação ao grupo controle. Estas divergências entre os dados aqui discutidos sugerem que a susceptibilidade do hospedeiro e o momento de iniciar o tratamento são fatores determinantes na resolução da infecção.

A presença de vacúolos menores nos macrófagos dos animais do grupo GI-IMD sugere que houve inibição parcial na multiplicação do parasito ou ainda que o imidocarb interferiu na ativação dos macrófagos, por vias que ainda não estão

bem elucidadas. No grupo GII-IMD+LVS, o levamisol mostrou influenciar no tamanho da área de vacúolo de macrófagos, mesmo que os camundongos deste grupo tenham recebido o imidocarb, o que denota o efeito imunoestimulante do levamisol, já que macrófagos ativados apresentam-se espalhados, maiores atividade celular e dos fagolisossomos. De acordo com Antoine et al. (1998), macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* apresentaram vacúolos maiores do que outras espécies de *Leishmania*. No entanto, a importância do tamanho desta organela para a sobrevivência do parasito, bem como das interações parasito-vacúolo parasitóforo, ainda não está elucidada.

O menor número de megacariócitos no baço dos animais tratados apenas com imidocarb, sugere que esta droga exerceu efeito sobre o parasitismo ou na multiplicação dos megacariócitos no baço (hematopoese extramedular). A hematopoese extramedular parece ser um evento induzido pela infecção e necessária para a multiplicação do parasito (ABREU-SILVA et al., 2004). Em infecção experimental murina por *Schistosoma mansoni*, Lenzi et al. (1995) também observaram hematopoese extramedular em animais infectados, sugerindo que o parasitismo induz o recrutamento de células hematopoéticas. Contudo, os camundongos tratados apenas com imidocarb, apresentaram lesões com características ulcerativas no coxim plantar, enquanto os animais que receberam imidocarb e levamisol não exibiram úlceras no coxim plantar infectado, sugerindo que o aumento do número de megacariócitos esteja relacionado não somente com o requerimento de novas células necessárias, devido ao parasitismo, como também, seja um fator importante no controle da patologia das lesões acarretadas pela infecção.

Neste estudo, os dados que pareceram influenciar de modo mais determinante a evolução da lesão no coxim plantar (no 121º dia pós-infecção) foi o parasitismo das células presentes no local da infecção. A análise semanal do tamanho da lesão e a quantificação do parasitismo no coxim plantar dos animais que receberam imidocarb (GI-IMD e GII-IMD+LVS) mostraram valores compatíveis, o que denota a atividade do imidocarb limitando a multiplicação do parasito. Entretanto, a pequena diferença entre a evolução das lesões, no coxim plantar dos camundongos infectados, sugere que fatores como: dose do agente infectante, susceptibilidade do hospedeiro, início do tratamento, esquema terapêutico adotado (dosagem e número de tratamentos) e via de inoculação, são de fundamental importância no desfecho da infecção. Assim, a aparente homogeneidade no tamanho das lesões entre os diferentes grupos não indica insucesso do imidocarb como droga a ser utilizada na terapêutica das leishmanioses. Os parâmetros avaliados: menores níveis específicos de imunoglobulina, parasitismo e área de vacúolos dos macrófagos infectados sugerem a utilização do imidocarb como droga em potencial no tratamento da leishmaniose tegumentar.

Conclusões

8. Conclusões

1 - O imidocarb modificou os aspectos histopatológicos e morfométricos nos camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *Leishmania (L.) amazonensis*.

2 - Os níveis específicos de imunoglobulina, parasitismo e área de vacúolos dos macrófagos infectados validam a utilização do imidocarb como droga em potencial no tratamento da leishmaniose tegumentar.

3 - O levamisol quando utilizado isoladamente foi capaz de promover estimulação do sistema imunológico, caracterizada pelo aumento nos níveis de IgG anti-L (*L. amazonensis*) no soro dos animais tratados com melhora transitória no aspecto das lesões dos camundongos.

Referências Bibliográficas

9.Referências Bibliográficas

ABREU-SILVA, A.L., CALABRESE, K.S., CUPOLILO,S.M.N., CARDOSO, F.O., SOUZA, C.S.F., GONÇALVES DA COSTA, S.C.. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.179-187, 2004.

ALRAJHI, A.A., IBRAHIM, E.A., DE VOL, E.B, KHAIRAT, M., FARIS, R.M., MAGUIRE, J.H.. Fluconazol for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **New England Journal of Medicine**, v.346, p.891-895, 2002.

ANDERSEN, E.M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVARRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J.D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, n.2, p.133-137, 2005.

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

AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.Z.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; METLASHEWSK, G.; LLANOS-CUENTAS, A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clinical Infectious Disease**, v.33, p.1847-1851, 2001.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CÚBRIA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **Gen. Pharmac.**, v.30, n.4, p.435-443, 1998.

BADARO, R.; NASCIMENTO, C.; CARVALHO, J.; et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.413-418, 1994

BAHAMDAN, K.A., TALLAB, T.M., JOHARGI, H., NOURAD, M.M., IBRAHIM, K., EL SHERBINI, A.H., KARKASHAN, E., KHARE, A.K., NAURI, M.M.. Terbinafine in the treatment of cutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International Journal of Dermatology**, v.36, p.59-60, 1997

BASSELIN, L.; BADET-DENISOT, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of Pentamidine on Polyamine Level and Biosynthesis in Wild-Type, Pentamidine-Treated, and Pentamidine-Resistant Leishmania. **Experimental Parasitology**, v.85, p.274–282, 1997.

BECKER, I.; VOLKOW, P.; VELASCO-CASTREJON, O.; SALAIZO-SUAZO, N.; BERZUNZA-CRUZ, M.; DOMINGUEZ, J.S.; MORALES-VARGAS, A.; RUIZ-REMIGLO, A.; PEREZ-MONTFORT, R. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v.85, p.165-170, 1999.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.684–703, 1997.

BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies and mice and man. **Parasitology**, v.112, p.67-74, 1996.

BOUVIER, J.; BORDIER, C.; VOGEL, H.; REICHELT, R.; ETGES, R. Characterization of the promastigote surface protease of Leishmania as a membrane-bound zinc endopeptidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.37, p.235–246, 1989.

BOUVIER, J.; SCHNEIDER, P.; ETGES, R.; BORDIER, C. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of Leishmania. **Biochem.**, v.29, p.10113–10119, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2003, 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2000, 62p.

BRITTINGHAM, A.; CHEN, G.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect. Immun.**, v.67, p.4477–4484, 1999.

CDC. Life Cycle. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dxdt/HTML/Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm. Acesso em: <21/09/2003>.

CDC. Update: cutaneous leishmaniasis in U.S. military personnel—southwest/Central Asia, 2002–2004. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.53, p.264–265, 2004.

CHANG, K.P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.44, p.499-529, 1990.

CHANG, K..P.; McGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**. Disponível em <<http://www.kinetoplastids.com/content/l/l/>> , 2002.

CHUNGE, C.N.; OWATE, J. PAMBA, H.O.; DONNO, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. **Trans. R. Med. Hyg.**, v.84, p.221-225, 1990.

CROFT, S.L., COOMBS, G.H.. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**. v.19, n.18, p.502-508, 2003.

CROFT SL, SNOWDON D, YARDLEY V. The activities of four anticancer alkylphospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.38, p.1041–1047, 1996.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. **Microbes and Infection**, v.4, p.975-981, 2002.

DONKOR, I.O., ASSEFA, H., RATTENDI, D., LANE, S., VARGAS, M., GOLDBERG, B., BACCHI, C. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. **European Journal Med. Chem.**, v.36, p.531-538 , 2001.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in vitro and in vivo experimental models. **Parasitol. Res.**, v.96, n.4, p.216-223, 2005.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the US? **Science**, v.290, p.1881–1883, 2000.

FAURATY-GAMBARELLI, F., PIARROUX, R., DENIAU, M., GIUSIANO, B., MARTY, P., MICHAEL, G., FAUGERE, B., DUMON, H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Anti-microb. Agents Chemother.**, v.41, p.827-830, 1997.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.B.; SOUSA, M.C.; PACHECO, R.S.; DIAS, E.S.; ANDRADE FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P.; MELO, M.N.; Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v.81, n.2, p.143-150, 2002.

GRAMICIA, M., GRADONI, L., ORSINI, S. Decrease sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.86, p.613-620, 1992.

GRIMALDI, G.F., MORIEARTY, P.L., HOFF, R. *Leishmania mexicana* in C3H mice: BCG and levamisole treatment of established infections. **Clinical Experimental Immunology**, v.41, p.237-242, 1980.

GONÇALVES, G.S.; FERNANDES, A.P.; SOUZA, R.C.C.; CARDOSO, J.E.; OLIVEIRA-SILVA, S.; MACIEL, F.C.; RABELLO, A.; FERREIRA, L.A.M. Activity of a paramomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v.93, p.161-167, 2005.

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.

GUPTA, S.; RAMESH, S.C.; SRIVASTAVA, V.M. Efficacy of picroliv in combination with miltefosine, an orally effective antileishmanial drug against experimental visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.94, n.1, p.41-47, 2005.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, p.1191-1199, 1999.

IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. Efficacy of paramomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: result of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.99, n.1 p.3-9, 2005.

JHA S.N.; SINGH, N.K.; JHA, T.K. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. **J. Assoc. Physicians India**, v.39, p.314–316, 1991.

JHA, TK. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. **Trans R Soc Trop. Med. Hyg.**, v.77, p.167– 70, 1983.

JIN, H.; LI, Y.; MA, Z.; ZHANG, F.; XIE, Q.; GU, D.; WANG, B. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. **Vaccine**, v.22, p.2925–2935, 2004.

KAFETZIS, D.A.; VELISSARIOU, I.M; STABOULI, S.; MAVRIKOU, M.; DELIS, D.; LIAPI, G. Treatment of pediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.26-30, 2005.

KATAYAMA, T., HAYASHI, Y., NAGAHIRA, K., KONISHI, K., YAMAICHI, K., OIKAWA, S.. Imidocarb, a potent anti-protozoan drug, up-regulates interleukin-10 production by murine macrophages. **Biochemistry Biophisic Research Communication**, v.309, p.414-418, 2003.

KOUTINAS, A.F., SARIDOMICHELAKIS, M.N., MILONAKIS, M.E., LEONTIDES, L., PALIZOUPOLOU, Z., BELLINIS, C., ARGYRIADIS, D., DIAKOU, N., PAPADOPOULOS, O. A. Randomised, blinded, placebo-control clinical trial with allopourinol in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. V.98, p.247-261, 2001.

KROPF, P.; FUENTES, J.M.; FÄHNRIK, E.; ARPA, L.; HERATH, S.; WEBER, V.; SOLER, G.; CELADA, A.; MODOLELL, M.; MULLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo, **FASEB Journal**, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evoulution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R., **The leishmaniasis in biology and medicine**. Florida: Adademic, 1987, v.1, p.1-20.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; ROSMAN, F.C.; PELAJO-MACHADO, M.; MOTA, E.M.; PANASCO, M.S.; OLIVEIRA, D.N. Extramedullary hematopoiesis in murine schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.90, p.169-177, 1995.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v.114, p.256-265, 2005.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biol. Chem.** 193,265-275, 1951.

McHUGH, C.P., THIES, M.L., MELBY, P.C., YANTIS JR., L.D., RAYMOND, R.W., VILLEGAS, M.D., KERR, S.F.,. Short report: a disseminated infection of *Leishmania mexicana* in an eastern woodrat, *Neotoma floridana*, collected in Texas. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.69, p.470–472, 2003.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v.23, n.11, p.549-555, 2002.

MILES, S.A., CONRAD, S.M., ALVES, R.G., JERÔNIMO, S.M.B., MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v.201, n.5, p.747-754, 2005.

MOORE, A.S., COLDHAM, N.G., SAUER, M.J. A cellular mechanism for imidocarb retention in edible bovine tissues. **Toxicology Letters.**, v.87, p.61-68, 1996.

MURRAY, H.W.;OCA, M.J.; GRANGER, A.M.; SCHEREIBER, R.D. Requirement for t cell and affects of lymphokines in sucessful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, v.83, n.4, p.1253-1257, 1989.

MURRAY, H.W.; CERVIA, J.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.; STOECKLE, M.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, v.95, p.1183-1189, 1995.

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach. **Int. J. Infec. Dis.**, v.4, n.3, p.158-177, 2000.

NATHAN, H.C., SOTO, K.V.M., MOREIRA, R., CHUNOSOFF, L., HUTNER, S.H., BACCHI, C.J. Curative effects of the antiprotozoals amicarbalide and imidocarb on *Trypanosoma brucei* infection in mice. **Journal of Protozoology.** v.26, n.4, p.657-660, 1979.

NAYLOR, P.H., HADDEN, J.W. T cell targeted enhancement yields effective T cell adjuvants. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1205-1215, 2003.

OLIVEIRA, C.I., TEIXEIRA, M.J., GOMES, R., BARRAL, A., BRODSKYN, C. Animal model for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Diseases Mod.**, v.1, p.81-86, 2004.

OLIVEIRA, M.C.; AMORIM, R.F.B.; FREITAS, R.A.; COSTA, A.L.L. Óbito em caso de leishmaniose cutâneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, n.3, p.258-260, 2005.

OLLIARO, P.; LAZDINS, J.; GUHL, F. Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Expert. Opin. Emerg. Drugs**, v.7, n.1, p.61-67, 2002.

OULLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v.7, p.257–266, 2004.

PASA, S.; TOZ, S.O.; VOYVODA, H.; OZBEL, Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinil and sodium stibogluconato. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.243-249.

RAYCHAUDHURY, B.; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R.V.; DATTA, S.C. Antiparasitic activity of triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v.95, p.1-8, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 3ed, 2001, 856p.

REZAI, H.R., BEHBEHANI, A.B., GETTNER, S., ARDEHALI, S. Effect of levamisole of the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. **Annual Topical Medical Parasitology**. V.82, n.3, p.243-249, 1988.

ROSYPAL, A.C., TROY, G.C., ZAJAC, A.M., DUNCAN JR., R.B., WAKI, K., CHANG, K.P., LINDSAY, D.S. Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.50, p.691–693, 2003.

SCOTT, J.A.; DAVIDSON, R.N.; MOODY, A.H.; GRANT, H.R. FELMINGHAM, D.; SCOTT, G.M.; et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.86, p.617–619, 1992.

SEIFERT, K.; MATU, S.; JAVIER PEREZ-VICTORIA, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S.L. Characterization of *Leishmania donovani* promastigotas resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p.380–387, 2003.

SINGH, S. Alkylphosphocholine in visceral leishmaniasis: in-vitro and in-vivo study. **J. Parasit. Dis.**, v.20, p.185–8, 1996.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.**, v.10, p.310-315, 2004.

SINHA, P.K.; PANDEY, K.; BHATTACHARYA, S.K. Diagnosis & management of leishmaniasis/HIV co-infection. **Indian J. Med. Res.**, v.121, p.407-414, 2005.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; VEGA, J.; BERMAN, J. Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, n.4, p.421-422, 2005.

SUNDAR, S. Drug resistense in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine Intern. Health**, v.6, p.849-854, 2001.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.22, p.1739–1746, 2002.

SUNDAR, S.; MURRAY, H.W. Effect of treatment with interferon-gamma alone in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.172, n.6, p.1627–1629, 1995.

TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines. **Ann. Rev. Biochem.**, v.53, 1984.

THAKUR, CP. Drug resistance in kala-azar: an overviews. In: Gupta S, Sood OP, editors. Proceedings of round table conference series.. New Delhi: Ranbaxy Science Foundation, n.5, p.27–33, 1999.

THAKUR, C.P.; KUMAR M.; PANDEY A.K. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.435–441, 1991.

THAKUR, C.P.; SINHA, G.P.; SHARMA, V.; PANDEY, A.K.; SINHA, P.K.; BARAT, D. Efficacy of amphotericin B in multi-drug resistant kala-azar in children in first decade of life. **Indian J. Pediatr.**, v.60, p.29–36, 1993.

TETI, D.; VISALLI, M.; McNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (pathophysiological conditions. **Journal of Chromatography B**, v.781, p.107-149, 2002.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M. Salivary gland lysates from sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v.239, p.1306-1308, 1988.

van STRIJP, J.A.G.; RUSSELL, D.G.; TOUMANEN, E.; BROWN, E.J.; WRIGHT, S.D. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, amb2, Mac-1). **J. Immunol.**, v.151, p.3324–3336, 1993.

VELEZ, I., AGUDELO, S., HENDRICKS, E., PUERTA, J., GROGL, M., MADABBER, L., BERMAN, J. Inefficacy of alluporinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. **Annual of Intern. Medicine**, v.12, p.232-236, 1997.

VIEIRA, J.B.F.; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.31, n.2, p.85-92, 1998.Suplemento.

WHO. Leishmania and HIV in gridlock. Geneva: World Health Organization, 1998. (WHO/CTD/Leish/98.9 add. 1, UNAIDS/98.23)