

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
SILVIA MOURA FRATA**

**ESTUDO DE PALADACICLOS CONTENDO LIGANTES  
BIFOSFÍNICOS COMO AGENTES LEISHMANICIDAS**

**Mogi das Cruzes, SP  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
SILVIA MOURA FRATA**

**ESTUDO DE PALADACICLOS CONTENDO LIGANTES  
BIFOSFÍNICOS COMO AGENTES LEISHMANICIDAS**

**Dissertação apresentada a Universidade  
Mogi das Cruzes como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia.  
Área de concentração: ciências exatas**

**Prof.<sup>o</sup> Orientador: Dr. Antonio Carlos Fávero Caires  
Prof.<sup>a</sup> Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Clara Lúcia Barbiéri Mestriner**

**Mogi das Cruzes, SP  
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Frata, Silvia Moura

Estudo de paladaciclos contendo ligantes bifosfínicos como agentes leishmanicidas / Silvia Moura Frata. – 2009.

66 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Exatas

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires

1. Paladaciclos 2. *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*) 3. Cisteína proteinase 4. Medicina experimental I. Caires, Antonio Carlos Fávero

CDD 619.93


ATAS

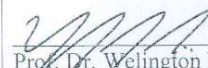
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

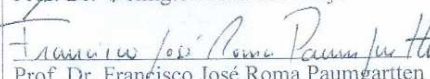
Às dez horas do dia vinte e cinco de novembro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "ESTUDO DE PALADACICLOS CONTENDO LIGANTES BIFOSFÍNICOS COMO AGENTES LEISHMANICIDAS" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Silvia Moura Frata**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Antonio Carlos Fávero Caires e Welington Luiz de Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Francisco José Roma Paumgarten da Fundação Oswaldo Cruz, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovada por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 25 de novembro de 2008.

Comissão Examinadora  
  
Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires

  
Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

  
Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Julgamento  
aprovada  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## **Agradecimentos**

A Deus e aos meus pais Angelo Frata e Josefa de Moura Frata, pelo apoio e amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires pela oportunidade concedida, pela orientação, confiança e participação em minha formação.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner pela oportunidade do aprendizado, orientação científica e convívio.

Ao Prof. Rodrigo Cunha pelo apoio nos experimentos de espectrofluorimetria e conhecimento transmitido.

Ao Fernando Real pelo apoio com as fotos das células.

Ao meu irmão Zaldson Moura Frata por confiar e acreditar em mim, por seu amor tão especial e amizade que são fundamentais em minha vida.

À amiga Simone Katz pelo companheirismo, paciência, amizade, atenção, aprendizado e apoio que foram tão especiais no momento em que precisei.

Às amigas Kelly Samarro, Kelly Sant Ana, Mariana Valente, Elaine Andrade, Carla Fittipaldi e Marília Carvalho pelo apoio, amizade, ombro amigo e por me ouvirem sempre com imensa paciência.

À amizade e companheirismo de Rodrigo Redoschi que me acompanhou e contribuiu por diversas vezes em meus experimentos.

Ao amigo Carlos Castilho pela companhia, apoio e disposição em estar sempre presente.

À minha família, em especial minha tia Iva Rolim, por estar sempre disposta a me ajudar. Seu apoio foi essencial.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

“... Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo, quem acredita sempre alcança...”  
(Renato Russo e Flávio Venturini)

## Resumo

Três complexos paladaciclos, SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1, foram testados quanto à atividade sobre a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Inicialmente esses compostos foram utilizados em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis*. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo método do MTT e Glucantime foi utilizado como controle positivo nessas culturas. Os complexos SF 1.1 e SF 1.2 foram muito tóxicos para os macrófagos devido à sua baixa hidrossolubilidade e às altas concentrações de dimetilsulfóxido necessárias para a sua total dissolução, inviabilizando a sua utilização nos ensaios com a *L. (L.) amazonensis*. Por outro lado, o complexo SE 1.1 apresentou um efeito leishmanicida de 85% e baixa toxicidade às culturas de macrófagos à concentração de 325 nM. Várias concentrações do SE 1.1 foram testadas *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis*. A infecção dos animais foi avaliada pela medida das lesões das patas e determinação da carga parasitária por diluição limitante. A administração de 42 µg do SE 1.1 por injeção subcutânea nas lesões durante um mês levou à redução de cerca de 90% da infecção. Estudos espectrofluorimétricos utilizando-se substratos específicos e lisados dos parasitas indicaram que o complexo paladacilo SE 1.1 inibe significativamente a atividade de cisteína proteinases dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Esses achados abriram perspectivas de explorar o mecanismo de ação leishmanicida do SE 1.1 que poderá levar à otimização do seu uso no tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: paladaciclos, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cisteína proteinase



## Abstract

The leishmanicidal activity of three palladacycle complexes, SF 1.1, SF 1.2 and SE 1.1, was tested on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. In a first screening these compounds were used in cultures of peritoneal macrophages isolated from BALB/c mice and infected *in vitro* with *L. (L.) amazonensis* amastigotes. The cytotoxicity of palladacycle complexes to macrophages was evaluated by the MTT assay and Glucantime was used in these cultures as a positive control. SF 1.1 and SF 1.2 were toxic to macrophages mainly due to their low solubility in aqueous solutions and to the high concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) necessary for their complete solubilization, impairing their use in *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages. In contrast, the SE 1.1 complex showed a leishmanicidal effect of 85% and a low toxicity to macrophage cultures at 325 nM. Several concentrations of SE 1.1 were tested *in vivo* in *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice. The animal infection was evaluated by measuring the foot lesion diameter and by determination of parasite burden by the limiting dilution method. A reduction of 90% in *L. (L.) amazonensis* infection was observed when infected mice were treated for 1 month with 42 µg of SE 1.1 by subcutaneous administration in foot lesions. Spectrofluorometric analysis by use of specific substrates and *L. (L.) amazonensis* amastigote lysates showed that SE 1.1 significantly inhibited the parasite cysteine proteinase activity. Overall, these findings open perspectives to elucidate the leishmanicidal mechanism of SE 1.1, thus improving its use for the treatment of leishmaniasis.

Key-words: palladacycle, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cysteine proteinase

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial das formas de leishmanioses.....	1
<b>Figura 2:</b> <i>Leishmania</i> spp. ....	2
<b>Figura 3:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	3
<b>Figura 4:</b> Representação Estrutural do paladaciclo iônicos SF 1.2 .....	8
<b>Figura 5:</b> Representação estrutural dos complexos paladaciclos SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1.....	12
<b>Figura 6:</b> Tratamento com o SE 1.1 de macrófagos peritoneais de camundongos infectados <i>in vitro</i> com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	23
<b>Figura 7:</b> Macrófagos peritoneais de camundongo infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados por 3 dias com Glucantime ou SE 1.1 .....	25
<b>Figura 8:</b> Atividade enzimática de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> avaliada com o substrato Z-FR-AMC em diferentes valores de pH .....	26
<b>Figura 9.</b> Atividade enzimática de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> avaliada com o substrato Z-FR-AMC.....	27
<b>Figura 10:</b> Efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade enzimática de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	28
<b>Figura 11:</b> Efeito de diferentes concentrações do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade enzimática de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	28
<b>Figura 12:</b> Lesões dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> 15 dias após o término do tratamento com o SE 1.1.....	29
<b>Figura 13:</b> Avaliação do tamanho das lesões dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com o SE 1.1.....	30
<b>Figura 14:</b> Avaliação da carga parasitária nas lesões da pata de camundongos BALB/c 15 dias após o término do tratamento com SE 1.1.....	31

<b>Figura 15:</b> Avaliação do tamanho das lesões dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com o SE 1.1 em diferentes concentrações.....	33
<b>Figura 16:</b> Lesões de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> 7 dias após o tratamento com diferentes doses do SE 1.1.....	34
<b>Figura 17:</b> Tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> com SE 1.1 em diferentes concentrações.....	35
<b>Figura 18.</b> Lesões de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> 30 dias após o tratamento com o SE 1.1.....	37
<b>Figura 19:</b> Tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> com SE 1.1 em diferentes concentrações.....	38

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Porcentagem de inibição do SF 1.1 sobre os amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	20
<b>Tabela 2:</b> Porcentagem de inibição do SF 1.2 sobre os amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	21
<b>Tabela 3:</b> Porcentagem de inibição do SE 1.1 sobre os amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	22
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de inibição do SE 1.1 sobre os amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e viabilidade dos macrófagos infectados e tratados avaliada pelo teste do MTT.....	24
<b>Tabela 5:</b> Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> avaliada pela diluição limitante 15 dias após o tratamento por 1 mês com 42 µg do SE 1.1....	32
<b>Tabela 6:</b> Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> avaliada pela diluição limitante 7 dias após o tratamento por 1 mês com várias doses do SE 1.1. ....	36
<b>Tabela 7:</b> Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> avaliada pela diluição limitante 30 dias após o tratamento por 1 mês com várias doses do SE 1.1.....	39
<b>Tabela 8:</b> Dosagem de uréia e bilirrubina total no soro de camundongos BALB/c infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com o SE 1.1 e Glucantime.....	40

## Lista de Abreviações e Siglas

CD	Cromatografia de massa
HE	coloração pela Hematoxilina-Eosina
dmpa	N,N-dimetil- 1 fenetilamina (que possui enantiômeros R <sub>(+)</sub> e S <sub>(-)</sub> )
DMSO	Dimetil sulfóxido
dppe	1,2 – etanobis (difenilfosfina)
dppf	1,1 – bis (difenilfosfina) ferroceno
IC	Concentração Inibitória
IF	Índice fagocítico
IV	Infravermelho
<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
LiCl	Cloreto de Lítio
MTT	(3-( 4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
qsp	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SE 1.2	[Pd <sub>2</sub> (C <sup>2</sup> ,N-S <sub>(-)</sub> dmpa)(μ-dppe)Cl <sub>2</sub> ]
SF 1.2	[Pd <sub>2</sub> (C <sup>2</sup> ,N-S <sub>(-)</sub> (dmpa) <sub>2</sub> (μ-dppf)Cl <sub>2</sub> ]
TMS	Tetrametilsilano

## Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos Gerais.....	9
3. Método.....	10
3.1 Síntese dos Compostos.....	10
3.2 Soluções.....	12
3.3. Animais para experimentação.....	13
3.4. Parasitas.....	13
3.5. Cultivo de macrófagos.....	13
3.6. Ensaio dos complexos paladacilos em culturas de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	14
3.7. Teste de citotoxicidade dos complexos paladacilos sobre os macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	14
3.8. Avaliação do efeito do complexo paladacilo SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinase de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	15
3.9. Efeito do complexo paladacilo SE 1.1 sobre as lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	16
3.10. Método da diluição limitante.....	17
3.11. Análises bioquímicas no soro dos animais infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados.....	17
3.12. Análise Estatística.....	18
4. Resultados.....	19
4.1. Avaliação do efeito dos complexos paladacilos SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1 sobre as culturas de macrófagos de camundongos infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	19
4.2. Efeito do complexo paladacilo SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinases de amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	26

<b>4.3. Avaliação do efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre as lesões cutâneas causadas pela <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>6. Conclusões e Sugestões.....</b>	<b>47</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Anexo – Parecer do Comitê de ética.....</b>	<b>53</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Aspectos gerais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das principais parasitoses mundiais, com ocorrência em 88 países de quatro continentes (figura 1), entre esses 72 em desenvolvimento. Estima-se que existam atualmente em torno de 12 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de 1,5-2 milhões novos casos por ano e um total de 350 milhões de pessoas sob risco de adquirir leishmaniose (WHO, 2004). As leishmanioses representam zoonoses silvestres ou concentradas em pequenas áreas rurais. Entretanto, as transformações ambientais provocadas por pressões econômicas e sociais, pelo processo migratório e pela urbanização crescente estão modificando esse perfil. Essas mudanças levam à expansão das áreas endêmicas e ao aparecimento de novos focos de infecção domiciliares e peridomiciliares.

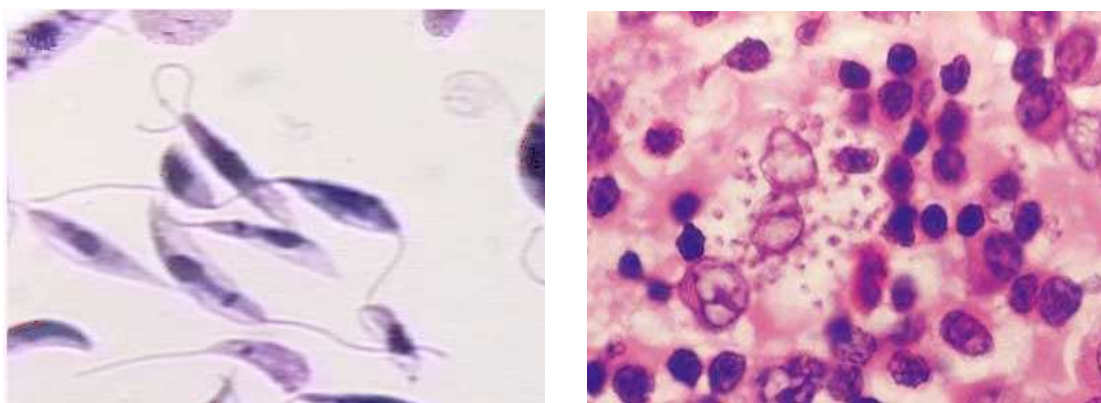


**Figura 1:** Distribuição mundial das formas de leishmanioses (HANDMAN, 2001).

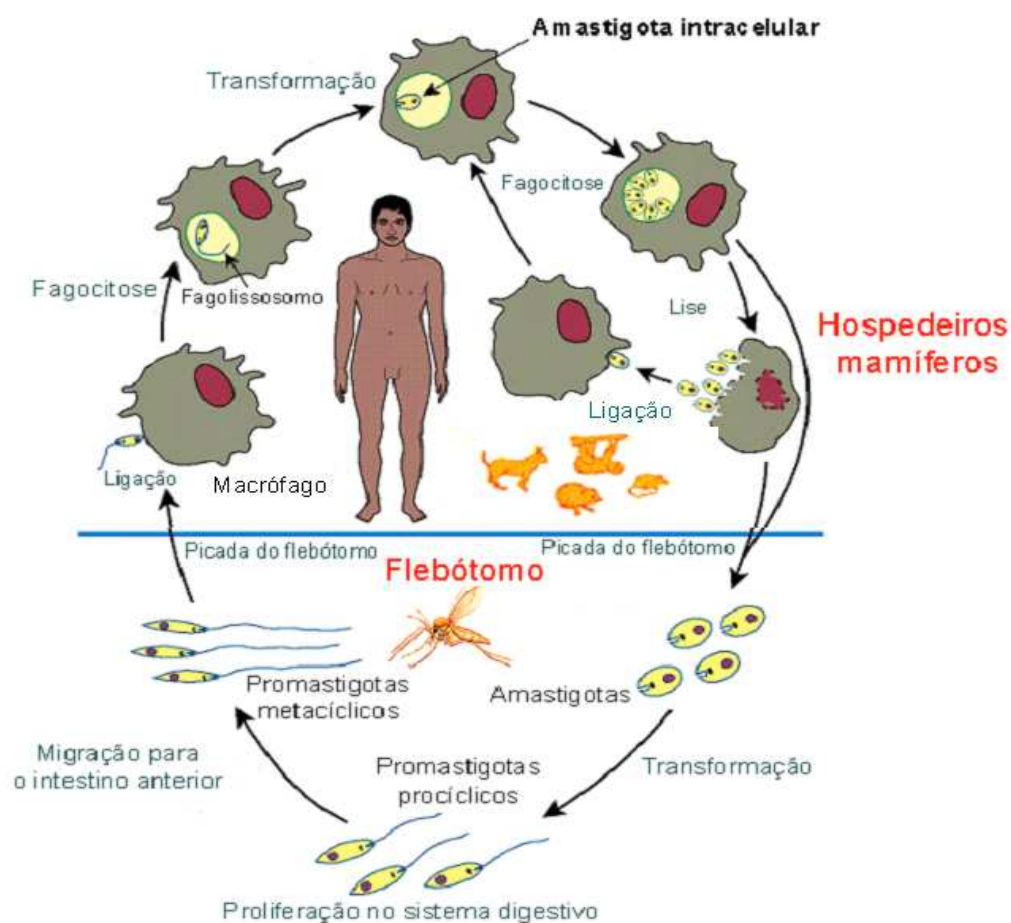
Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae, alternando o seu ciclo evolutivo entre um hospedeiro invertebrado representado por insetos dípteros da subfamília *Phlebotominae* (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomya* no



Novo Mundo) e vários hospedeiros mamíferos, inclusive o homem. No intestino do inseto vetor desenvolvem-se as formas alongadas, flageladas e móveis, denominadas promastigotas. Essas posteriormente se diferenciam em formas infectivas metacíclicas, que durante a picada do inseto vetor são inoculadas juntamente com a saliva na pele do hospedeiro vertebrado. Após serem fagocitadas por macrófagos, sofrem uma nova diferenciação para formas arredondadas, aflageladas e imóveis denominadas amastigotas. As formas promastigotas e amastigotas são apresentadas na Figura 2 e na Figura 3 está ilustrado o ciclo evolutivo de *Leishmania*.



**Figura 2:** *Leishmania* ssp. A - promastigotas e B - amastigotas (FONTE: [www.bioport.ro/Bioport/Leishmania.html](http://www.bioport.ro/Bioport/Leishmania.html))



**Figura 3:** Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Entre os hospedeiros mamíferos destacam-se o homem e os vários reservatórios das leishmanioses (HANDMAN, 2001).

As leishmanioses podem ser encontradas nas formas visceral, cutânea com lesões abertas e ulceradas, cutânea com lesões nodulares, cutâneo difusa e na forma mutilante mucocutânea (PEARSON e SOUSA, 1996). As manifestações clínicas e a severidade da leishmaniose dependem não somente da espécie de parasita que está infectando o hospedeiro como também da constituição genética e do estado imunitário do indivíduo, como por exemplo no caso de pacientes imunossuprimidos coinfectados com o vírus da AIDS (CUNNINGHAM, 2002; ROGERS *et al.*, 2002). As principais espécies de *Leishmania* que infectam o homem são: *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, causadoras da leishmaniose cutânea no norte da África, Oriente Médio, Índia e na Europa Mediterrânea. Nas Américas, podemos citar *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo as três

últimas as mais importantes no Brasil. A *L. (V.) braziliensis* também é o agente etiológico da leishmaniose mucocutânea no Brasil. A leishmaniose visceral é causada pela *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e pela *L. (L.) chagasi* na América do Sul, particularmente no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 1989; CUNNINGHAM, 2002; MELBY, 2002).

As formas amastigotas de *Leishmania* multiplicam-se obrigatoriamente dentro de macrófagos, confinados em um vacúolo parasitóforo. Experimentos utilizando marcadores endocíticos têm demonstrado que os fagossomos contendo *Leishmania* fundem-se com os lisossomos ou os endossomos tardios dos macrófagos para formar os vacúolos parasitóforos (CHANG e FONG, 1983; ALEXANDER e RUSSELL, 1992). No caso da infecção com a *L. (L.) amazonensis*, a fusão fagossomo-lisossomo é tão eficiente que é observada uma aparente depleção do compartimento lisossomal do macrófago (BARBIERI *et al.*, 1985). Estudos posteriores mostraram que o vacúolo parasitóforo contém várias hidrolases ácidas ativas, apresenta pH ácido e é limitado por uma membrana rica em proteínas dos compartimentos endocíticos tardios (ANTOINE *et al.*, 1990; PRINA *et al.*, 1990; ANTOINE *et al.*, 1991; LANG *et al.*, 1994). Os amastigotas de *Leishmania* são especialmente adaptados ao ambiente intracelular do vacúolo parasitóforo, demonstrando que eles são acidofílicos (BERMAN *et al.*, 1981; ANTOINE *et al.*, 1998). Essa adaptação provavelmente está ligada à presença de bombas de prótons envolvidas na captura e transporte de metabólitos cuja atividade ótima ocorre em pH ácido (ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994).

## 1.2. Tratamento das leishmanioses

As drogas mais efetivas utilizadas para o tratamento das leishmanioses cutânea e visceral são compostos de antimônio, utilizados há 60 anos, sendo eficazes em 80% dos pacientes. Os principais problemas do tratamento com antimoniais são a toxicidade, a administração parenteral e o fato de não apresentarem boa atividade em pacientes imunossuprimidos, como é o caso de pacientes coinfectados com o vírus da AIDS. Existem vários desafios ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses e um deles é a dificuldade de utilização de uma droga única. Isso se deve principalmente a três principais fatores: a) Os sítios de infecção visceral e cutâneo impõem diferentes mecanismos

farmacocinéticos; b) A existência de muitas espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, com características bioquímicas distintas, com grande probabilidade de apresentarem suscetibilidade diferente a uma determinada droga; c) A resistência aos compostos antimoniais observada em algumas regiões, a exemplo do Estado de Bihar na Índia. É importante lembrar ainda que os antimoniais não apresentam atividade leishmanicida eficaz em pacientes imunossuprimidos, como é o caso de pacientes coinfectados com o vírus da AIDS. Portanto, torna-se imperiosa a busca por drogas mais potentes para o tratamento das leishmanioses. Em um trabalho recente de revisão sobre o tratamento das leishmanioses são apresentados alguns compostos desenvolvidos e registrados em alguns países e outros que ainda estão à espera de testes clínicos para ambas as formas da doença (CROFT *et al.*, 2006).

A miltefosina, inicialmente desenvolvida como uma droga antitumoral é a mais recente a ser testada e constitui o primeiro tratamento oral efetivo para a leishmaniose visceral (LV) que deve entrar no mercado em breve (CROFT e COOMBS, 2003). A sua atividade contra *Leishmania* foi descoberta em meados da década de 1980 e sua eficácia foi comprovada em uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo*, tendo sido iniciados os testes clínicos na Índia em 2002. A miltefosina apresenta teratogenicidade e o longo tempo de exposição à droga pode induzir a resistência do parasita, o que limita muito a sua utilização. A paramomicina é outra droga que se encontra em testes clínicos (THAKUR *et al.*, 2000). Os ensaios estão em Fase III na Índia e África Oriental. Ela é efetiva no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea e apresenta grande variação de sensibilidade dependendo da espécie de *Leishmania*. A anfotericina B é hoje a segunda opção de tratamento da leishmaniose visceral quando não há resposta à terapia com antimonial. Originalmente desenvolvida como um antifúngico sistêmico mostrou uma grande eficiência no combate às leishmanioses. Possui a desvantagem de ser muito tóxica e, desse modo, deve ser cuidadosamente administrada (MEYERHOFF, 1999; ROBINSON e NAHATA, 1999). A sitamaquina, outra droga oral que possui ação contra a LV, é derivada de 8 aminoquinolinas e a sua atividade leishmanicida foi descrita em 1970. As Fases I e II de testes clínicos foram concluídas com razoável sucesso, demonstrando-se que 67% de pacientes com LV no Brasil e 92% na Índia foram curados quando tratados com sitamaquina em doses inferiores às utilizadas com os antimoniais (DIETZE *et al.*, 2001).

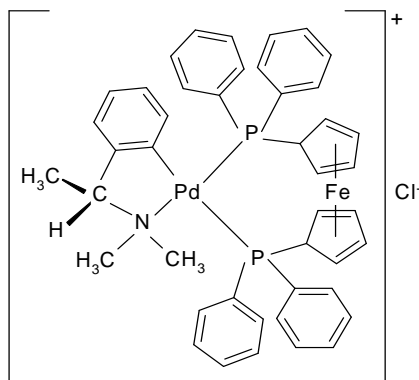
Embora existam várias opções de drogas para o tratamento das leishmanioses, nenhuma é efetiva na erradicação da doença, seja por limitações do próprio medicamento, seja devido ao custo elevado, alta toxicidade dos compostos ou mesmo pela resistência dos parasitas. Além disso, acredita-se que a cura das leishmanioses pela quimioterapia envolva também uma resposta imunológica protetora no hospedeiro na qual os macrófagos sejam induzidos a produzir reativos intermediários de nitrogênio e de oxigênio e seja efetiva nos mecanismos de sinalização de células CD4<sup>+</sup>. Assim, a síntese de algumas citocinas seria promovida com a conseqüente eliminação das formas amastigotas do interior de células infectadas (MURRAY *et al.*, 1989).

Nos últimos anos o estudo de enzimas de parasitas vem aumentando consideravelmente pelo fato de essas moléculas constituírem importantes fatores de virulência diretamente relacionados com a interação parasita-hospedeiro, representando alvos promissores para a imuno e quimioterapia (MCKERROW, 1989; DAS *et al.*, 2001; SAJID e MCKERROW, 2002). Entre os protozoários, as principais enzimas proteolíticas caracterizadas pertencem ao grupo das cisteína proteinases, sendo a maioria delas membros da superfamília da papaína. Essa superfamília, por sua vez, é subdividida em duas famílias, as das proteases do tipo catepsina e as do tipo calpaína. As proteases do tipo catepsina são ainda sub-divididas nas sub-famílias das catepsinas B e L. Essas guardam grandes semelhanças entre si e apresentam alguns motivos na seqüência de aminoácidos que as diferenciam. Em *Leishmania* há predominância de cisteína proteinases do tipo catepsina L que são expressas em grande quantidade nas formas amastigotas e estão localizadas preferencialmente em lisossomos diferenciados denominados megassomos. (PUPKIS *et al.*, 1986). Inibidores específicos de cisteína proteinases têm sido testados como drogas leishmanicidas. O tratamento *in vitro* e *in vivo* com um desses inibidores inibiu o crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*, assim como o desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c (SELZER *et al.*, 1999). A utilização de um inibidor irreversível com seletividade para cisteína proteinases do tipo catepsina L de *Leishmania* resultou em decréscimo significativo tanto do crescimento de promastigotas como da multiplicação de amastigotas em macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) major* (PONTE-SUCRE *et al.*, 2006).

### 1.3. Compostos organometálicos de paládio

O grupo de Pesquisas em Organometálicos, do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica da Universidade de Mogi das Cruzes, tem obtido inúmeros avanços na elucidação mecanicística e descrição de novas drogas organometálicas envolvendo compostos paladacilos, ativas no combate a células tumorais (RODRIGUES *et al.*, 2003)(CAIRES *et al.*, 2006). Em um primeiro trabalho dois compostos paladacilos obtidos pela reação de sais de paládio com dois derivados do N, N-dimetil-1-fenetilamina (DMPA), fenil-2-piridinil-acetileno e 1-fenil-3-N,N-dimetilamino-propino, respectivamente, foram complexados ao ligante 1,2-etanobis (difenilfosfina) (SE) para sintetizar complexos paladacilos que foram muito ativos no combate a linhagens de melanoma (RODRIGUES *et al.*, 2003). Nesse estudo, o complexo  $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-S}_{(-)}\text{dmpa})(\mu\text{-dppe})\text{Cl}_2]$ , foi o que apresentou maior atividade *in vivo*, inibindo o crescimento tumoral e prolongando a sobrevivência dos animais, mostrando a estereoespecificidade da droga. Em um outro trabalho foram descritas importantes propriedades biológicas de paladacilos quirais derivados da N,N-dimetil-1-fenetilamina e do ligante de coordenação 1,1'-bis(difenilfosfina) ferroceno (BINCOLETTO *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o complexo enantiômero de paládio  $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-S}_{(-)}\text{dmpa})_2(\mu\text{-dppf})\text{Cl}_2]$  (SF 1.1) é inibidor reversível da atividade da cathepsina B e possui também propriedades antimetastáticas. Todo o conjunto de informações sobre os compostos e suas propriedades de combate ao câncer foi reunido em um extenso trabalho de patente internacional (CAIRES *et al.*, 2006).

Entre os avanços alcançados pela pesquisa com os organometálicos, o mais significativo até o momento foi a demonstração de que o paladacilo iônico mononucleado SF 1.2,  $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-S}_{(-)}\text{dmpa})(\text{dppf})\text{Cl}]$ , mostrado na Figura 4, possui ação biológica sobre os lisossomos da linhagem tumoral K562 (BARBOSA *et al.*, 2006). Os resultados apresentados nesse trabalho fortemente sugeriram que o paladacilo mencionado é permeável à membrana lisossomal e ao penetrar nos lisossomos dessas células causa a ruptura dos mesmos promovendo a liberação de enzimas, especialmente a cathepsina B que atuaria como mediadora da apoptose dessas células.



**Figura 4:** Representação estrutural do paladacilo iônico C2,N- *S*(-) N,N-dimetil-1-fenilamina,1,1'-bisdifenilfosfina-ferroceno paládio (II) (SF 1.2).

As drogas lisossomotrópicas são atualmente consideradas tecnologia de ponta para o desenvolvimento de fármacos para quimioterapia (KROEMER e JAATTELA, 2005). O racional deste projeto foi fundamentado na propriedade lisossomotrópica do complexo paladacilo SF 1.2 e na natureza fagolisossomal dos vacúolos parasitóforos que abrigam as formas amastigotas de *Leishmania* nos hospedeiros mamíferos. Assim, a proposta do trabalho foi a avaliação da atividade leishmanicida de compostos paladacilos contendo o agente de ciclometalação N,N-dimetil-1-fenilamina (dmpa) e os ligantes bifosfínicos 1,1'-bis(difenilfosfina) ferroceno (*ddpf*) e 1,2-etanobis-(difenilfosfina) (*dppe*).

Considerando-se o contexto atual do tratamento das leishmanioses aliado à inexistência de medidas profiláticas de ordem geral, principalmente contra as leishmanioses cutâneas que têm levado ao aumento significativo da incidência dessas parasitoses, a busca de novos compostos com propriedade leishmanicida é de grande relevância.

## 2. Objetivos Gerais

Considerando-se a natureza fagolisossomal dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos infectados com *Leishmania* nos hospedeiros mamíferos e a propriedade lisossomotrópica de alguns complexos organometálicos de paládio, assim como a sua atividade inibitória de cisteína proteinases, os principais objetivos deste trabalho foram:

- ✓ A avaliação da atividade leishmanicida de três complexos paladacilos, SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1, em comparação com o Glucantime, sobre os amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* com a *L. (L.) amazonensis*
- ✓ Selecionar entre os compostos paladacilos estudados, o que apresente melhor resultado nos ensaios preliminares
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* do composto SE 1.1
- ✓ Estudo do efeito do complexo paladacilo SE 1.1 sobre a atividade enzimática de cisteína proteinases de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*
- ✓ Avaliação da atividade leishmanicida do SE 1.1 em camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis*
- ✓ Avaliação do efeito citotóxico *in vivo* do complexo SE 1.1



## 3. Método

### 3.1. Síntese dos compostos paladacilos

O trabalho foi conduzido empregando-se técnicas de Schlenk (WIKIPEDIA, 2008) para a manipulação de reagentes e produtos de reação em atmosfera livre da presença de oxigênio e umidade. Para a síntese dos ligantes e dos paladacilos deverá ser empregada uma linha de vácuo-argônio e um conjunto de recipientes, juntas e conexões em vidro, intercambiáveis, permitido que operações como manipulação, reação, filtração, destilação e secagem de materiais fossem feitas em atmosfera totalmente inerte.

Reagentes como cloreto de paládio e as bifosfinas dppf e dppe, bem como o agente de ciclometalação dmpa, possuíam grau de pureza P.A. e foram ser adquiridos da Aldrich Chemical Co. Estes compostos foram utilizados sem nenhuma purificação prévia.

#### Síntese dos compostos

Os complexos de paládio de partida, com métodos de síntese anteriormente desenvolvidos (RODRIGUES *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2006), foram sintetizados por reações estequiométricas dos isômeros R(+) e S(-) da *N,N*-dimetil-1-fenetilamina, (*dmpa*), com  $\text{Li}_2\text{PdCl}_4$ , obtido por dissolução de  $\text{PdCl}_2$  em metanol na presença de quantidades estequiométricas de  $\text{LiCl}$ . As reações foram realizadas em atmosfera inerte e os produtos purificados por técnicas de filtração, extração com solvente e recristalização.

#### Reações dos paladacilos com as bifosfinas

Reações de quebra dos ciclopaladados de natureza dimérica foram realizadas com a bifosfina dppf em diferentes proporções estequiométricas.

#### Caracterização dos Compostos

Os compostos, ligantes e complexos, foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV, CD, RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, e  $^{31}\text{P}$ ) e análise elementar (C, H, N).

A espectroscopia vibracional na região do IV empregou faixas de comprimento de onda de  $4.000\text{-}250\text{cm}^{-1}$  e resoluções de  $4,0\text{-}1,0\text{cm}^{-1}$  para a análise das amostras. Foram

empregadas principalmente as técnicas de filme líquido e de estado sólido, com a utilização de janelas de brometo de potássio e iodeto de céσιο.

Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  e  $^1\text{H}$ , foram medidos em um equipamento multinuclear “*BRUKER*” mod. AC-200, utilizando-se solventes deuterados para a dissolução das amostras e TMS como padrão de referência interno nos espectros de  $^1\text{H}$ . Para os espectros de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  foi utilizado  $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{P}$  como referência externa. As frequências de 81 MHz, 50 MHz e 200 MHz, foram empregadas nos experimentos respectivamente. Estes experimentos, bem como as análises centesimais de C,H,N foram feitas utilizando-se serviço de terceiros e serão solicitadas a Central Analítica da Universidade de São Paulo-USP-SP.

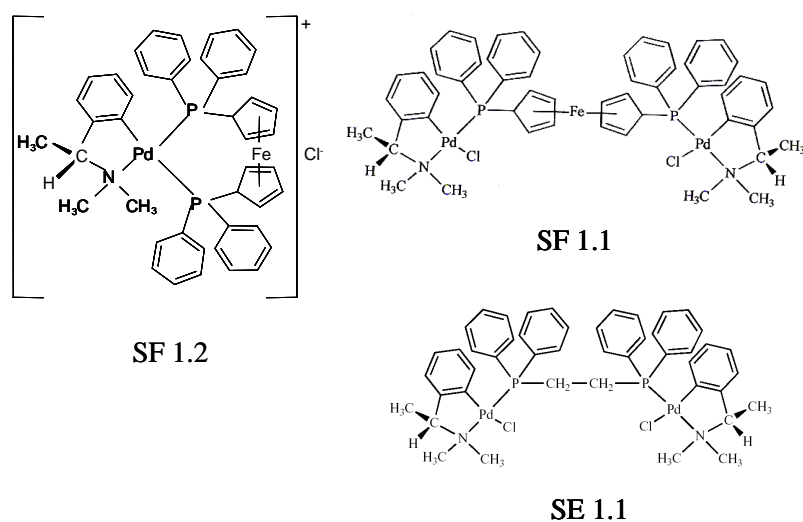
A determinação dos Pontos de Fusão dos complexos obtidos foi realizada, utilizando-se um medidor de fusão Buchi-mod. B-540 e os ensaios de Condutividade elétrica foram realizados com o auxílio do Condutômetro Metrohm 712.

Em casos eventuais a estrutura molecular de algumas amostras sólidas que poderiam ser isoladas na forma cristalina foi determinada pela técnica de difração de raios-X. Essa técnica foi desenvolvida em colaboração com pesquisadores do Grupo de Cristalografia do IFQ-USP (São Carlos).

Os complexos paladaciclos utilizados no presente trabalho foram:

Bis[(monocloro)(dimetil-1-fenetilamina-2-C,N)Paládio(II)]- $\mu$ -[1,2-bis(difenilfosfina)etano] SE 1.1,  
 Bis[(monocloro)(dimetil-1-fenetilamina-2-C,N)Paládio(II)]- $\mu$ -[1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno] SF 1.1 e  
 Cloretode{[dimetil-1-fenetilamina-2-C,N][P,P-bis(difenilfosfina)ferroceno]}Paládio(II) SF 1.2.

A fórmula estrutural desses compostos está representada abaixo.



**Figura 5:** Representação estrutural dos complexos paladacíclos SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1.

### 3.2. Soluções e meios de cultivo

O meio utilizado para o cultivo dos macrófagos peritoneais de camundongos foi o RPMI (Gibco) que é preparado pela adição de 10,4 g do meio, 2 g de NaHCO<sub>3</sub>, 2,383 g do tampão Hepes para o preparo de 1 litro, pH 7,2-7,4. O meio é filtrado em membranas de 0,22 μm e na hora do uso acrescentam-se para 100 ml do meio 40mg de gentamicina, 1 ml de penicilina 100 U/ml, 1 ml de streptomicina 100 mg/ml, 1 ml de glutamina 0,2 M e 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado por 1 hora a 56°C. O meio utilizado para a diferenciação dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e o crescimento dos promastigotas nos experimentos de diluição limitante é o 199 (Gibco) acrescido de glutamina, penicilina, streptomicina e SFB nas mesmas concentrações utilizadas no RPMI.

As soluções rotineiramente utilizadas foram: PBS (76 g de NaCl, 2,4 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 11,36 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por litro), pH 7,2-7,4; solução de cristal de violeta: 1 mg do cristal de violeta em ácido acético 30%, pH 6,0; tampão universal: Tris-HCl 75 mM, glicina 25 mM, MES 25 mM e ácido acético 25 mM, pH 6,0.

### **3.3. Animais para experimentação**

Camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas de idade foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo. Hamsters Golden de ambos os sexos com 6-10 semanas de idade foram adquiridos do biotério da Universidade de Campinas, São Paulo. Esses animais foram criados em condições livres de patógenos específicos e alimentados com ração comercial e água a vontade.

O projeto foi analisado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em animais da Universidade de Mogi das Cruzes, tendo recebido parecer favorável com a Aprovação nº.036/2007.

### **3.4. Parasitas**

As formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* são isoladas de lesão de pata de hamsters previamente infectados ( $4 \times 10^7$  parasitas/pata). Os granulomas obtidos após 4-8 semanas de infecção são retirados e recortados com bisturi, colocados em meio RPMI 1640 e centrifugados a  $250 \times g$  por 10 min. No sobrenadante obtido é avaliado o número de amastigotas por contagem em câmara de Neubauer. Os amastigotas são utilizados para a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e infecção do coxim plantar da pata traseira de camundongos BALB/c para os ensaios *in vivo*. Para os ensaios *in vivo* os camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente em uma das patas traseiras com  $1 \times 10^7$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

### **3.5. Cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo**

As culturas de macrófagos foram feitas após a obtenção das células do peritônio de camundongos BALB/c. Injetou-se cerca de 2 ml de PBS estéril no peritônio de cada animal e após a lavagem e coleta o “pool” de células peritoneais foi diluído em solução de cristal violeta 1 mg/ml em ácido acético 30% para a contagem diferencial de células. O

correspondente a  $7 \times 10^5$  macrófagos foi colocado sobre lamínula de vidro (13 mm de diâmetro) contida em placa de 24 poços. As lamínulas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, lavadas com PBS para a retirada de células não aderentes e mantidas em meio RPMI (Gibco) com soro fetal bovino a 10% em estufa Shellab modelo IR2424, a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>/95% ar úmido. Os amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram utilizados para a infecção das culturas de macrófagos na proporção 3:1 (parasita:célula) e mantidos a 37°C em estufa com 5 de CO<sub>2</sub>/95% ar úmido. Após 1-2 dias de infecção as lamínulas foram lavadas e as drogas foram adicionadas.

### **3.6. Ensaio dos complexos paladaciclos em culturas de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis***

Os ensaios das drogas nas culturas de macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis* foram feitos adicionando-se as drogas, em várias concentrações, às lamínulas dos macrófagos após 24 horas de infecção, mantendo-se as culturas durante 3 dias em contato com as mesmas. Após o tratamento, as lamínulas foram fixadas durante 10 minutos com metanol e coradas por 20 minutos com o corante Giemsa (Amersham). Após a secagem, as lamínulas foram montadas com Entelan (Amersham) em lâminas de vidro e visualizadas ao microscópio óptico Nikon modelo YS100, com aumento de 1.000 vezes.

A infecção é expressa pelo índice fagocítico (IF) que é calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de amastigotas por macrófago, sendo contados no mínimo 200 macrófagos por lamínula em triplicatas.

### **3.7. Teste de citotoxicidade dos complexos paladaciclos sobre os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis***

A citotoxicidade dos complexos paladaciclos para os macrófagos infectados e tratados foi avaliada segundo o protocolo descrito em 2005 (DUTTA *et al.*, 2005). Após o tratamento

com as drogas, as culturas de macrófagos infectados foram incubadas com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltretazólio (MTT) 0,5 mg/ml durante 4 horas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após esse período o meio de cultura contendo o MTT foi retirado, acrescentando-se 200 µl de dimetilsulfóxido para a solubilização total do formazan, o produto colorido resultante da clivagem do MTT catalisada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (sendo essa conversão realizada somente pelas células viáveis) (MOSMANN, 1983). Após a solubilização, todo o volume foi transferido para placa de 96 cavidades para a leitura da absorbância a 540 nm em microleitor de ELISA (Multiskan Plate Reader – Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia). A porcentagem da viabilidade celular é calculada dividindo-se a absorbância das culturas de macrófagos tratadas com os complexos paladaciclos pela absorbância das culturas sem tratamento, multiplicando-se o valor obtido por 100.

### **3.8. Avaliação do efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinase de amastigotas de *L. (L.) amazonensis***

Após o isolamento dos parasitas das lesões de patas de hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis* como descrito no item 3.3,  $5 \times 10^8$  amastigotas foram centrifugados a 2.500 rpm por 5 minutos, as células foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% contendo Triton X-100 0,1% e rompidas por ultrassom. Os ensaios enzimáticos foram feitos em volume final de 1 ml utilizando-se 0,5 µl do lisado dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, 2 µl do substrato 7-amino-4-metilcumarina, N-CBZ-L-fenilalanil-L-arginina amida (Z-FR-AMC) 5 mM, 0,5 µl do glucantime ou SE 1.1 10 mM, 2 µl do E-64 2,8 mM e o tampão universal para completar 1 ml. As reações foram realizadas à temperatura de 36°C em espectrofluorímetro Hitachi modelo F2500. Esses ensaios foram também realizados na presença de DTT 2 mM, o agente redutor mais classicamente utilizado para ativação de cisteína proteinases. A atividade enzimática foi expressa como atividade específica, multiplicando-se a hidrólise do substrato em µM por minuto pela concentração total de proteína do extrato celular utilizado nos ensaios. A dosagem de proteínas dos lisados dos parasitas foi feita pelo Coomassie Blue (Bio Rad Protein),

utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão e realizando-se a leitura em microleitor de ELISA a 620 nm.

A determinação dos valores de IC<sub>50</sub>, a dose do complexo paladaciclo SE 1.1 que inibiu 50% da atividade proteolítica dos extratos de amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, foi realizada utilizando-se pelo menos seis concentrações diferentes desse complexo nas condições ótimas de atividade enzimática. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados utilizando o programa Grafit (v.5.0.11) de acordo com a equação representada abaixo.

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s}$$

Nessa equação  $y$  é a porcentagem de atividade enzimática remanescente,  $x$  é a concentração de inibidor utilizada e  $s$  é um fator de correção que assume que  $y$  decresce com o aumento dos valores de  $x$ .

### **3.9. Efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre as lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis***

Nesses experimentos foram utilizados fêmeas de camundongos BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas. Os animais foram infectados no coxim plantar traseiro direito com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* recém-isolados de lesões cutâneas de hamsters. Após 15 dias da infecção os camundongos foram separados em grupos e iniciou-se o tratamento. No primeiro experimento *in vivo* 2 grupos (de 6 animais cada um) foram utilizados, o controle que recebeu PBS e o tratado com o 42 µg do SE 1.1. Todos os animais foram tratados por meio de injeção local subcutânea durante 3 dias consecutivos e após 3 vezes por semana durante 1 mês. Durante o tratamento as lesões das patas eram medidas por paquímetro digital de 3 em 3 dias. Após 15 dias do término do tratamento os animais foram sacrificados e as lesões isoladas, procedendo-se à contagem dos amastigotas em câmara de Neubauer.

O outro esquema de tratamento *in vivo* foi iniciado também 15 dias após a infecção, dividindo-se os animais em 6 grupos, com 6 animais por grupo: um grupo recebeu PBS (controle), outro glucantime na dose total de 20 mg e os 3 grupos receberam o SE 1.1 foram denominados SE 1.1 10X, SE 1.1 20X e SE 1.1 30X, correspondente a um aumento de 10, 20 e 30 vezes, respectivamente, da dose utilizada no tratamento dos macrófagos infectados *in vitro* capaz de destruir 85% dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (325 nM). Todos os grupos foram tratados por injeção subcutânea nas lesões. Os animais receberam uma dose diária por 3 dias consecutivos e após 3 vezes por semana durante 1 mês, totalizando 21, 42 e 63 µg do SE 1.1. O desenvolvimento das lesões foi monitorado pela sua medida com um paquímetro digital (Digimed) e após 30 dias de tratamento foi coletado o sangue dos animais para ensaios bioquímicos e em seguida eles foram sacrificados, procedendo-se á avaliação da carga parasitária a partir das lesões das patas pelo método da diluição limitante, descrito a seguir.

### **3.10. Método da diluição limitante**

Esse método é baseado naquele descrito em 1985 (TITUS *et al.*, 1985). Os animais foram sacrificados após o término do tratamento e as lesões foram retiradas, recortadas com bisturi e realizada a raspagem para a obtenção dos amastigotas. Esses foram mantidos em meio 199 (Gibco) contendo bicarbonato de sódio 4,2 mM, HEPES 40 mM, adenina 1,0 mM, hemina 5 µg/ml e 10% de SFB. Foram realizadas diluições seriadas em placas de 96 cavidades. Após 5 dias de incubação a 25°C as placas foram observadas em microscópio invertido (com aumento de 40x) quanto à presença de promastigotas móveis. O número de parasitas foi determinado pela maior diluição na qual foram observados promastigotas.

### **3.11. Análises bioquímicas no soro dos animais infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados**



As análises bioquímicas foram realizadas utilizando-se o soro dos camundongos após o término do tratamento. O sangue dos camundongos foi coletado por punção ocular, separando-se em seguida o soro por centrifugação. As dosagens de uréia e bilirrubina foram realizadas utilizando-se kits comerciais (Dole's Reagentes).

### **3.12. Análise estatística**

Para avaliar a significância dos resultados foi feita a análise estatística de todos os experimentos pelos testes ANOVA disponíveis no programa GraphPad Prism versão 5.01.

## 4. Resultados

### 4.1. Avaliação do efeito dos complexos paladacilos SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1 sobre as culturas de macrófagos de camundongos infectados com a *L. (L.) amazonensis*

Os complexos paladacilos SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1 foram testados em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados *in vitro* com a *L. (L.) amazonensis*. Os resultados desses ensaios são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3. É possível observar que o DMSO, nas concentrações necessárias para a solubilização do SF 1.1 e SF 1.2, interfere nos ensaios com esses compostos devido à sua própria ação leishmanicida e citotóxica (Tabelas 1 e 2). Quanto aos resultados obtidos com os paladacilos, foi demonstrado que à concentração de 10  $\mu\text{M}$  o SF 1.1 apresentou a maior porcentagem de inibição do crescimento dos amastigotas intracelulares (95%), tendo sido observada, porém, a deformação dos macrófagos nessas culturas, assim como naquelas mantidas na concentração correspondente do DMSO (2,5%). Resultados semelhantes foram obtidos pelo tratamento com o SF 1.2. Como é possível observar na Tabela 2, a máxima concentração desse composto que não exerceu efeito citotóxico sobre os macrófagos foi 5  $\mu\text{M}$ . Nessa concentração, porém, o SF 1.2 apresentou baixa porcentagem de destruição dos amastigotas intracelulares (12% descontada a porcentagem de 20% relativa ao efeito inibidor do DMSO a 1,25%). O SE 1.1 foi o mais solúvel em DMSO, sendo necessário utilizar o solvente à concentração final máxima de 0,04% para os ensaios com esse composto. Por outro lado, o SE 1.1 apresentou significativo efeito citotóxico sobre os macrófagos em concentrações mais baixas do que o SF 1.1 e o SF 1.2 (425 nM e 500 nM), exercendo, porém, atividade leishmanicida muito mais eficaz em concentrações significativamente mais baixas do que as observadas com o SF 1.1 e o SF 1.2 (Tabela 3).

**Tabela 1:** Porcentagem de inibição do SF 1.1 sobre os amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*

TRATAMENTO	ÍNDICE FAGOCÍTICO	% DE INIBIÇÃO
Controle	228	—
DMSO 0,625%	214	6
SF 1.1 2,5 $\mu$ M	168,5	26
DMSO 1,25%	171	25
SF 1.1 5 $\mu$ M	130	43
DMSO 2,5%	155**	32
SF 1.1 10 $\mu$ M	12**	95
DMSO 5%	129**	43
SF 1.1 20 $\mu$ M	0*	—

\*Destruição dos macrófagos

\*\* Macrófagos arredondados e com citoplasma muito tênue

**Tabela 2:** Porcentagem de inibição do SF 1.2 sobre os amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*

TRATAMENTO	ÍNDICE FAGOCÍTICO	% DE INIBIÇÃO
Controle	162	—
DMSO 0,625%	153	5,5
SF 1.2 2,5 $\mu$ M	130	20
DMSO 1,25%	130	20
SF 1.2 5 $\mu$ M	110	32
DMSO 2,5%	109**	33
SF 1.2 10 $\mu$ M	95**	41
DMSO 5%	91**	44
SF 1.2 20 $\mu$ M	6*	96

\*Destruição dos macrófagos

\*\* Macrófagos arredondados e com citoplasma muito tênue

**Tabela 3:** Porcentagem de inibição do SE 1.1 sobre os amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*

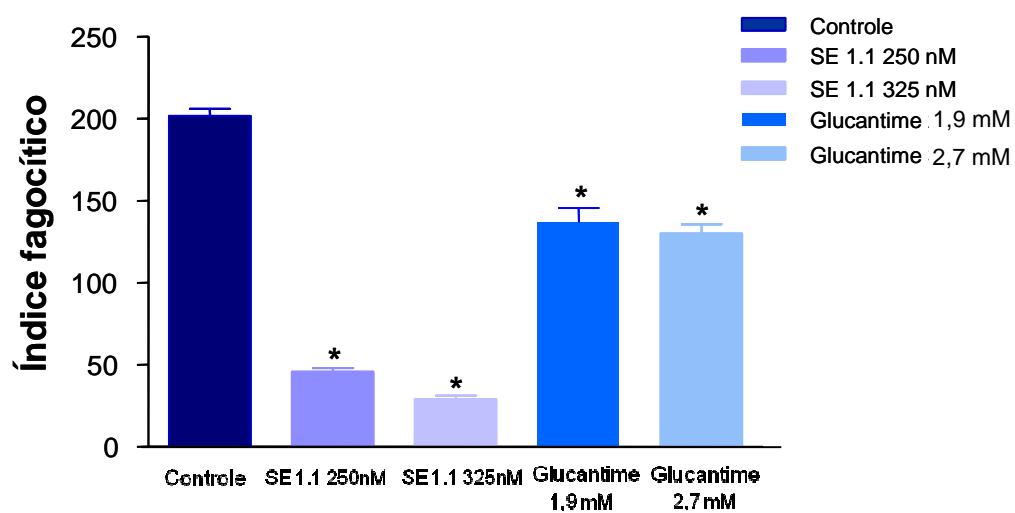
TRATAMENTO	ÍNDICE FAGOCÍTICO	% DE INIBIÇÃO
Controle	197	—
DMSO 0,04%	195	1
SE 1.1 125 nM	100	49
SE 1.1 225 nM	57	71
SE 1.1 250 nM	45	77
SE 1.1 275 nM	41	79
SE 1.1 325 nM	29	85
SE 1.1 425 nM	14**	93
SE 1.1 500 nM	0*	—

\*Destruição dos macrófagos

\*\* Macrófagos arredondados e com citoplasma muito tênue

Embora à concentração de 425 nM o SE 1.1 apresentou alta porcentagem de destruição dos amastigotas intracelulares, a morfologia de parte dos macrófagos tratados estava alterada. Assim, na continuidade do trabalho o SE 1.1 foi utilizado à concentração de 325 nM que, como previamente demonstrado, destruiu 85% dos parasitas e não induziu alteração aparente nos macrófagos. Nos experimentos posteriores *in vitro* duas concentrações do SE 1.1 foram utilizadas, 250 e 325 nM, comparando-se a ação leishmanicida desse complexo paladaciclo com a do glucantime após 3 dias de tratamento. Além disso, foram realizados os testes de citotoxicidade nas culturas dos macrófagos pelo método do MTT. Os resultados desses experimentos são mostrados na Figura 6. Na Tabela 4 estão representados os resultados da citotoxicidade do SE 1.1. Como pode ser observado, a ação leishmanicida do SE 1.1 nas duas concentrações utilizadas foi significativamente maior que a do glucantime (Figura 6 e Tabela

4). Além disso, o SE 1.1 não foi tóxico aos macrófagos, enquanto que o glucantime levou a um pequeno, porém significativo efeito citotóxico (Tabela 4).



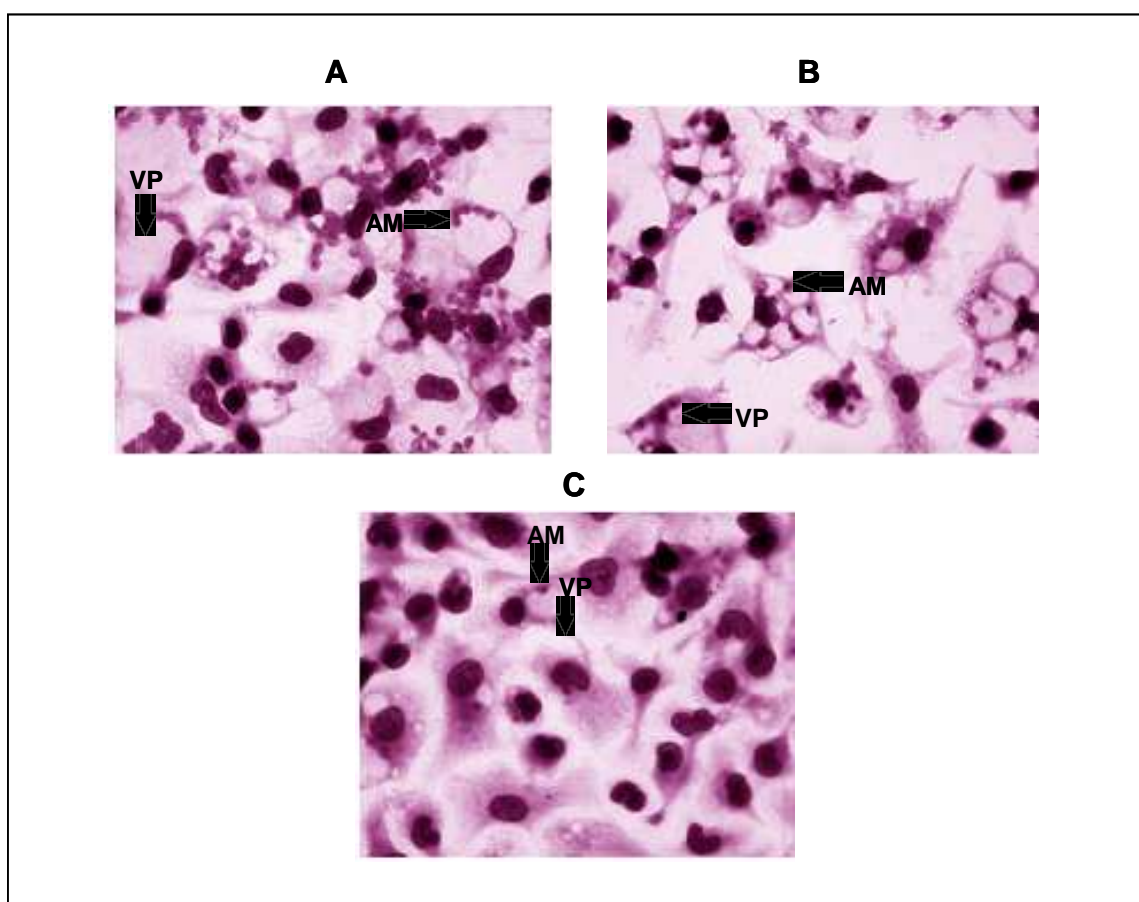
**Figura 6:** Tratamento com o SE 1.1 de macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis*.  $P < 0,001$

**Tabela 4:** Porcentagem de inibição do SE 1.1 sobre os amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e viabilidade dos macrófagos infectados e tratados avaliada pelo teste do MTT

TRATAMENTO	IF	% de Inibição	Absorbância (540 nm)	% de Viabilidade
Controle	200	—	0,225	100
SE 1.1 250 nM	45	77*	0,221	98
SE 1.1 325 nM	29	85*	0,212	96
Glucantime 1,9 mM	130	35*	0,190	84*
Glucantime 2,7 mM	140	30*	0,180	82*

P<0,001 em relação ao controle

Os resultados desses experimentos são também ilustrados na Figura 7. Pode-se observar que o tratamento com o SE 1.1 levou à cura da infecção dos macrófagos, com o conseqüente desaparecimento do vacúolo parasitóforo e o espraçamento normal dos macrófagos (Figura 7C). O tratamento com o glucantime resultou na redução do vacúolo parasitóforo e destruição dos amastigotas, porém em grau significativamente menor do que nos macrófagos tratados com o SE 1.1 (Figura 7B)

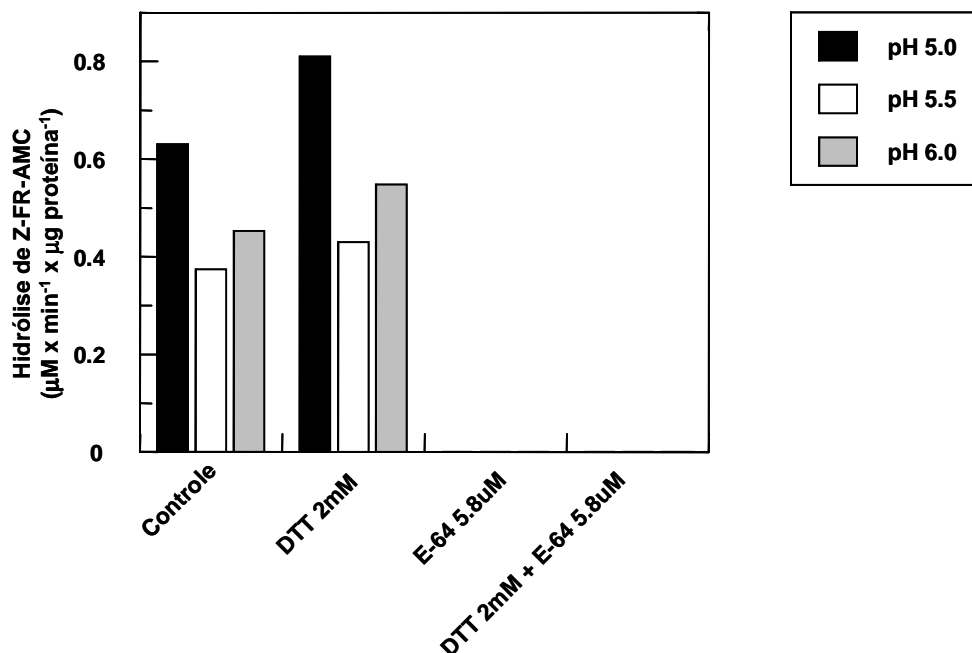


**Figura 7:** Macrófagos peritoneais de camundongo infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados por 3 dias com Glucantime 2,7 mM (B) ou SE 1.1 325 nM (C). A - Controle sem tratamento. VP - vacúolo parasitóforo; AM - amastigota.

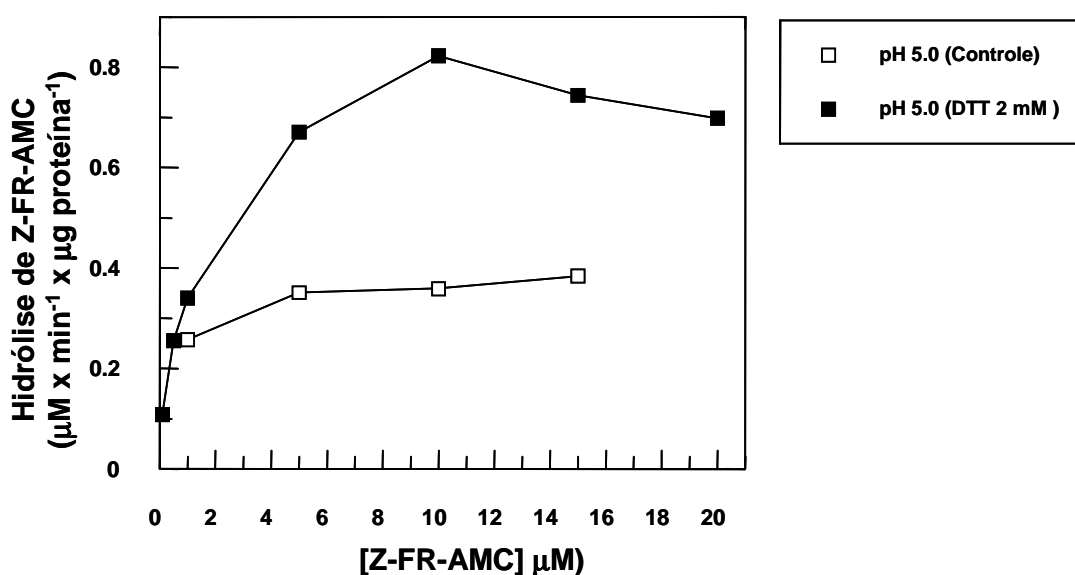


#### 4.2. Efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinases de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A atividade de cisteína proteinases foi avaliada em lisados de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* utilizando como substrato o Z-FR-AMC, específico para serino proteinases e cisteína proteinases do tipo catepsina. Inicialmente foi padronizada a reação para a detecção dessas enzimas, testando-se a hidrólise do Z-FR-AMC em diferentes valores de pH e em presença de DTT ou E-64, ativador e inibidor, respectivamente, de cisteína proteinases. Foi também avaliada a concentração saturante do substrato a ser utilizada nos experimentos de atividade enzimática. Os resultados desses ensaios estão representados nas Figuras 8 e 9. O máximo de atividade em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi observado na presença de DTT e a pH 5,0, enquanto que essa atividade foi totalmente inibida pelo E-64 (Figura 8). A concentração saturante do substrato é de 10 a 20  $\mu\text{M}$  e nos ensaios posteriores de atividade de cisteína proteinases o Z-FR-AMC foi utilizado à concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

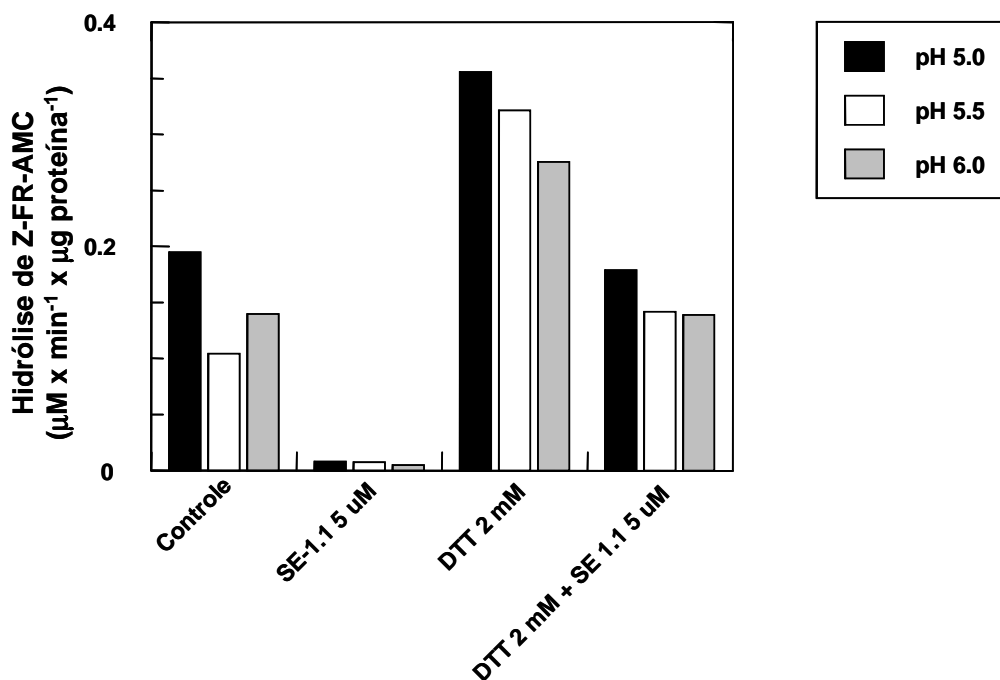


**Figura 8:** Atividade enzimática de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* avaliada com o substrato Z-FR-AMC em diferentes valores de pH e na presença e ausência de DTT e E-64.

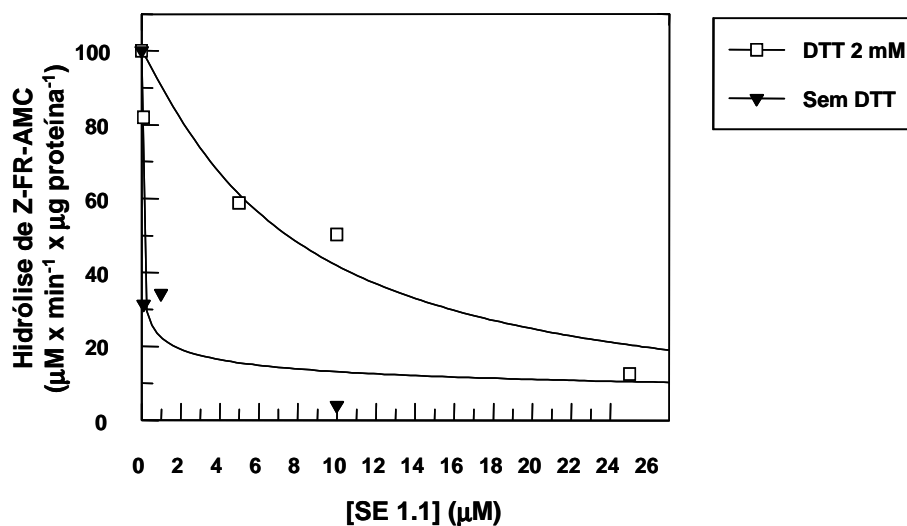


**Figura 9:** Atividade enzimática de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* avaliada com o substrato Z-FR-AMC em diferentes concentrações e na presença e ausência de DTT.

Uma vez padronizadas as condições ótimas da atividade de cisteína proteinases de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foi avaliado o efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre essa atividade. Como é possível observar na Figura 10, o SE 1.1 inibiu fortemente a hidrólise do Z-FR-AMC e essa inibição foi significativa mesmo na presença de DTT (cerca de 50%). Esses resultados levaram-nos a testar o efeito de diferentes concentrações do SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinases de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* para a determinação do  $\text{IC}_{50}$  do SE 1.1. Esses valores foram de  $7,47 \mu\text{M}$  na presença do DTT e de  $12,7 \text{ nM}$  na ausência do redutor (Figura 11).



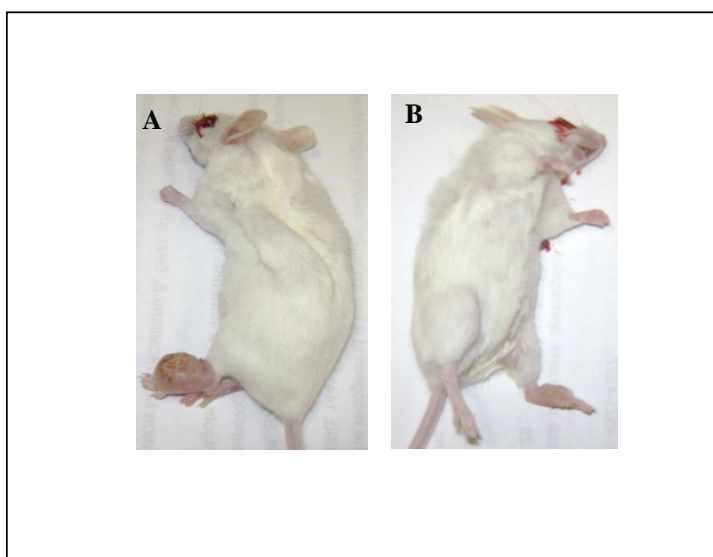
**Figura 10:** Efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade enzimática de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* avaliada com o substrato Z-FR-AMC na presença e ausência de DTT.



**Figura 11:** Efeito de diferentes concentrações do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre a atividade enzimática de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* avaliada com o substrato Z-FR-AMC na presença e ausência de DTT.

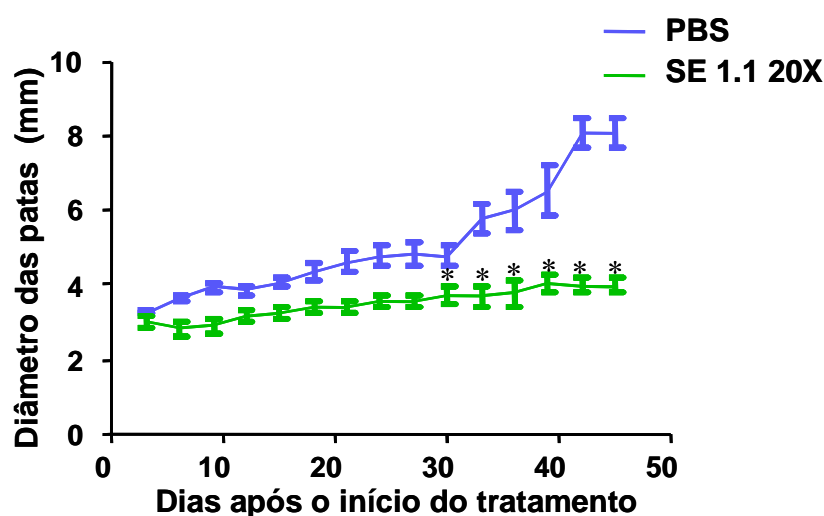
#### 4.3. Avaliação do efeito do complexo paladaciclo SE 1.1 sobre as lesões cutâneas causadas pela *L. (L.) amazonensis* em camundongos

O primeiro ensaio com o SE 1.1 *in vivo* foi realizado com dois grupos de 6 camundongos BALB/c em cada grupo. Os controles receberam somente PBS e o outro grupo foi tratado com o SE 1.1 na dose total de 42 µg por animal.



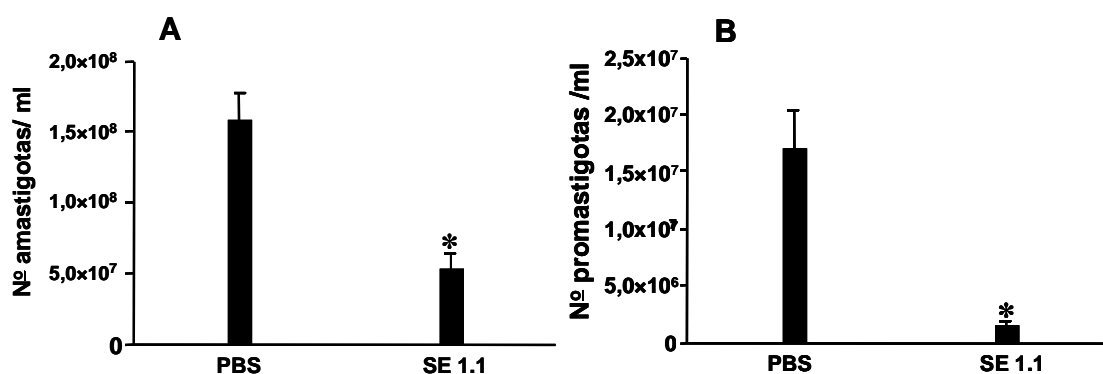
**Figura 12:** Lesões dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* 15 dias após o término do tratamento com o SE 1.1. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento com o SE 1.1. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês (dose total de 42 µg por animal). A - Controle que recebeu PBS; B - Animal tratado com 42 µg do SE 1.1.

Pode-se observar na Figura 12 que 15 dias após o término do tratamento as lesões de pata dos animais tratados com o SE 1.1 eram nitidamente menores que as dos camundongos controles. Essa diferença pode também ser observada na Figura 13 que mostra que no 15º dia após o término do tratamento a medida das lesões dos controles foi aproximadamente o dobro das apresentadas pelos animais tratados com o SE 1.1. Embora tenha sido significativa a diferença do tamanho das lesões durante todo o período de administração do SE 1.1, como mostrado na Figura 13, ela foi mais acentuada 15 dias após o término do tratamento.



**Figura 13:** Avaliação do tamanho das lesões dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com o SE 1.1. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento com o SE 1.1 à concentração de  $3,26 \mu\text{g}$  por dose (total de  $42 \mu\text{g}$ ). Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. As lesões foram medidas de 3 em 3 dias durante os 30 dias de tratamento (A) e 15 dias após o término do tratamento (B). \* $P < 0,0001$ .

Quando se avaliou a carga parasitária das lesões 15 dias após o término do tratamento pôde-se constatar a redução de aproximadamente 70% do número de amastigotas isolados das lesões dos animais tratados com o SE 1.1 comparado ao dos controles (Figura 14A). Essa redução foi significamente maior (91%) quando a avaliação foi realizada pela diluição limitante (Figura 14B e Tabela 5).

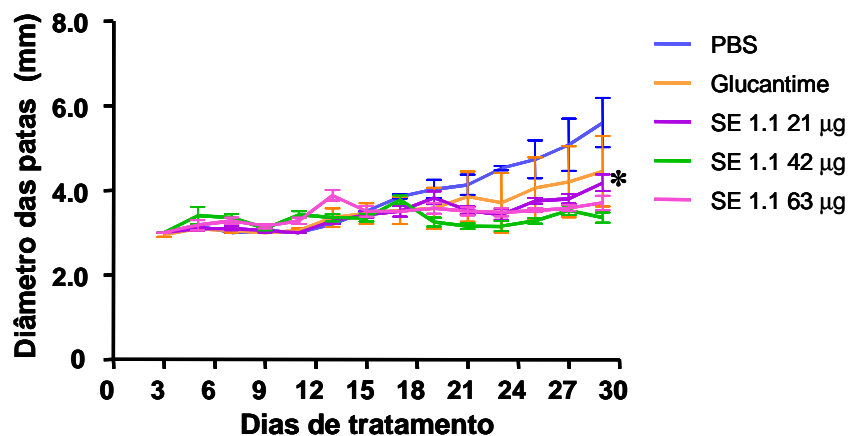


**Figura 14:** Avaliação da carga parasitária nas lesões da pata de camundongos BALB/c 15 dias após o término do tratamento com SE 1.1. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento com o SE 1.1 (total de 42  $\mu\text{g}$ ). Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. Após 15 dias do término do tratamento os animais foram sacrificados e as lesões isoladas, procedendo-se à contagem direta dos amastigotas em câmara de Neubauer (A) e à avaliação da carga parasitária por diluição limitante (B).  $P < 0,001$ .

**Tabela 5:** Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* avaliada pela diluição limitante 15 dias após o tratamento por 1 mês com 42 µg do SE 1.1.

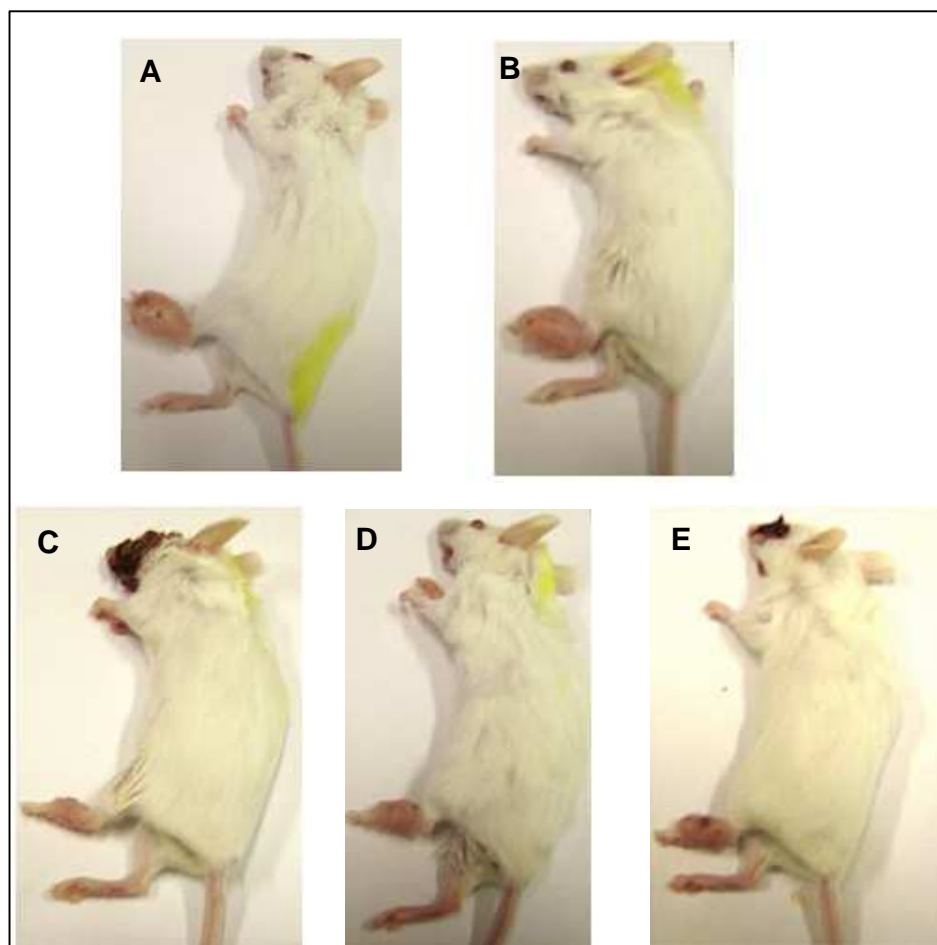
<b>Tratamento</b>	<b>Carga parasitária</b>	<b>Porcentagem de redução da carga parasitária</b>
Controle PBS	$1,7 \times 10^7$	—
SE 1.1 42 µg	$1,5 \times 10^6$	91,27

No outro esquema de tratamento *in vivo* com o SE 1.1 foram utilizados 5 grupos de camundongos BALB/c, sendo um controle em que os animais receberam PBS, um controle do tratamento com o glucantime (20 mg por animal) e três grupos de animais tratados com diferentes doses do SE 1.1 (21 µg, 42 µg e 63 µg). Por volta do 21<sup>o</sup> dia do tratamento pôde-se observar uma pequena, porém significativa redução do tamanho das lesões dos animais tratados com glucantime e com as 3 concentrações do SE 1.1 e no 30<sup>o</sup> dia do tratamento essa redução foi de aproximadamente 37% (Figura 15). Uma semana após o término do tratamento pôde-se observar uma redução de 33% das lesões dos animais tratados com 21 µg do SE 1.1 e de 46% naqueles tratados com 42 µg e 63 µg em relação ao controle. Os animais tratados com o glucantime apresentaram lesões muito semelhantes às do controle (Figura 16 e 17A). Quando se avaliou a carga parasitária pela contagem direta dos amastigotas nas lesões foi observada redução do número de parasitas nos animais tratados com o SE 1.1 nas três concentrações (Figura 17B). Entretanto, a avaliação dos parasitas pela diluição limitante mostrou que uma semana após o tratamento houve também redução da carga parasitária nos animais tratados com o glucantime semelhante à obtida nos animais tratados com 21 µg do SE 1.1, porém menor do que a observada nos animais tratados com 42 µg e 63 µg do SE 1.1 (Figura 17C e Tabela 6).

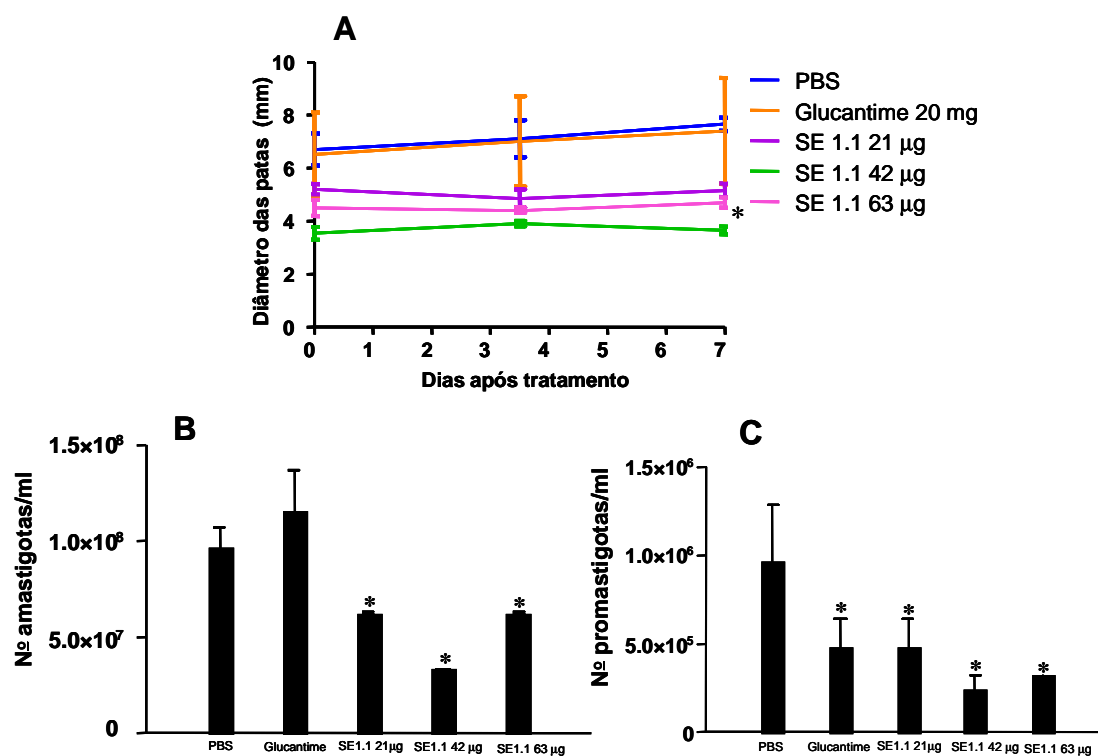


**Figura 15:** Avaliação do tamanho das lesões dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com o SE 1.1 em diferentes concentrações. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês e as lesões foram medidas de 3 em 3 dias durante os 30 dias de tratamento. \*  $P < 0,0001$  em relação ao controle para os grupos tratados com glucantime e com as três doses do SE 1.1.





**Figura 16:** Lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* 7 dias após o tratamento com diferentes doses do SE 1.1. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. A - Controle que recebeu PBS; B - Tratamento com 20 mg de glucantime; C, D e E - Tratamento com 21 µg, 42 µg e 63 µg do SE 1.1, respectivamente.

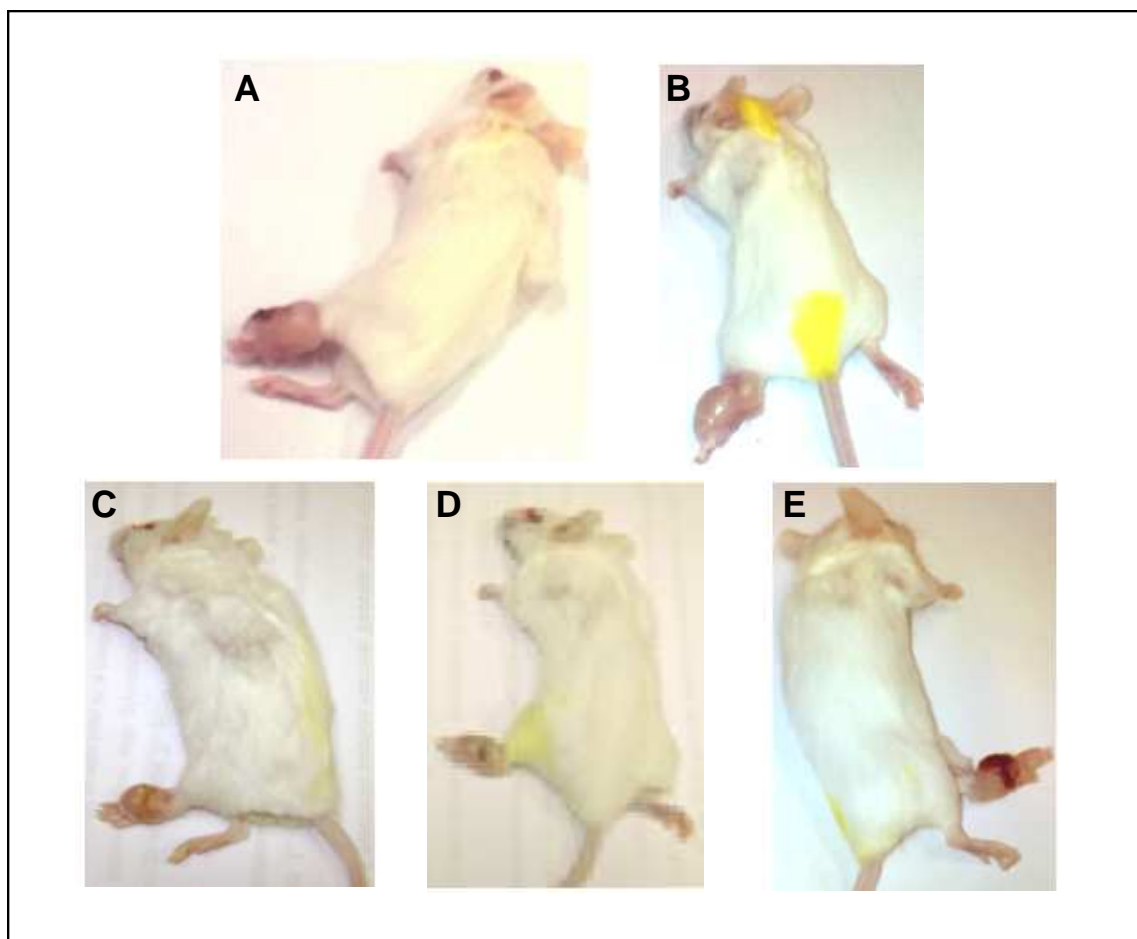


**Figura 17:** Tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* com SE 1.1 em diferentes concentrações. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. A – Avaliação da infecção pela medida das lesões de 3 em 3 dias durante 7 dias após o tratamento. \* $P < 0,0001$  em relação ao controle para os grupos tratados com as três doses do SE 1.1. B - Contagem em câmara de Neubauer dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolados da lesão de camundongos BALB/c 7 dias após o término do tratamento. C- Carga parasitária de *L. (L.) amazonensis* nas lesões da pata de camundongos BALB/c 7 dias após o término do tratamento avaliada pela diluição limitante. \* $P < 0,0001$  em relação ao controle para os grupos tratados com glucantime e com as três doses do SE 1.1.

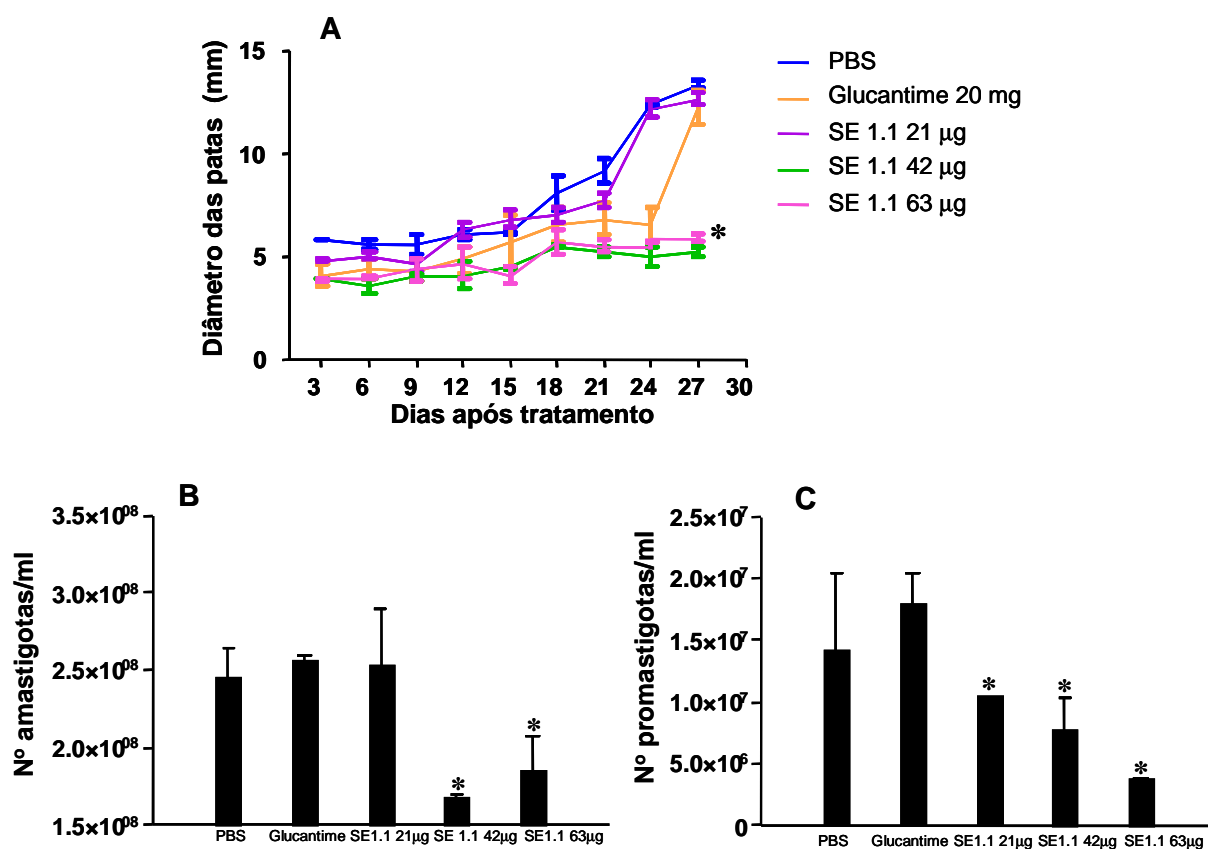
**Tabela 6:** Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* avaliada pela diluição limitante 7 dias após o tratamento por 1 mês com várias doses do SE 1.1.

Tratamento	Carga Parasitária	Porcentagem de redução da carga parasitária
PBS	$9,6 \times 10^5$	—
Glucantime 20 mg	$4,8 \times 10^5$	50
SE 1.1 21 $\mu$ g	$4,8 \times 10^5$	50
SE 1.1 42 $\mu$ g	$2,4 \times 10^5$	75
SE 1.1 63 $\mu$ g	$3,2 \times 10^5$	66,6

A avaliação da infecção dos animais 1 mês após o término do tratamento mostrou a redução de 58% das lesões nos camundongos tratados com 42  $\mu$ g e 63  $\mu$ g do SE 1.1, enquanto que as lesões dos animais tratados com o glucantime e 21  $\mu$ g do SE 1.1 foram semelhantes às dos controles (Figuras 17 e 18). Os resultados da avaliação da carga parasitária dos animais 1 mês após o término do tratamento pela contagem direta dos amastigotas isolados das lesões mostraram também a redução do número de parasitas apenas dos animais tratados com 42  $\mu$ g e 63  $\mu$ g do SE 1.1 (Figura 19A). Entretanto, pelos resultados da diluição limitante pôde-se observar também uma pequena, porém significativa redução dos parasitas nas lesões dos camundongos tratados com 21  $\mu$ g do SE 1.1 (Figura 19C e Tabela 7).



**Figura 18:** Lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* 30 dias após o tratamento com o SE 1.1. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. A - Controle que recebeu PBS; B - Tratamento com 20 mg de glucantime; C, D e E - Tratamento com 21  $\mu$ g, 42  $\mu$ g e 63  $\mu$ g do SE 1.1, respectivamente.



**Figura 19:** Tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* com SE 1.1 em diferentes concentrações. Os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 15 dias após iniciou-se o tratamento. Os animais foram tratados durante 3 dias consecutivos e após 3X por semana durante 1 mês. A – Avaliação da infecção pela medida das patas de 3 em 3 dias durante 1 mês após o tratamento. B – Contagem em câmara de Neubauer dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* isolados da lesão de camundongos BALB/c 1 mês após o término do tratamento. \* $P < 0,0001$  em relação ao controle para os grupos tratados com 42 µg e 63 µg do SE 1.1. C- Carga parasitária de *L. (L.) amazonensis* nas lesões da pata de camundongos BALB/c 1 mês após o término do tratamento avaliada pela diluição limitante. \* $P < 0,0001$  em relação ao controle para os grupos tratados com as três doses do SE 1.

**Tabela 7:** Carga parasitária dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* avaliada pela diluição limitante 30 dias após o tratamento por 1 mês com várias doses do SE 1.1.

<b>Tratamento</b>	<b>Carga Parasitária</b>	<b>Porcentagem de redução da carga parasitária</b>
Controle PBS	$1,4 \times 10^7$	—
Glucantime 20 mg	$1,7 \times 10^7$	—
SE 1.1 21 $\mu$ g	$1,0 \times 10^7$	27
SE 1.1 42 $\mu$ g	$7,7 \times 10^6$	45
SE 1.1 63 $\mu$ g	$3,8 \times 10^6$	73

A toxicidade do SE 1.1 nos camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com as várias concentrações do SE 1.1 e com o glucantime foi avaliada pela dosagem dos níveis de uréia e bilirrubina total no soro dos animais 7, 15 e 30 dias após o término do tratamento. Os resultados desses testes são mostrados na Tabela 8. É possível observar que os níveis de uréia e bilirrubina total de todos os animais tratados foram muito semelhantes aos dos animais controle, estando todos dentro da faixa normal de concentração desses marcadores bioquímicos.

**Tabela 8:** Dosagem de uréia e bilirrubina total no soro de camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com o SE 1.1 e glucantime.

GRUPOS	URÉIA (mg/dl)			BILIRRUBINA (mg/dl)		
	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
<b>Controle</b>	59,43	64,9	60,8	1,43	1,54	1,48
<b>Glucantime 20 mg</b>	62	66,2	62,8	1,45	1,62	1,33
<b>SE 1.1 21 µg</b>	63,5	62,6	60	1,38	1,58	1,48
<b>SE 1.1 42 µg</b>	59,9	63,5	61,4	1,39	1,49	1,38
<b>SE 1.1 63 µg</b>	58,7	65	61,9	1,33	1,49	1,48

Os tempos indicados referem-se aos dias após o término do tratamento em que foram colhidos os soros para as dosagens.

Valores de referência: bilirrubina total: 0,1 - 1,8 mg/dl; uréia: 60 - 80 mg/dl

## 5. Discussão

No presente estudo foi avaliada a atividade leishmanicida de complexos paladaciclos utilizando como modelo a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Inicialmente três complexos, SF 1.1, SF 1.2 e SE 1.1, foram testados com amastigotas intracelulares em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* com a *L. (L.) amazonensis*. Vários compostos com ação antitumoral têm apresentado também potente atividade antiparasitária (WERNSDORFER e ALLMENDINGER, 2001). Assim, a atividade leishmanicida dos complexos paladaciclos foi testada levando em conta a atividade anti-metastática dos paladaciclos que apresentam um ligante de coordenação 1 ou 2-etanobis(difenilfosfina) (SE) ou o 1,1'-bis(difenilfosfina) ferroceno (SF). A baixa solubilidade do SF 1.1 e do SF 1.2 dificultou a avaliação da sua capacidade leishmanicida, pois à concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi necessário utilizar 2,5% do solvente (DMSO). Nessa concentração o próprio solvente foi tóxico para os amastigotas, além de ter alterado claramente a morfologia dos macrófagos (Tabelas 1 e 2). Por outro lado, em concentrações nanomolares o SE 1.1 destruiu um número significativo dos amastigotas e não apresentou citotoxicidade aos macrófagos (Tabela 3). A eficácia do SE 1.1 foi comprovada quando se utilizou o glucantime como controle da atividade leishmanicida. Nesses experimentos, 85% dos parasitas foram destruídos pelo SE 1.1 à concentração de 325 nM, enquanto que houve destruição de apenas 30-35% pelo glucantime em concentrações na ordem de milimolar (Figura 6 e Tabela 4). Além disso, embora baixa, o glucantime apresentou toxicidade aos macrófagos quando a avaliação da viabilidade foi realizada pelo MTT e a 325 nM o SE 1.1 não afetou os macrófagos. Os resultados de viabilidade pelo MTT foram confirmados pela observação da morfologia dos macrófagos tratados com o SE 1.1 ao microscópio óptico (Figura 7).

O efeito do SE 1.1 sobre a atividade de cisteína proteinases dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi também estudado. A atividade dessas enzimas foi avaliada utilizando-se como substrato o composto fluorescente Z-FR-AMC que pode ser hidrolisado por serino e cisteína proteinases. A hidrólise do Z-FR-AMC após a incubação com os extratos dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi máxima a pH 5,0, significativamente amplificada na presença de DTT e totalmente abolida pelo E-64, condições que caracterizam a atividade de



cisteína proteinases nos extratos dos parasitas. Esses resultados corroboram os de estudos prévios que descreveram a predominância de cisteína proteinases em amastigotas de espécies de *Leishmania* do complexo *L. (L.) mexicana* (PUPKIS *et al.*, 1986). Em *L. (L.) amazonensis* a análise de cisteína proteinases mostrou que essas enzimas são expressas preferencialmente em cepas virulentas dessa espécie (Soares *et al.*, 2003). Após o estabelecimento das condições ótimas de ensaio das cisteína proteinases dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi demonstrada a inibição da atividade dessas enzimas pelo complexo paladaciclo SE 1.1 (Figura 10). Essa inibição pode ser um dos alvos do SE 1.1 sobre os parasitas intracelulares, uma vez que as cisteína proteinases representam fatores de virulência de *Leishmania* relevantes para a infecção *in vitro* e *in vivo* (MOTTRAM *et al.*, 1996; ALEXANDER *et al.*, 1998). Inibidores específicos dessas enzimas têm sido testados como drogas leishmanicidas e o tratamento com um inibidor irreversível de proteinases do tipo catepsina L resultou em diminuição significativa do número de amastigotas em culturas de macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) major* (PONTE-SUCRE *et al.*, 2006). Os amastigotas de *Leishmania* desenvolvem-se em um ambiente redutor mantido pelo sistema tripanotiona/tripantionina reductase característico dos tripanosomatídeos (FAIRLAMB e CERAMI, 1992; MULLER *et al.*, 2003). Essa condição favorece a atividade ótima das cisteína proteinases dos amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira. O fato de o SE 1.1 inibir a atividade das cisteína proteinases da *L. (L.) amazonensis* mesmo em condições redutoras (na presença do DTT) (Figura 10) permite atribuir, pelo menos em parte, a atividade leishmanicida desse paladaciclo à inibição das cisteína proteinases do parasita. Essa hipótese é sustentada pelos dados que mostram a inibição reversível da atividade da catepsina B em células de carcinoma tratadas com um desses complexos paladaciclos (SF 1.1) (BINCOLETTO *et al.*, 2005). Por outro lado, foi demonstrada a atividade anti-tumoral do SE 1.1 em células de melanoma murino pela depressão da atividade respiratória e a degradação do DNA dessas células (RODRIGUES *et al.*, 2003). Dados mais recentes mostraram a ação catalítica do SE 1.1 sobre a oxidação de grupos tióis de proteínas de membranas mitocondriais, levando à conseqüente permeabilização da mitocôndria e liberação do citocromo c associada à apoptose de células de melanoma murino (SANTANA *et al.*, 2008). Foi demonstrado também que o tratamento de células tumorais com o SF 1.2 induz a ruptura dos lisossomos e a liberação de enzimas lisossomais nessas células (BARBOSA *et al.*, 2006). Analisados em conjunto, esses dados mostram que

mecanismos de ação diversificados sobre organelas específicas estão implicados na atividade tumoricida dos complexos paladaciclos (SANTANA et al., 2008). Quanto à atividade leishmanicida do SE 1.1, os dados até aqui não permitem definir o seu mecanismo de ação sobre os amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Experimentos de microscopia eletrônica utilizando marcadores de algumas organelas celulares, tais como lisossomos e mitocôndria, além de um anticorpo monoclonal dirigido à uma cisteína proteinase desses parasitas, estão sendo conduzidos visando à elucidação desse mecanismo.

Os dados do tratamento *in vivo* com o SE 1.1 mostraram um efeito significante desse composto na redução das lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis*. A eficácia do tratamento foi aparente tanto na redução do tamanho das lesões como no decréscimo da carga parasitária dos animais tratados. No primeiro experimento *in vivo* realizado o decréscimo da carga parasitária nas lesões dos animais tratados com 42 µg do SE 1.1 foi mais acentuada (91%) do que a observada nos animais do experimento posterior que receberam a mesma dose do SE 1.1 (42 µg) (Figuras 17 e 19; Tabelas 6 e 7). É provável que a diferença dos resultados obtidos nos dois experimentos seja devida ao tempo em que essa carga foi avaliada (15 dias após o término do tratamento no primeiro experimento e 7 e 30 dias após no segundo). Entretanto, a redução da carga parasitária foi acentuada em ambos os experimentos. Pôde-se observar ainda que, embora 7 dias após o término do tratamento não se tenha observado diferença significante entre a carga dos animais tratados com 42 µg e 63 µg do SE 1.1, um mês após o tratamento somente os animais que receberam 63 µg mantiveram a mesma porcentagem de redução da carga parasitária em relação aos controles (Figura 19 e Tabela 7).

Os camundongos tratados com o glucantime mostraram a redução significante da carga parasitária após 7 dias do término do tratamento, comparável à observada nos animais tratados com 21 µg do SE 1.1 (Figura 17 e Tabela 6). No entanto, a carga parasitária desses animais atingiu o nível dos controles um mês após o término do tratamento (Figura 19 e Tabela 7), o que também pode ser atribuído a administração intralesional, visto que o glucantime possui melhor atividade quando administrado por via sistêmica.

Considerando-se que a dose total do glucantime utilizada nesse modelo experimental foi cerca de 300 vezes superior à do SE 1.1, os resultados demonstram a maior eficácia desse

complexo paladaciclo para o tratamento intralesional das lesões causadas pela *L. (L.) amazonensis*.

Outro aspecto importante a ser considerado nos experimentos *in vivo* é o critério de avaliação da carga parasitária dos animais tratados. Embora seja possível observar a correlação entre o tamanho das lesões, a carga avaliada pelo número de amastigotas e pela diluição limitante, em ambos os experimentos de tratamento *in vivo* observou-se que a carga parasitária foi menor quando avaliada pela diluição limitante para a maior parte dos grupos tratados (Figuras 14, 17 e 19). Esse resultado é esperado, desde que pelo método da diluição limitante estima-se o número de parasitas viáveis das lesões, contando-se os promastigotas resultantes da diferenciação e crescimento dos amastigotas isolados. Por outro lado, o aumento das lesões das patas deve-se não somente ao número dos parasitas presentes nessas lesões, mas também ao inchaço das mesmas pelo processo inflamatório que acompanha as lesões granulomatosas típicas da infecção causada pela *L. (L.) amazonensis*. Portanto, a diluição limitante constitui um método mais sensível e fidedigno para quantificar os parasitas nas infecções por *Leishmania*, como originalmente descrito para avaliar a infecção pela *L. (L.) major* (TITUS *et al.*, 1985) e *L. (L.) infantum* (BUFFET *et al.*, 1995).

A linhagem de camundongo utilizada nesse estudo representa um modelo de extrema suscetibilidade à *L. (L.) amazonensis*. Os camundongos BALB/c infectados por via subcutânea com esse parasita desenvolvem um processo inflamatório progressivo no sítio de inoculação seguido de ulceração com conseqüente perda de tecido e o aparecimento de lesões metastáticas em diferentes locais do corpo do animal. Nas leishmanioses tem sido registrado que o tratamento não leva à cura estéril das lesões, pois os parasitas permanecem viáveis, embora em número reduzido, após a administração dos antimoniais em uma grande variedade de modelos animais, assim como no homem. Além disso, o tempo de início do tratamento pode influenciar a evolução da doença, como mostrado em estudos prévios (GARNIER *et al.*, 2007). No presente trabalho, os tratamentos *in vivo* foram iniciados 15 dias após a infecção dos animais, um intervalo que permitiu o estabelecimento da doença e o aparecimento das lesões, e mantidos por trinta dias, período suficiente para estabilizar a infecção. Como pode ser observado na Figura 13, após o término do tratamento os animais que receberam o composto SE 1.1 mantiveram as lesões estáveis, enquanto que os do grupo controle começaram a ter um desenvolvimento rápido da lesão devido à infecção estar instalada há 45 dias, tempo suficiente

para a sua disseminação. Considerando todos esses parâmetros é possível concluir que a administração do SE 1.1 resultou em uma resposta favorável ao tratamento das lesões causadas pela *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, em termos absolutos a carga parasitária foi considerável mesmo nos animais tratados com a dose mais alta do SE 1.1 (Figura 19 e Tabela 7). Muito provavelmente isso se deve ao modelo extremamente suscetível à infecção pela *L. (L.) amazonensis* utilizado nos experimentos, como discutido acima. Embora escassos os dados da literatura sobre os ensaios de drogas leishmanicidas sobre a *L. (L.) amazonensis* nesse modelo, recentemente dois compostos foram testados, o terpeno nerolidol e o antiestrogênio tamoxifeno. Os resultados do tratamento *in vivo* com o tamoxifeno mostraram significativa redução do número de parasitas nas lesões dos animais tratados que, no entanto, apresentaram carga parasitária ainda alta (MIGUEL *et al.*, 2008). Em relação ao tratamento com o nerolidol, é difícil comparar os resultados, pois nesse trabalho foi avaliado somente o tamanho das lesões dos animais estudados (ARRUDA *et al.*, 2005).

Existem várias evidências de que a eficácia do tratamento com antimonial na leishmaniose visceral murina é dependente da resposta imune do hospedeiro mediada por IFN- $\gamma$  e IL-12 com a consequente produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativadas e a destruição dos parasitas (MURRAY e DELPH-ETIENNE, 2000; MURRAY *et al.*, 2000). A ação leishmanicida do SE 1.1 parece não depender da ativação do macrófago e a produção de óxido nítrico, pois não foi detectado o acúmulo de nitrato nos sobrenadantes dos macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com várias concentrações do SE 1.1 (dados não mostrados). Esses dados estão de acordo com os achados que mostram que a *L. (L.) amazonensis* é muito resistente à ação do óxido nítrico (GIUDICE *et al.*, 2007), tornando assim a resposta ao tratamento da leishmaniose cutânea causada por essa espécie menos dependente de drogas ativadoras do macrófago.

A toxicidade do SE 1.1 também foi avaliada pela dosagem de uréia e bilirrubina total e os valores encontrados nos níveis séricos de ambas nos animais tratados foram muito próximos dos obtidos nos camundongos controles (Tabela 7). Além disso, o peso dos animais tratados com o SE 1.1 foi muito semelhante ao encontrado nos animais do grupo controle, enquanto que os tratados com o glucantime apresentaram uma pequena, porém significativa perda de peso (dados não mostrados). Esses resultados mostram que o SE 1.1 nas concentrações utilizadas não levou à disfunção hepática ou renal dos camundongos, como era

esperado visto que a administração intralesional previne a toxicidade sistêmica, devido à baixa biodisponibilidade da administração local. Não foi observada reação de toxicidade no local das aplicações, em comparação com os camundongos que não receberam tratamento. Esses resultados corroboram os dados da literatura que referem que o SE 1.1, assim como outros complexos paladacilos, não induzem comprometimento hepático ou renal em camundongos quando se avaliou a capacidade tumoricida desses compostos em concentrações cerca de trinta vezes superiores às utilizadas no presente trabalho e por administração sistêmica. (CAIRES, 2007).

Em conclusão, os dados mostraram a ação leishmanicida do SE 1.1 para a *L. (L.) amazonensis* *in vitro* e *in vivo*. Apesar de os camundongos BALB/c tratados com a maior dose do SE 1.1 ainda apresentarem carga parasitária considerável nas lesões, os resultados foram promissores, levando-se em consideração a suscetibilidade do modelo experimental utilizado.

## 6. Conclusões e Sugestões

O composto SE 1.1 apresentou:

- ✓ Melhor resultado nos ensaios preliminares, tornando-se o composto escolhido para os ensaios posteriores
- ✓ Melhor eficácia na atividade leishmanicida *in vitro* sobre os amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, se comparado ao Glucantime.
- ✓ Atividade leishmanicida significativa em concentrações que apresentaram baixa citotoxicidade em culturas de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.
- ✓ Atividade inibitória de cisteína preteinasas do lisado de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.
- ✓ Redução significativa da carga parasitária de lesões de patas de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.
- ✓ Resultados satisfatórios em relação à toxicidade sistêmica nos ensaios bioquímicos (uréia e bilirrubina), realizados com o soro dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com SE 1.1 intralesional.

## 7. Referências

ALEXANDER, J., COOMBS, G. H. e MOTTRAM, J. C. Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J Immunol**, v.161, n.12, Dec 15, p.6794-801. 1998.

ALEXANDER, J. e RUSSELL, D. G. The interaction of Leishmania species with macrophages. **Adv Parasitol**, v.31, p.175-254. 1992.

ANTOINE, J. C., JOUANNE, C., LANG, T., PRINA, E., DE CHASTELLIER, C. e FREHEL, C. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with Leishmania amazonensis. **Infect Immun**, v.59, n.3, Mar, p.764-75. 1991.

ANTOINE, J. C., PRINA, E., JOUANNE, C. e BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immun**, v.58, n.3, Mar, p.779-87. 1990.

ANTOINE, J. C., PRINA, E., LANG, T. e COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. **Trends Microbiol**, v.6, n.10, Oct, p.392-401. 1998.

ARRUDA, D. C., D'ALEXANDRI, F. L., KATZIN, A. M. e ULIANA, S. R. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.5, May, p.1679-87. 2005.

BARBIERI, C. L., BROWN, K. e RABINOVITCH, M. Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with Leishmania mexicana amazonensis: a cytochemical study. **Z Parasitenkd**, v.71, n.2, p.159-68. 1985.

BARBOSA, C. M., OLIVEIRA, C. R., NASCIMENTO, F. D., SMITH, M. C., FAUSTO, D. M., SOUFEN, M. A., SENA, E., ARAUJO, R. C., TERSARIOL, I. L., BINCOLETTO, C. e CAIRES, A. C. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. **Eur J Pharmacol**, v.542, n.1-3, Aug 7, p.37-47. 2006.

BERMAN, J. D., FIORETTI, T. B. e DWYER, D. M. In vivo and in vitro localization of Leishmania within macrophage phagolysosomes: use of colloidal gold as a lysosomal label. **J Protozool**, v.28, n.2, May, p.239-42. 1981.

BINCOLETTO, C., TERSARIOL, I. L., OLIVEIRA, C. R., DREHER, S., FAUSTO, D. M., SOUFEN, M. A., NASCIMENTO, F. D. e CAIRES, A. C. Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. **Bioorg Med Chem**, v.13, n.8, Apr 15, p.3047-55. 2005.

BUFFET, P. A., SULAHIAN, A., GARIN, Y. J., NASSAR, N. e DEROUIN, F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.9, Sep, p.2167-8. 1995.

CAIRES, A. C. Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v.7, n.5, Sep, p.484-91. 2007.

CHANG, K. P. e FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. **Ciba Found Symp**, v.99, p.113-37. 1983.

CROFT, S. L. e COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v.19, n.11, Nov, p.502-8. 2003.

CROFT, S. L., SEIFERT, K. e YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, Mar, p.399-410. 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp Mol Pathol**, v.72, n.2, Apr, p.132-41. 2002.

DAS, M., DASGUPTA, S. C. e GOMES, A. Isolation, purification and partial chemical characterization of a lethal factor from common indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. **Indian J Exp Biol**, v.39, n.8, Aug, p.781-5. 2001.

DIETZE, R., CARVALHO, S. F., VALLI, L. C., BERMAN, J., BREWER, T., MILHOUS, W., SANCHEZ, J., SCHUSTER, B. e GROGL, M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, n.6, Dec, p.685-9. 2001.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. e CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol Int**, v.54, n.2, Jun, p.119-22. 2005.

FAIRLAMB, A. H. e CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu Rev Microbiol**, v.46, p.695-729. 1992.

GARNIER, T., MANTYLA, A., JARVINEN, T., LAWRENCE, J., BROWN, M. e CROFT, S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.4, Oct, p.802-10. 2007.

GIUDICE, A., CAMADA, I., LEOPOLDO, P. T., PEREIRA, J. M., RILEY, L. W., WILSON, M. E., HO, J. L., DE JESUS, A. R., CARVALHO, E. M. e ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infect Dis**, v.7, p.7. 2007.



GRIMALDI, G., JR., TESH, R. B. e MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v.41, n.6, Dec, p.687-725. 1989.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, Apr, p.229-43. 2001.

KROEMER, G. e JAATTELA, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.11, Nov, p.886-97. 2005.

LANG, T., HELLIO, R., KAYE, P. M. e ANTOINE, J. C. Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. **J Cell Sci**, v.107 ( Pt 8), Aug, p.2137-50. 1994.

MCKERROW, J. H. Parasite proteases. **Exp Parasitol**, v.68, n.1, Jan, p.111-5. 1989.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis**, v.15, n.5, Oct, p.485-90. 2002.

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.28, n.1, Jan, p.42-8; discussion 49-51. 1999.

MIGUEL, D. C., YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. e ULIANA, S. R. Tamoxifen Is Effective in the Treatment of Leishmania amazonensis Infections in Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.6, p.e249. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.

MOTTRAM, J. C., SOUZA, A. E., HUTCHISON, J. E., CARTER, R., FRAME, M. J. e COOMBS, G. H. Evidence from disruption of the *lmcpc* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.12, Jun 11, p.6008-13. 1996.

MULLER, S., LIEBAU, E., WALTER, R. D. e KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitol**, v.19, n.7, Jul, p.320-8. 2003.

MURRAY, H. W. e DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.68, n.1, Jan, p.288-93. 2000.

MURRAY, H. W., MONTELIBANO, C., PETERSON, R. e SYPEK, J. P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.182, n.5, Nov, p.1497-502. 2000.

MURRAY, H. W., OCA, M. J., GRANGER, A. M. e SCHREIBER, R. D. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. **J Clin Invest**, v.83, n.4, Apr, p.1253-7. 1989.

PEARSON, R. D. e SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 1996.

PONTE-SUCRE, A., VICIK, R., SCHULTHEIS, M., SCHIRMEISTER, T. e MOLL, H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.7, Jul, p.2439-47. 2006.

PRINA, E., ANTOINE, J. C., WIEDERANDERS, B. e KIRSCHKE, H. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. **Infect Immun**, v.58, n.6, Jun, p.1730-7. 1990.

PUPKIS, M. F., TETLEY, L. e COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. **Exp Parasitol**, v.62, n.1, Aug, p.29-39. 1986.

ROBINSON, R. F. e NAHATA, M. C. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. **J Clin Pharm Ther**, v.24, n.4, Aug, p.249-57. 1999.

RODRIGUES, E. G., SILVA, L. S., FAUSTO, D. M., HAYASHI, M. S., DREHER, S., SANTOS, E. L., PESQUERO, J. B., TRAVASSOS, L. R. e CAIRES, A. C. Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. **Int J Cancer**, v.107, n.3, Nov 10, p.498-504. 2003.

ROGERS, K. A., DEKREY, G. K., MBOW, M. L., GILLESPIE, R. D., BRODSKYN, C. I. e TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**, v.209, n.1, Mar 19, p.1-7. 2002.

SAJID, M. e MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol Biochem Parasitol**, v.120, n.1, Mar, p.1-21. 2002.

SANTANA, D. P., FARIA P.A., PAREDES-GAMERO E. J., CAIRES A. C. F., NANTES I. L., RODRIGUES T. Palladacycles Catalyze the Oxidation of Critical Thiols of the Mitochondrial Membrane Proteins and Lead to Mitochondrial Permeabilization and Cytochrome *c* Release Associated to Apoptosis. **Biochem J**, 2008.

SELZER, P. M., PINGEL, S., HSIEH, I., UGELE, B., CHAN, V. J., ENGEL, J. C., BOGYO, M., RUSSELL, D. G., SAKANARI, J. A. e MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.20, Sep 28, p.11015-22. 1999.

THAKUR, C. P., KANYOK, T. P., PANDEY, A. K., SINHA, G. P., ZANIEWSKI, A. E., HOULIHAN, H. H. e OLLIARO, P. A prospective randomized, comparative, open-label trial

of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.94, n.4, Jul-Aug, p.429-31. 2000.

TITUS, R. G., MARCHAND, M., BOON, T. e LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**, v.7, n.5, Sep, p.545-55. 1985.

WERNSDORFER, W. H. e ALLMENDINGER, T. Antiparasitics - a review of the recent patent literature. **IDrugs**, v.4, n.4, Apr, p.443-51. 2001.

WHO, World Health Report.. Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2004.

WIKIPEDIA, The Free Encyclopedia. Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Air-free\\_technique](http://en.wikipedia.org/wiki/Air-free_technique). 2008.

ZILBERSTEIN, D. e SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v.48, p.449-70. 1994.

## 8. ANEXO – Parecer do Comitê de ética




Tel.: (011) 4798-7000  
Fax: (011) 4799-5233  
<http://www.unc.br>

### COMITÊ DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL CEMEA/UMC

À Acadêmica  
SILVIA MOURA FRATA

Consideramos o projeto intitulado “ESTUDO DE COMPLEXOS PALADACICLOS NO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES (036/2007)”, de autoria da acadêmica SILVIA MOURA FRATA sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FAVERO CAIRES”, **APROVADO**. A seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais estão adequados aos princípios bioéticos na utilização de animais em experimentação.

Mogi das Cruzes, 06 de agosto de 2007

  
MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA  
Presidente do CEMEA-UMC

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)