

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Letícia Cannavina Pavanelli
Paola Tamiso D'Amico

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DO DERIVADO
NITROTIAZÓLICO NITAZOXANIDA (NTZ) E DO ANTIMETABÓLITO DE
PURINA ALOPURINOL SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *L. (L.) INFANTUM*
*CHAGASI IN VITRO***

São Paulo
2018

Letícia Cannavina Pavanelli
Paola Tamiso D'Amico

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DO DERIVADO
NITROTIAZÓLICO NITAZOXANIDA (NTZ) E DO ANTIMETABÓLITO DE
PURINA ALOPURINOL SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *L. (L.) INFANTUM*
*CHAGASI IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro Universitário São Camilo como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt
de Amorim

Coorientadoras:

Prof^a. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner

M.^a. Danielle Aparecida Marino da Silva

São Paulo

2018

D' Amico, Paola Tamiso; Pavanelli, Leticia Cannavina
Estudo comparativo da atividade do derivado nitrotizólico nitazoxanida (NTZ) e do antimetabólito de purina alopurinol sobre formas amastigotas de LEISHMANIA (Leishmania) amazonensis e L. (L.) infantum CHAGAS in vitro / Leticia Cannavina Pavanelli, Paola Tamiso D Amico. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.
40 p.

Orientação de Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de Amorim

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Alopurinol 2. Antiparasitários 3. Leishmania infantum 4. Leishmania mexicana 5. Reposicionamento de medicamentos I. D Amico, Paola Tamiso II. Amorim, Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 616.96

Letícia Cannavina Pavanelli
Paola Tamiso D'Amico

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DO DERIVADO
NITROTIAZÓLICO NITAZOXANIDA (NTZ) E DO ANTIMETABÓLITO DE
PURINA ALOPURINOL SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *L. (L.) INFANTUM*
*CHAGASI IN VITRO***

São Paulo, 30 de outubro de 2018

Prof^a. Dra Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de Amorim

Prof^a. Dra Marjorie Marini Mende e Souza

Dedicatória

Dedicamos este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em nossas vidas, autor de nossos destinos, nosso guia. À todos os nossos familiares que nos apoiaram e incentivaram com palavras de força e coragem, com muito carinho para conclusão dessa longa jornada. Aos nossos amigos, que nos alegraram e nos deram esperança durante o caminho e, que sem dúvida, foram muito importantes para a conclusão deste trabalho. Aos nossos professores e orientadoras, pela paciência, apoio, todo aprendizado e experiência adquirida durante esses 4 anos de curso.

Valeu a pena toda distância percorrida, todo sofrimento, toda experiência vivida e lições aprendidas. Valeu a pena esperar... Hoje estamos colhendo os frutos do nosso empenho, todos nós juntos!

Agradecimentos

Primeiramente gostaríamos de agradecer aos nossos pais, que acreditaram no nosso sonho de cursar Biomedicina, incentivando-nos e contribuindo para que concluíssemos o curso com êxito.

Aos nossos professores de colégio, cursinho e do Centro Universitário São Camilo que com seu exemplo e ensinamentos nos guiaram para sermos profissionais capacitadas.

Aos nossos colegas de classe que contribuíram para nosso aprendizado e tornaram-se parceiros para a vida.

Esse projeto só poderia se tornar realidade graças a oportunidade de Iniciação Científica que nos foi concedida pela Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestrinerna Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. Também gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt de Amorim, ambas responsáveis por nossa orientação e direcionamento.

Um agradecimento especial à Mestra Danielle Aparecida Marino da Silva pelo empenho e aconselhamento durante o período de permanência na UNIFESP.

Agradecemos também às nossas colegas de laboratório Simone Katz e Fabiana Santana pelo suporte e apoio.

E por fim ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico que ofereceu apoio financeiro para a realização desse projeto.

“Plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. Você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos gerais das leishmanioses	14
1.2. Tratamento das leishmanioses.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivo específico	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Obtenção dos fármacos	26
3.2. Animais de experimentação	26
3.3. Obtenção das formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	26
3.4. Cultivo de macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c e infecção com formas amastigotas da <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	27
3.5. Avaliação da atividade leishmanicida do Alopurinol e da NTZ sobre macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	27
3.6. Ensaio de citotoxicidade	28
3.7. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Avaliação da atividade leishmanicida do Alopurinol sobre macrófagos infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i>	30
4.2 Avaliação da atividade leishmanicida da nitazoxanida sobre macrófagos infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i>	31
4.3 Avaliação da atividade do Alopurinol sobre macrófagos infectados com a <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	33

4.4 Avaliação da atividade leishmanicida da nitazoxanida sobre macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	34
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45

Lista de Abreviaturas

AIF	Fator indutor de apoptose
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HGPRT	Hipoxantina-guanidina fosforibosil transferase
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
NTZ	Nitazoxanida
PBS	Tampão fosfato-salina
SDS	Sódio dodecil sulfato
SFB	Soro fetal bovino
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial

Lista de Símbolos

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
C°	grau Celsius
g	gramas
kg	kilograma
mL	mililitro
mg	miligrama
mM	millimolar
M	molar
Nm	nanômetros
x	vezes
g	força gravitacional

D' Amico, Paola Tamiso; Pavanelli, Letícia Cannavina. **Estudo comparativo da atividade do derivado nitrotiazólico nitazoxanida e do antimetabólito de purina Alopurinol sobre formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* in vitro.** 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

O reposicionamento de fármacos constitui uma alternativa terapêutica promissora para várias doenças. Apresenta como vantagem dados de segurança e eficácia de fármacos já disponíveis, reduzindo o tempo e os custos investidos para a implementação no mercado de novos medicamentos. O Alopurinol é um análogo de purina clinicamente utilizado para o tratamento de pacientes com gota por reduzir a concentração plasmática de ácido úrico nesses pacientes. Ele é também utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral canina apresentando baixo custo, bom perfil de segurança e ausência de resistência parasitária. O derivado nitrotiazólico nitazoxanida (NTZ) é um antiparasitário de amplo espectro, eficaz contra diversos helmintos e protozoários e alguns estudos têm demonstrado a atividade leishmanicida da NTZ. Considerando as vantagens do reposicionamento de fármacos e os dados preliminares sobre a atividade do Alopurinol e NTZ sobre *Leishmania*, no presente projeto foi comparada a ação *in vitro* desses fármacos sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. O tratamento com Alopurinol de macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis* resultou em redução significativa do índice de infecção a partir da concentração de 500 μM e o valor da CE_{50} sobre os amastigotas intracelulares foi 1.053 μM . A atividade do Alopurinol sobre a *L. (L.) infantum chagasi* foi significativa a partir da concentração de 50 μM , sendo a CE_{50} 211,3 μM . O índice de seletividade (IS) do Alopurinol foi de 5 e 25 sobre a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, respectivamente. O tratamento com a NTZ promoveu a destruição significativa dos amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis* a partir de 25 μM , sendo a CE_{50} 52,73 μM , enquanto que sobre os amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* a CE_{50} foi 36,75 μM . O índice de seletividade da NTZ foi de 3,5 e 5 sobre a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, respectivamente. Portanto, esses dados mostraram que os dois fármacos apresentam seletividade aceitável contra as duas espécies de *Leishmania* analisadas, embora o Alopurinol seja significativamente mais seletivo sobre a *L. (L.) infantum chagasi* e também tenha apresentado sobre essa espécie maior seletividade que a NTZ. Esses achados indicam a validade de testar o Alopurinol e a NTZ para o tratamento *in vivo*, assim como o efeito da associação desses fármacos sobre a infecção por esses parasitas.

Palavras chave: Alopurinol. Antiparasitários. *Leishmania infantum*. *Leishmania mexicana*. Reposicionamento de medicamentos.

D 'Amico, Paola Tamiso; Pavanelli, Leticia Cannavina. **Comparative study of the activity of the nitrothiazolic derivative nitazoxanide and the antimetabolite of purpur Allopurinol on amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* in vitro.** 2018. 40 f. Completion of a Course in Biomedicine - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018.

Drug repositioning is a promising strategy for therapy of several diseases, since it has the advantage to share previous data of security and efficacy of available drugs, this reducing time and costs for implementation of new therapeutic compounds. Allopurinol is a purine analog used as a xanthine oxidase inhibitor for reduction of uric acid in gout patients. This drug is also used for the treatment of canine visceral leishmaniasis presenting wide availability, low cost, good safety profile and absence of parasite resistance. The nitrothiazolic derivative nitazoxanide (NTZ) is an effective drug used for treatment of several helminth and protozoa diseases, as well as against bacteria and viruses. Several studies have demonstrated the leishmanicidal activity of NTZ. These findings led us to evaluate the *in vitro* activity of Allopurinol and NTZ on intracellular amastigotes of *(L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi*. The treatment with Allopurinol resulted in a significant reduction of *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages starting from 500 μM and the EC_{50} value on intracellular amastigotes was 1,053 μM . The leishmanicidal activity of Allopurinol on *L. (L.) infantum chagasi*-infected macrophages was significant starting from 50 μM and the EC_{50} value was 211.3 μM . The selectivity index of Allopurinol was 5 and 25 on *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi*, respectively. The treatment with NTZ on *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages resulted in a significant reduction of the parasite load starting from 25 μM and the EC_{50} value was 52.73 μM , where as on *L. (L.) infantum chagasi* the EC_{50} was 36.75 μM . The selectivity index of NTZ on *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* was 3,5 e 5, respectively. Taken together, these findings showed that both drugs display an acceptable selectivity against these *Leishmania* species. However, the data showed that Allopurinol is significantly more selective on *L. (L.) infantum chagasi* and exhibited higher selectivity than NTZ against this *Leishmania* species. These findings indicated that it is worth evaluating the *in vivo* leishmanicidal activity of Allopurinol and NTZ. Furthermore, the present data opened perspectives to evaluate the effect of association of these drugs for the treatment of *Leishmania* infection which it is now being explored.

Palavras chave: Allopurinol. Antiparasitários. *Leishmania infantum*. *Leishmania mexicana*. Reposicionamento de medicamentos.

Key words: Allopurinol. Antiparasitics. *Leishmania infantum*. *Leishmania Mexicana*. Repositioning of medicines.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças com variado espectro clínico e diversidade epidemiológica. Estima-se a incidência de 12 milhões de casos de leishmanioses no mundo com mortalidade anual de 60.000. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 350 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de adquirir alguma forma da doença e anualmente surgem 2 milhões de novos casos (WHO, 2018).

Fatores como subdesenvolvimento e alterações ambientais, a exemplo do desmatamento, migrações humanas intensas e urbanização são determinantes para sua disseminação (WHO, 2018). A coinfeção *Leishmania*/HIV agrava ainda mais esse quadro, considerando o número de pessoas HIV positivas.

As leishmanioses são causadas por parasitas digenéticos do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) que se desenvolvem alternadamente em hospedeiros vertebrados mamíferos e insetos vetores representados por dípteros da sub-família Phlebotominae (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas).

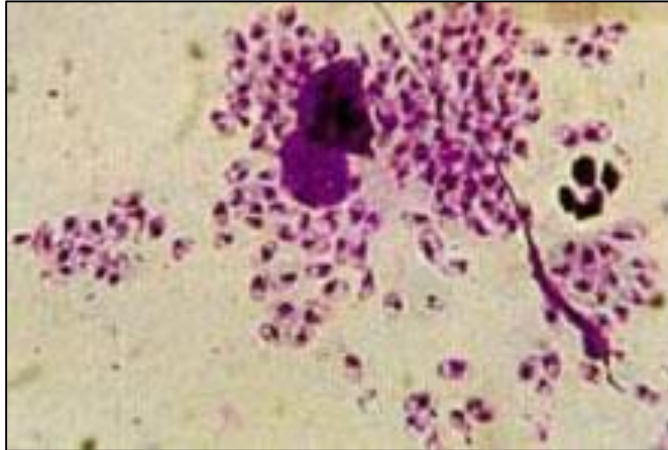
Figura 1 – O inseto vetor denominado flebótomo, também conhecido como birigui ou mosquito-palha



Fonte: (CRUZ; ROMILDO, 2014)

Nos hospedeiros mamíferos, entre eles o homem, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente no interior de células do sistema monocítico fagocitário em um vacúolo parasitóforo (Figura 2).

Figura 2 – Formas amastigotas de *Leishmania sp* no interior de macrófagos



Fonte: (BRASIL, 2018)

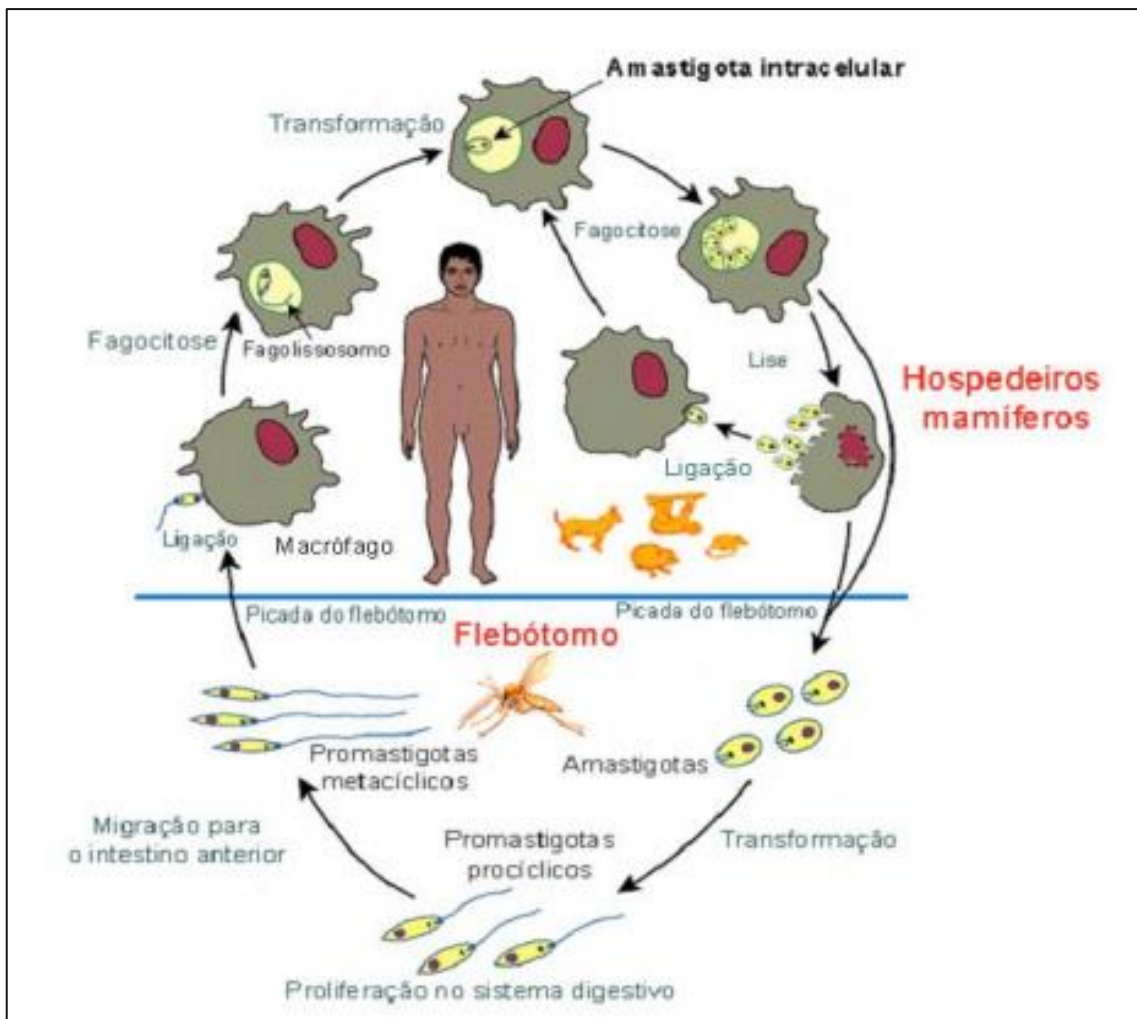
À medida que os amastigotas se multiplicam por divisão binária os macrófagos se rompem liberando os parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Nos insetos vetores os parasitas vivem no trato digestivo onde as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo diferenciam-se em promastigotas (Figura 3), formas alongadas, móveis e flageladas que são regurgitadas durante a picada na pele dos mamíferos, completando o ciclo (Figura 4).

Figura 3 – Formas promastigotas de *Leishmania sp*



Fonte: (LIMA, 2010)

Figura 4 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Entre os hospedeiros mamíferos destacam-se o homem e os vários reservatórios das leishmanioses



Fonte: Adaptado de (HANDMAN, 2001)

Esse parasita caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA (SIMPSON, 1987; WIRTH, 1990). Esta organela localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo, tendo sido muito estudada no gênero *Leishmania* (CHAKRABARTY E COLS., 1962). A molécula de DNA do cinetoplasto é formada por uma rede de 20 mil a 30 mil minicírculos, intimamente associados; e de maxicírculos, correspondente ao DNA mitocondrial encontrado nas demais células eucarióticas. Os maxicírculos são responsáveis por codificar as diversas proteínas da cadeia respiratória que ocorrem na mitocôndria, entre elas as subunidades da citocromo oxidase e NADH desidrogenase, não se diferenciando, assim, das demais células eucariotas; já os minicírculos estão relacionados à necessidade de mais ou

menos edição de mRNA de cada organismo, participando de um processo que regula pós-transcricionalmente a expressão de genes mitocondriais nas diferentes formas evolutivas do protozoário. Atualmente são estudadas proteínas (KAP), relacionadas à alteração fenotípica, cujos genes se encontram no cinetoplasto. Outros estudos da atualidade estudam genes contidos no cinetoplasto como o TcADH, que regulam a atividade metabólica celular, cujo efeito causa a resistência ao tratamento por fármacos.

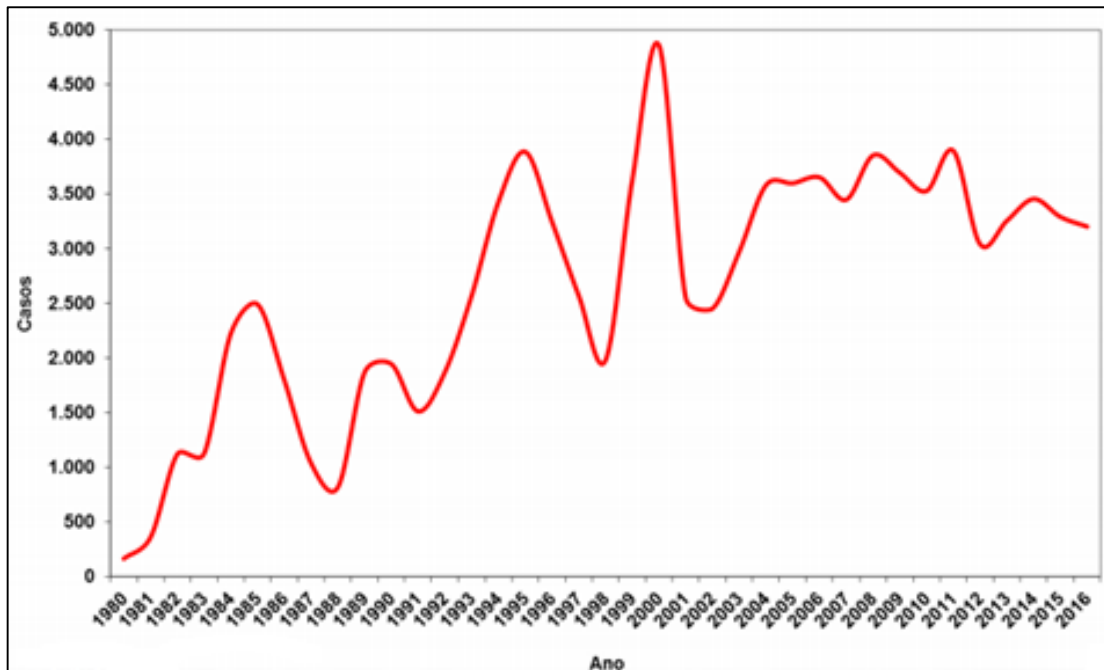
Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem. Suas manifestações clínicas são dependentes da espécie, carga parasitária e imunidade adquirida durante a infecção. No Brasil, 4 espécies principais podem ser citadas: *L. (L.) infantum chagasi*, agente causador da leishmaniose visceral; *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causadora da leishmaniose cutânea e mucocutânea; *L. (V.) guyanensis* que produz lesões cutâneas ulcerosas e *L. (L.) amazonensis* responsável pelo desenvolvimento de lesões cutâneas nodulares que podem evoluir para a forma cutânea difusa.

A leishmaniose visceral (LV) é a mais severa das formas e um grave problema de saúde pública. No Brasil, o inseto díptero *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor responsável por sua transmissão. Raposas dos gêneros *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyonthous*, além de marsupiais (gênero *Didelphis albiventris*) têm sido apontados como reservatórios silvestres. No ambiente urbano, os cães são o principal reservatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A LV é uma doença crônica e debilitante, tendo o parasita tropismo pelo sistema mononuclear fagocítico do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. Caracteriza-se por episódios febris, hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia e micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos. Apresenta caráter consumptivo que pode levar à morte se não tratada precocemente.

Em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de casos de LV (1.806); seguida pelas regiões Sudeste (538); Norte (469); Centro-Oeste (157); e Sul (5). Em relação à LT, a região Norte registrou o maior número de casos (8.939) dessa doença; seguida do Nordeste (5.152); Centro-Oeste (2.937); Sudeste (1.762); e Sul (493) (PORTAL BRASIL, 2017).

Em 2016 foram registrados no Brasil 3.200 casos de LV com incidência de 1,55 a cada 100.000 habitantes (Gráfico 1). Neste mesmo ano a letalidade chegou a 7,8%. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017).

Gráfico 1 - Casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2016



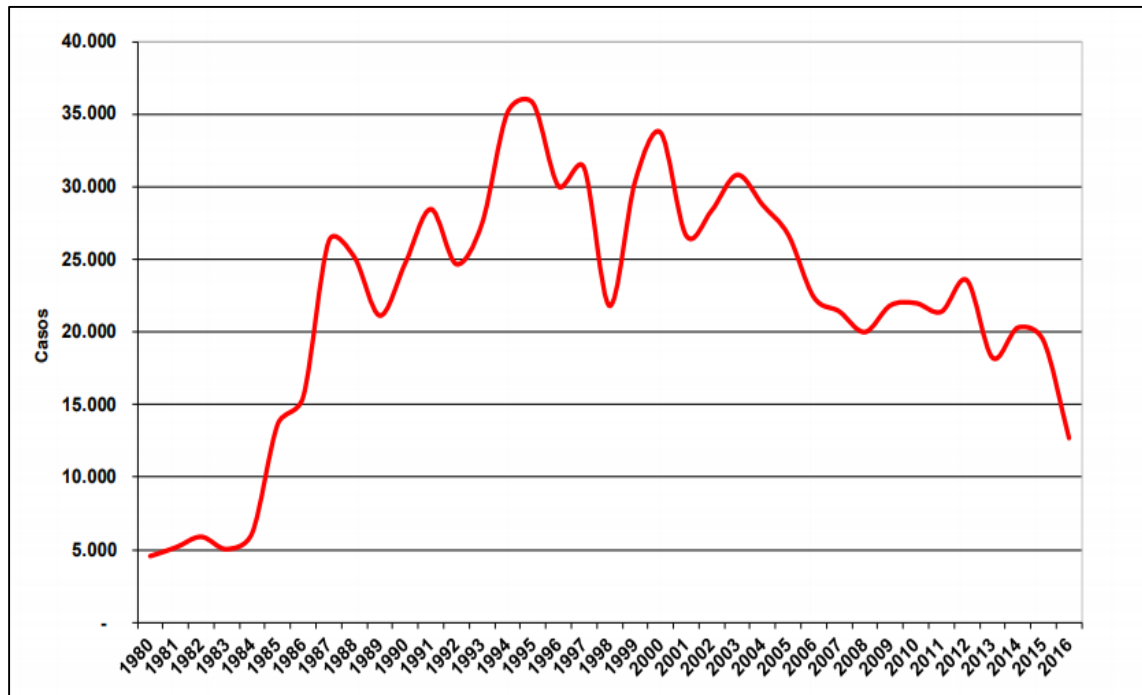
Fonte: (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017)

A doença, desde então, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente nos centros urbanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LV apresenta várias manifestações clínicas, a forma cutânea localizada com lesões ulcerosas únicas ou múltiplas; a forma mucocutânea caracterizada por lesões mucosas agressivas que afetam a região nasofaríngea; a forma disseminada com múltiplas úlceras cutâneas; a forma difusa com lesões nodulares não ulceradas.

As formas cutâneas das leishmanioses são amplamente distribuídas, com ocorrência nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Ásia e Oriente Médio. No Brasil foram registrados 12.690 casos de leishmaniose tegumentar (LT) no ano de 2016, com incidência de 6,16 casos a cada 100 mil habitantes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, 1980 a 2016



Fonte: (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017)

No Brasil as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. Apresentam como reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. Cães, gatos e equinos são considerados reservatórios domésticos acidentais da doença.

Nos cães, a doença é sistêmica crônica e pode levar o animal à morte. Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (GONTIJO; MELO, 2004).

A LV segue apresentando uma ampla distribuição geográfica de casos humanos no Brasil, onde se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Da mesma forma, a dispersão geográfica segue ocorrendo no Paraguai e Argentina, nas fronteiras com o Brasil e Uruguai. Em 2016, também observamos uma dispersão em Roraima, Norte do Brasil, onde foram registrados casos nas áreas de fronteira com

a Venezuela, o que requer uma maior atenção e fortalecimento da vigilância nos municípios desses países (PAHO, 2018).

Com a urbanização da LV aos grandes centros urbanos, onde ocorrem os maiores números de casos da doença no Brasil, o uso individual deste indicador vem mostrando limitações quando se requer direcionar ações de vigilância e controle para alcançar uma grande diminuição de casos de LV. Analisando os dados regionais, as cinco maiores incidências de LV foram reportadas no Brasil, nos seguintes municípios: Uiramutã – RR (144,87 casos/100.000 hab.); Nova Guataporanga – SP (87,11 casos/100.000 hab.); Redenção – PA(80,84 casos/100.000 hab.); Carmolândia – TO (79,02 casos/100.000 hab.) e Avelino Lopes – PI (78,46 casos/100.000 hab.) (PAHO, 2018).

Recentemente, Porto Alegre e Florianópolis registraram casos de leishmaniose visceral humana pela primeira vez na história. A primeira morte na capital gaúcha foi registrada em setembro de 2016. Nos meses seguintes, foram detectados quatro novos casos em Porto Alegre. Três pessoas morreram (TAÍS SEIBT, 2017).

Segundo Mariana Teixeira, doutora em Ciências Veterinárias com ênfase em Parasitologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a expansão desordenada das cidades, assim como mudanças climáticas também podem estar relacionadas ao aparecimento da doença nas regiões metropolitanas gaúcha e catarinense (TAÍS SEIBT, 2017).

Mas casos em animais domésticos já ocorrem desde 2008 - os primeiros foram registrados em São Borja, na fronteira do Rio Grande do Sul com a Argentina. Perda de peso, aparecimento de feridas ou descamações de pele, queda anormal de pelos, inchaço das pernas e sangramento do nariz são efeitos da leishmaniose visceral em cachorros. No entanto, a doença pode ser assintomática em muitos casos. Mesmo que o cão não apresente os sintomas típicos da leishmaniose, ele pode ser um intermediário da transmissão apenas pela presença do protozoário no organismo (TAÍS SEIBT, 2017).

O Ministério da Saúde orienta evitar construir casas e acampamentos em áreas muito próximas à mata; fazer dedetização, quando indicada pelas autoridades de saúde; evitar banhos de rio ou de igarapé, localizado perto da mata; utilizar repelentes

na pele, quando estiver em matas de áreas onde há a doença; usar mosquiteiros para dormir; usar telas protetoras em janelas e portas; e eliminar cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, para evitar o aparecimento de casos humanos (mas esta ação ainda causa muita polêmica e discussão) (PORTAL BRASIL, 2017).

Para a bióloga Cíntia Petrosky, o caso da leishmaniose é similar ao da dengue, da zika e da chikungunya, que teriam seu risco significativamente reduzido com medidas básicas de higiene e melhores condições de saneamento. "Essas são chamadas doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde. A leishmaniose é negligenciada mesmo, porque quase nem se fala sobre ela", conclui (TAÍS SEIBT, 2017).

1.2. Tratamento das leishmanioses

O antimonial pentavalente é considerado o fármaco de primeira linha para o tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, sendo encontrado sob duas formas, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan), dos quais o mais utilizado no Brasil é o Glucantime. Tais compostos são utilizados há aproximadamente 60 anos e sua eficácia atinge 80% dos pacientes, sendo administrados por via intramuscular ou endovenosa (NAGLE et al., 2014). Fatores como toxicidade, administração parenteral por mais de 30 dias e baixa eficácia em pacientes imunossuprimidos, como é o caso dos pacientes HIV positivos, dificultam a sua utilização. Além disso, complicações resultantes do uso do Glucantime estão relacionadas ao aumento da mortalidade em pacientes HIV positivos, comparada à observada com o tratamento desses pacientes com outros fármacos (NAGLE et al., 2014; GAZANION et al., 2011; GONÇALVES et al., 2005).

Nos casos de resistência aos antimoniais alternativas terapêuticas como anfotericina B e pentamidina são rotineiramente utilizadas como tratamento de segunda linha (GOTO; LINDOSO, 2010). A anfotericina B é hoje a segunda opção mais adotada no tratamento da leishmaniose visceral (LV) quando não há resposta à terapia com antimonial. Originalmente desenvolvida como um antifúngico sistêmico mostrou grande eficiência no combate às leishmanioses, porém deve ser cuidadosamente administrada devido à sua toxicidade (MEYERHOFF, 1999; ROBINSON; NAHATA, 1999). Formulações lipídicas da anfotericina B são eficazes

em baixas doses apresentando toxicidade reduzida, mas o seu alto custo dificulta o tratamento de pacientes em regiões de baixa renda (NAGLE et al., 2014).

A pentamidina é uma diamina aromática que tem sido utilizada nos casos de LV resistentes ao tratamento com antimoniais. Entretanto, recentemente a resistência à pentamidina foi também descrita, não sendo rotineiramente utilizada para o tratamento da LV na Índia (BRAY et al., 2003; SUNDAR, 2001).

A miltefosina, inicialmente desenvolvida como fármaco antitumoral, mostrou grande eficácia para o tratamento da LV na Índia e da leishmaniose cutânea na Colômbia (SUNDAR et al., 2002; SOTO et al., 2004), apresentando, porém, teratogenicidade e indução de resistência parasitária após longo período de exposição ao fármaco, limitando a sua utilização (CROFT; COOMBS, 2003).

A paramomicina é outro medicamento que se encontra em testes clínicos, estando os ensaios em Fase III na Índia e África Oriental. É efetiva no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, mas apresenta grande variação de sensibilidade dependendo da espécie do parasita (THAKUR, 2000).

A sitamaquina, outro fármaco de administração oral, é derivada de 8 aminoquinolinas e os testes da fase II na Índia demonstraram a sua eficácia contra a LV, porém alguns efeitos colaterais foram observados após a sua administração (JHA et al., 2005).

Diante de tal cenário, é imperativo o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses. Entre as várias estratégias visando ao estabelecimento de novos esquemas terapêuticos para as leishmanioses pode-se citar a extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de compostos já existentes, síntese de novos compostos, imunoquimioterapia e associação e reposicionamento de fármacos. O reposicionamento é uma tendência na busca de novos medicamentos para as leishmanioses, principalmente devido a que a pesquisa de compostos ativos contra doenças negligenciadas não desperta grande interesse da indústria farmacêutica por atingir populações de baixa renda. O reposicionamento consiste em encontrar novas indicações terapêuticas para fármacos já aprovados no mercado, assim redefinindo a sua utilização. Tal abordagem reduz substancialmente os custos normalmente dispendidos com a introdução de

novos medicamentos no mercado, já que os dados de segurança e eficácia desses fármacos se encontram disponíveis (MESQUITA, 2013).

Entre os fármacos introduzidos no mercado com ampla utilização no tratamento de parasitoses encontra-se a nitazoxanida [2-acetolioxi-N-(5-nitro 2- tiazolil) benzamida (NTZ)], conhecida comercialmente como Anitta. A NTZ é um derivado nitrotiazólico inicialmente descrito em 1984 como cestocida humano e eficaz com apenas uma dose contra *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana* (ROSSIGNOL et al., 1984). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficácia da NTZ contra helmintos, protozoários, bactérias e vírus (VAZQUEZ et al., 2011).

Recentemente, Mesquita e colaboradores (2013) demonstraram sua atividade sobre formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em concentrações idênticas às da Miltefosina. Além disso, foi demonstrada sua eficácia sobre formas amastigotas em concentrações similares às da Miltefosina e 3 vezes menores que a do Glucantime. A atividade leishmanicida da NTZ foi também demonstrada *in vivo* sobre camundongos infectados com a *L. (L.) donovani*, apresentando redução de 85% da carga parasitária após o tratamento oral com esse fármaco (ZHANG et al. 2010). No homem foi utilizada por via oral para o tratamento de um portador de *L. (L.) tropica*, tendo levado à resolução das lesões sem registro de efeitos adversos (GURGEN, 2011).

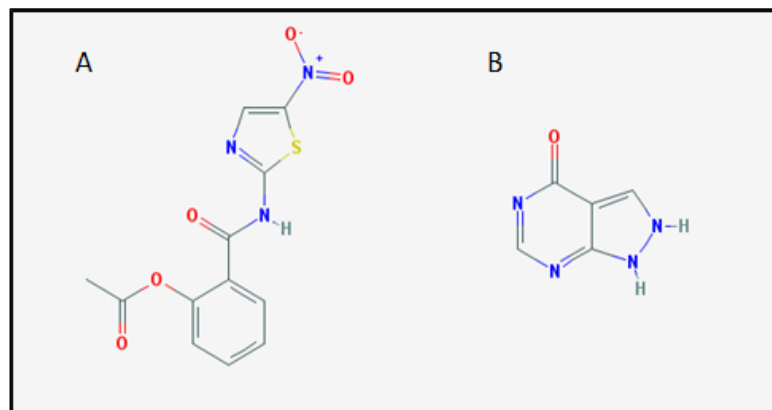
Quanto ao possível mecanismo de sua ação, a análise ultra estrutural de promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* tratados com a NTZ mostrou alterações em nível de mitocôndria, tais como inchaço da organela e desaparecimento da membrana, seguido pelo surgimento de progressivos vacúolos no citosol, ruptura da membrana nuclear e condensação da cromatina (ZHANG et al. 2010; MESQUITA et al., 2013). Estudos avaliando a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e exposição de fosfatidilserina confirmaram a indução de apoptose após o tratamento com a NTZ (MESQUITA et al., 2013).

Antimetabólitos de purina são amplamente utilizados no combate a uma série de doenças e representam alternativas promissoras para o tratamento de diversas protozoonoses (AL SALABI et al., 2005). O Alopurinol, um análogo de purina inibidor da xantina oxidase, é clinicamente utilizado em pacientes com gota, reduzindo a concentração plasmática de ácido úrico nesses pacientes. A atividade leishmanicida

do Alopurinol foi inicialmente descrita em 1974 por Pfaller e Marr, sendo atribuída à inibição da enzima hipoxantina-guanidinafosforiltransferase (HGPRT). É considerado o tratamento de primeira linha no combate à leishmaniose visceral canina (LVC), apresentando baixo custo e segurança aos animais tratados (GINEL et al., 1998).

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia do Alopurinol sobre formas promastigotas de *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, inibindo seu crescimento. Recentemente foi demonstrada a atividade do Alopurinol sobre amastigotas intracelulares de *L. (L.) tropica* resistentes à ação do Glucantime (REZAEI et al., 2013) e de *L. (L.) donovani* (NEAL et al., 1985). No homem, o Alopurinol foi utilizado por via oral para o tratamento de pacientes infectados com a *L. (V.) panamensis*, tendo levado à resolução das lesões em 80% dos pacientes tratados e sem registro de efeitos adversos importantes (MARTINEZ et al., 1992). Na Figura 5 está representada a fórmula estrutural da NTZ e do Alopurinol.

Figura 5 - Representação estrutural da nitazoxanida (C₁₂H₉N₃O₅S) (A) e do Alopurinol (C₅H₄N₄O) (B)



Fonte: (PUBCHEM, 2018)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Com base nas evidências prévias da ação leishmanicida da NTZ e do Alopurinol, o objetivo do presente estudo foi comparar a atividade *in vitro* desses compostos sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

2.2. Objetivo específico

1. Determinação da Concentração Efetiva de 50% (CE₅₀) do Alopurinol e da NTZ sobre as formas amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.
2. Avaliação da citotoxicidade dos dois compostos em culturas de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos BALB/c.
3. Determinação do índice de seletividade desses compostos sobre as duas espécies de *Leishmania* estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos fármacos

O análogo de purina Alopurinol foi obtido da Sigma Aldrich. O derivado nitrotiazólico Nitazoxanida foi adquirido da empresa Farmacoquímica/SA sob o nome comercial de Annita®.

3.2. Animais de experimentação

Hamsters Golden de ambos os sexos com 6-10 semanas de idade foram adquiridos da empresa ANILAB, Paulínia, São Paulo. Camundongos BALB/c fêmeas de 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.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP 2474200617e 3451200617).

3.3. Obtenção das formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*

As cepas MHOM/BR/71973/M2269 da *L. (L.) amazonensis* e MHOM/BR/1972/LD da *L. (L.) infantum chagasi* utilizadas para a realização dos experimentos foram provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém, PA, Brasil) e gentilmente cedidas pelo Dr. Jeffrey J. Shaw. As formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* foram isoladas de lesão de pata de hamsters previamente infectados (4×10^7 parasitas/pata). As lesões obtidas após 4-8 semanas de infecção foram retiradas e recortadas com bisturi, colocadas em PBS e centrifugadas a $250 \times g$ por 10 minutos. O número de amastigotas presentes no sobrenadante obtido foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer.

As formas amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* foram isoladas de baço de hamsters previamente infectados com 1×10^8 parasitas por injeção intraperitoneal de acordo com o protocolo descrito por Barbiéri et al., 1990. Dois meses após a infecção os animais foram submetidos à eutanásia, os baços foram retirados e homogeneizados com pistilo. As células foram ressuspensas em PBS e centrifugadas

a 250 x g por 5 minutos. O número de amastigotas presentes no sedimento obtido foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer.

3.4. Cultivo de macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c e infecção com formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*

Os macrófagos foram isolados do fêmur dos camundongos BALB/c. Após a dissecação das patas traseiras e isolamento dos ossos, as extremidades dos mesmos foram cortadas, colocando-os em placa de Petri estéril contendo PBS. Cerca de 2 mL de RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado a 56°C (R10) foram injetados com seringa no fêmur isolado, pressionando o meio no interior do osso para a obtenção de todo o conteúdo da medula. Foi feito um “pool” das células isoladas da medula do qual foi separada uma alíquota de 1 mL que foi centrifugada a 250 x g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de ACK (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 100 µM), incubado à temperatura ambiente durante 7 minutos e novamente centrifugado a 210 x g por 5 minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de PBS e após diluição apropriada em cristal violeta (200µl das células + 50µl de cristal violeta 1 mg/mL em ácido acético 30%), as células foram contadas em câmara de Neubauer. Foram utilizadas 1x10⁶ células por lamínula de 13 mm de diâmetro inseridas em placas de 24 cavidades, utilizando por cavidade 500 µl de RPMI 1640 contendo HEPES 15 mM, bicarbonato de sódio 20 mM, L-glutamina 1 mM, soro de cavalo 10% previamente inativado a 56 °C durante 1 hora e 30% do sobrenadante de células L (L929). A diferenciação das células em macrófagos ocorre após 3-5 dias, incubando-se as culturas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após a diferenciação os macrófagos foram mantidos por 24 horas em R10 e infectados com amastigotas da *L. (L.) amazonensis* na proporção de 1:1 e *L. (L.) infantum chagasi* na proporção 3:1 (parasita: macrófago) e mantidos a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂.

3.5. Avaliação da atividade leishmanicida do Alopurinol e da NTZ sobre macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*

Os ensaios com Alopurinol e NTZ *in vitro* foram realizados incubando-se um dos fármacos nas concentrações desejadas com os macrófagos 24 horas após a infecção com os amastigotas. As culturas permaneceram por 3 dias na presença dos

fármacos mantendo-as a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período os macrófagos foram fixados durante 10 minutos com metanol 100% e corados por 10 minutos com Giemsa (Amersham). Após a secagem, as lamínulas foram fixadas com Entelan (Amersham) em lâminas de vidro, os macrófagos foram visualizados ao microscópio óptico, procedendo-se às contagens com aumento de 1.000 X. A infecção foi expressa pelo índice de infecção (II) calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos infectados pela média do número de amastigotas por macrófago, sendo contados no mínimo 200 macrófagos por lamínula em triplicatas. A CE₅₀ do Alopurinole da NTZ sobre os amastigotas foi determinada utilizando-se o programa GraphPadPrism, versão 5.01. Como controle negativo do ensaio foram utilizados macrófagos infectados não tratados.

3.6. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c incubados com Alopurinol ou NTZ em diferentes concentrações durante 3 dias em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio] segundo o protocolo descrito por Dutta et al., 2005. Após o tratamento com os fármacos, as culturas de macrófagos infectados foram incubadas com MTT (Sigma-Aldrich) 5 mg/ml no escuro, a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ durante 4 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo MTT foi retirado e acrescentaram-se 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização total do formazan, o produto colorido resultante da clivagem do MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, sendo essa conversão realizada somente pelas células viáveis (Mosmann, 1983). Após a solubilização, todo o volume foi transferido para placas de 96 cavidades (Costar) e a absorbância foi lida a 540 nm utilizando-se microleitor de ELISA (LabsystemsMultiskan). A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) dos fármacos foi determinada utilizando-se o programa GraphPadPrism, versão 5.01. O índice de seletividade (IS) do Alopurinol e da NTZ foi determinado pela razão entre os valores da CC₅₀, sobre os da CE₅₀ desses fármacos previamente calculados, considerando-se valores significantes quando IS > 3.

3.7. Análise estatística

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

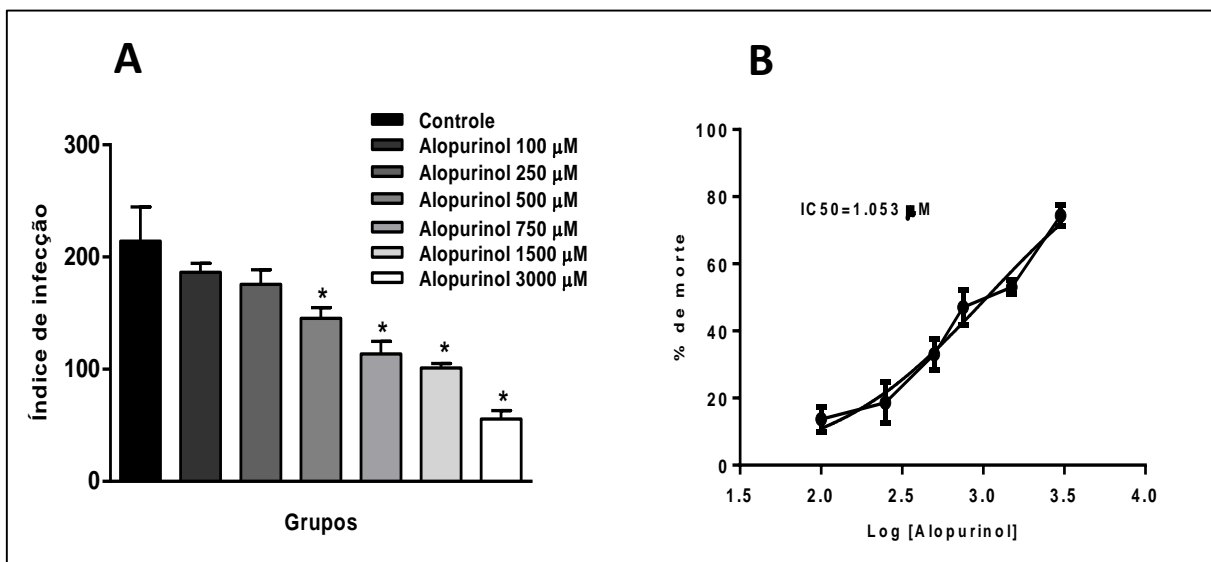
4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade leishmanicida do Alopurinol sobre macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis*

Os testes foram realizados em cultura de macrófagos de medula óssea de camundongos após 24 horas de infecção. Os ensaios foram feitos em triplicatas mantendo as culturas durante três dias em presença do Alopurinol nas várias concentrações testadas, utilizando como controle negativo culturas em meio R10 na ausência do fármaco.

Os resultados desse experimento são mostrados no Gráfico 3A, podendo-se observar que o Alopurinol apresentou efeito leishmanicida significativo a partir da concentração 500 μM . Às concentrações de 1500 μM e de 3000 μM essa a redução foi de 2 a 4 vezes em relação ao grupo sem tratamento e significantes às demais concentrações, sendo o valor da CE_{50} sobre os amastigotas intracelulares de 1.053 μM (Gráfico 3B).

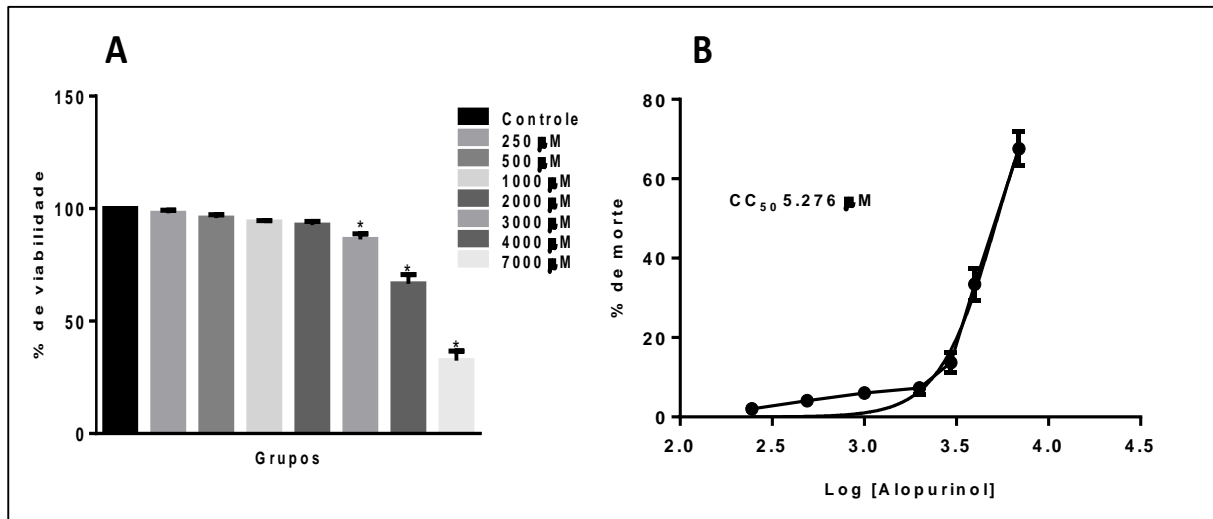
Gráfico 3: Efeito do Alopurinol sobre macrófagos de camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis* (A). Concentração efetiva de 50% (CE_{50}) do Alopurinol sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis* (B). * $P < 0,0001$.



Também foi avaliada a citotoxicidade do Alopurinol sobre os macrófagos e os resultados desses experimentos são mostrados no Gráfico 4. Pode-se observar que até à concentração 4 vezes maior do que a que destruiu significativamente os amastigotas intracelulares o Alopurinol não apresentou toxicidade aos macrófagos,

sendo o valor da CC_{50} de $5.276 \mu\text{M}$ (Gráfico 4A e B). A partir desse dado foi calculado o Índice de Seletividade sobre a *L. (L.) amazonensis* ($IS=5,0$).

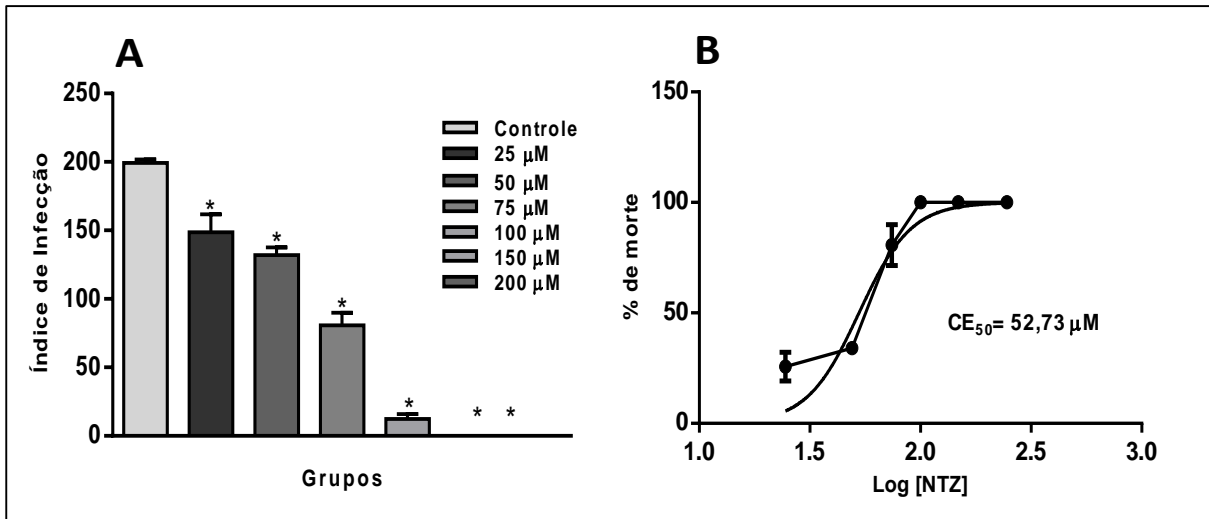
Gráfico 4: Efeito do Alopurinol sobre macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c (A). Determinação da CC_{50} do Alopurinol sobre macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c (B). * $P<0,0001$.



4.2 Avaliação da atividade leishmanicida da nitazoxanida sobre macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis*

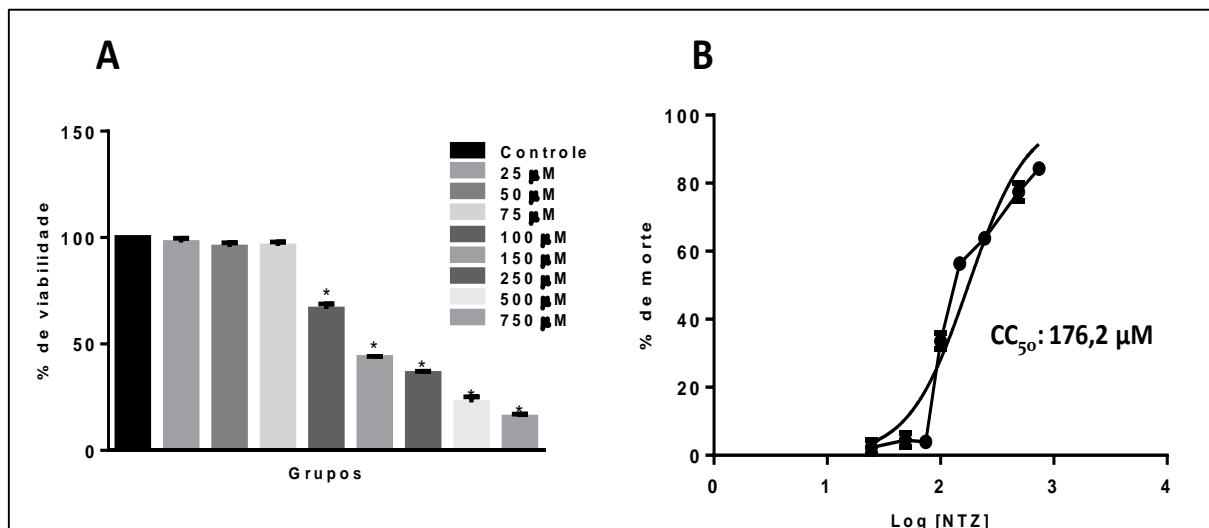
Os dados da avaliação da atividade da NTZ sobre macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* são mostrados no Gráfico 5. A partir da concentração de $25 \mu\text{M}$ houve redução significativa da carga parasitária dos macrófagos e com $100 \mu\text{M}$ essa redução foi de 13 vezes em relação ao grupo sem tratamento. Com $150 \mu\text{M}$ e $200 \mu\text{M}$ a NTZ destruiu 100% dos parasitas intracelulares (Gráfico 5A), sendo a CE_{50} sobre os amastigotas de $52,73 \mu\text{M}$ (Gráfico 5B).

Gráfico 5: Tratamento de macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* com diferentes concentrações da NTZ (A). Concentração efetiva de 50% (CE₅₀) da NTZ sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis* (B). **P*<0,0001.



Em seguida procedeu-se aos experimentos de citotoxicidade da da NTZ sobre os macrófagos de medula óssea de camundongos. Demonstrou-se que a NTZ não apresentou toxicidade aos macrófagos até concentrações 4 vezes maiores do as que apresentaram atividade leishmanicida significativa sobre os amastigotas intracelulares (Gráfico 6A). No Gráfico 6B é mostrada a CC₅₀ da NTZ sobre os macrófagos (176,2 µM). A partir desse dado foi calculado o índice de seletividade da NTZ sobre a *L. (L.) amazonensis*, sendo de 3,3.

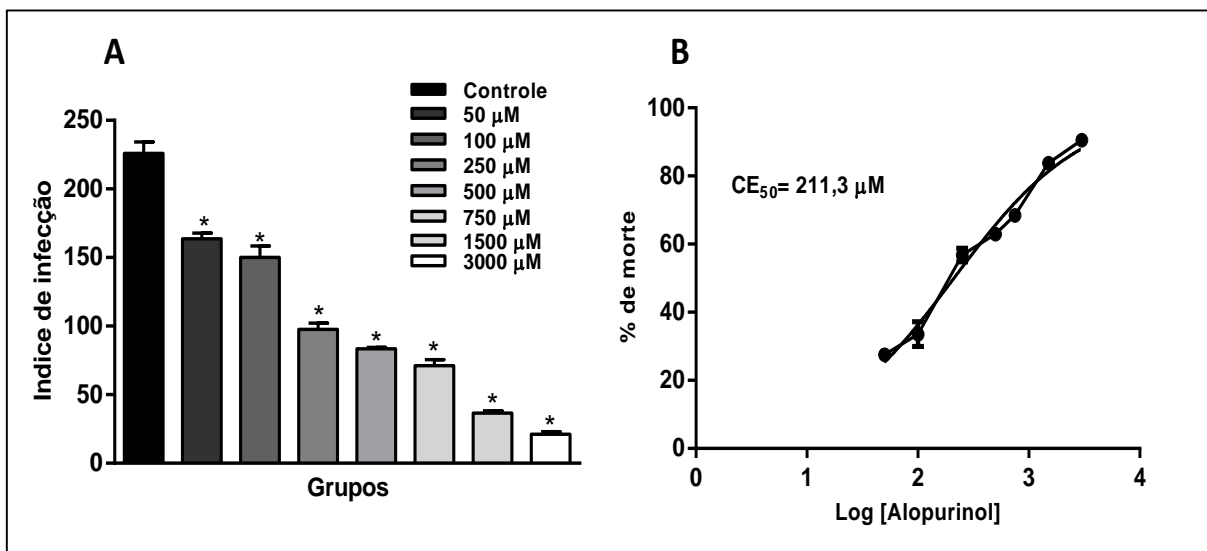
Gráfico 6: Tratamento de macrófagos de medula óssea de camundongo BALB/c com diferentes concentrações da NTZ. (A). Determinação da CC₅₀ da NTZ sobre macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c (B). **P*<0,0001.



4.3 Avaliação da atividade do Alopurinol sobre macrófagos infectados com a *L. (L.) infantum chagasi*

Os dados da ação do Alopurinol sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) infantum chagasi* são mostrados no Gráfico 7. Pode-se observar que o Alopurinol apresentou efeito leishmanicida significativa a partir da concentração de 50 μM , sendo a redução dos parasitas intracelulares gradativamente maior com concentrações crescentes do fármaco, sendo essa redução de 6 e 9 vezes, respectivamente, às concentrações de 1.500 e 3.000 μM (Gráfico 7A). O valor da CE_{50} do Alopurinol sobre os amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* foi de 211,3 μM (Gráfico 7B).

Gráfico 7: Tratamento de macrófagos infectados com a *L. (L.) infantum chagasi* com Alopurinol (A). Concentração efetiva de 50% (CE_{50}) do Alopurinol sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) infantum chagasi* (B). * $P < 0,0001$.

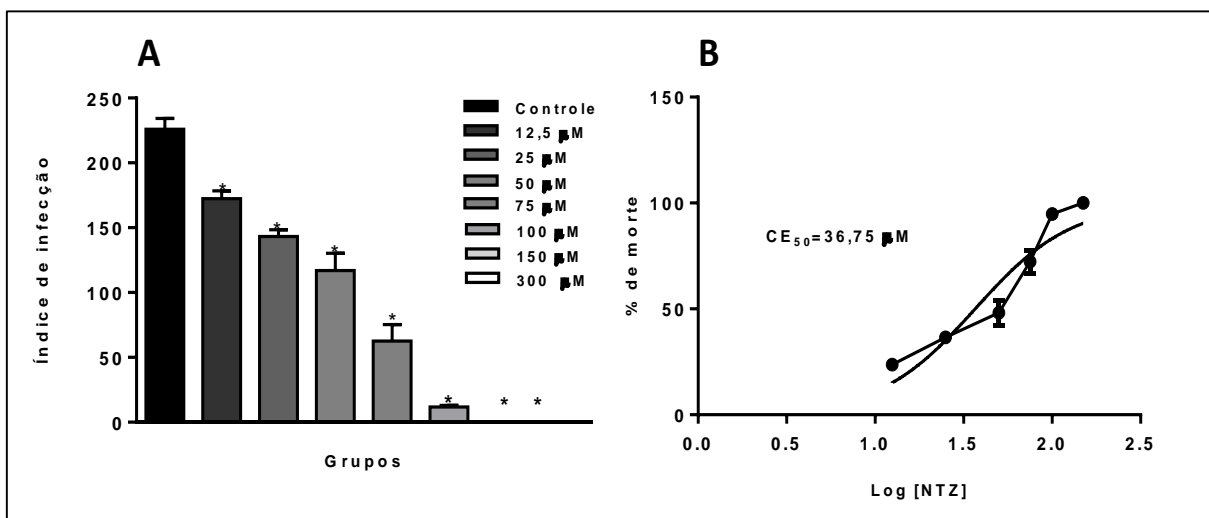


A partir da determinação dos valores da CE_{50} do Alopurinol sobre os amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* e da CC_{50} sobre os macrófagos previamente determinada (Gráfico 4B) foi calculado o seu índice de seletividade para esse parasita, sendo de 25.

4.4 Avaliação da atividade leishmanicida da nitazoxanida sobre macrófagos infectados com *L. (L.) infantum chagasi*

A infecção pela *L. (L.) infantum chagasi* foi significativamente reduzida a partir de 12,5 μM da NTZ, sendo que à concentração de 100 μM essa redução foi de 15 vezes em relação aos controles sem tratamento. Semelhante aos resultados obtidos com o tratamento dos macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis*, a NTZ reduziu 100% a infecção pela *L. (L.) infantum chagasi* quando utilizada às concentrações de 150 μM e 300 μM (Gráfico 8A). O valor da CE_{50} sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) infantum chagasi* é de 36,75 μM (Gráfico 8B).

Gráfico 8: Tratamento dos macrófagos infectados com a *L. (L.) infantum chagasi* com diferentes concentrações da NTZ (A). Concentração efetiva de 50% (CE_{50}) da NTZ sobre os amastigotas intracelulares da *L. (L.) infantum chagasi* (B). * $P < 0,0001$.



A partir do valor da CC_{50} da NTZ sobre os macrófagos previamente determinado mostrado no Gráfico 6B (176,2 μM) foi calculado o seu índice de seletividade sobre a *L. (L.) infantum chagasi*, sendo de 4,8.

5. DISCUSSÃO

Doenças negligenciadas como as leishmanioses são apontadas como um importante problema de saúde pública, afetando milhares de pessoas todos os anos. Sua terapêutica é considerada um grande desafio, tendo em vista fatores como a toxicidade dos fármacos atualmente em uso e o aparecimento de resistência de *Leishmania* a vários desses compostos. Desta forma, o reposicionamento de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento das leishmanioses constitui uma alternativa promissora, promovendo a extensão de patentes a custo e tempo reduzidos. Dentro dessa perspectiva, o presente trabalho analisou a atividade leishmanicida da nitazoxanida (NTZ) e do Alopurinol.

Nossos dados demonstraram que a NTZ foi capaz de exercer atividade sobre a *L. (L.) amazonensis* em concentrações na ordem de micromolar e apresentou índice de seletividade satisfatório, pois não foi tóxica à célula hospedeira em concentrações até 3 vezes maiores do que as que promoveram atividade leishmanicida. A NTZ também exerceu atividade sobre a *L. (L.) infantum chagasi*, não sendo tóxica até concentrações 8 vezes maiores comparadas às que destruíram significativamente os parasitas intracelulares.

Esses resultados corroboram dados prévios da literatura que mostraram a ação da NTZ sobre a *L. (L.) donovani*, agente da leishmaniose visceral na Índia e África, abrindo a perspectiva de testar a sua ação sobre a leishmaniose visceral *in vivo*, principalmente no cão que é o reservatório epidemiologicamente importante da LV nos países do Mediterrâneo e nas Américas. Considerando que o cão não responde satisfatoriamente à terapia convencional da LV, a NTZ pode constituir uma alternativa promissora para o tratamento da doença canina. Além disso, a ação da NTZ demonstrada *in vitro* sobre a *L. (L.) amazonensis* abre a perspectiva da sua possível utilização também para o tratamento da leishmaniose cutânea, em concordância com os dados da literatura que demonstraram sua ação sobre a *L. (L.) tropica*, espécie causadora da leishmaniose cutânea no Velho Mundo (GURGEN, 2011).

Sabe-se que a NTZ inibe a piruvato ferredoxina oxidoreductase, enzima vital para o metabolismo intermediário em protozoários anaeróbicos como *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* (HOFFMAN et al., 2007). Os estudos demonstraram que ela é capaz de inibir os primeiros passos da reação da piruvato ferredoxina

oxidorreductase, bloqueando a formação de CO₂ e AcetilCoA (HOFFMAN et al., 2007). Fármacos capazes bloquear a forforilação oxidativa rapidamente promovem a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio que desempenham papel fundamental na indução de apoptose, pois são capazes de promover a transição da permeabilidade mitocondrial permitindo a liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) que participam de eventos necessários para completar o programa de morte celular.

Levando em conta a necessidade de novos alvos bioquímicos em *Leishmania*, a pesquisa por fármacos que afetam o metabolismo mitocondrial constitui uma interessante estratégia para busca de novos compostos terapêuticos contra protozoários. Sabendo-se que a sobrevivência de *Leishmania* depende do adequado funcionamento da mitocôndria e que nestes protozoários a mitocôndria é única, é promissor explorar fármacos que afetam essa organela, uma vez que esses parasitas têm capacidade reduzida de compensar os danos de uma mitocôndria danificada (MESQUITA, 2013). Além disso, tal mecanismo de ação permite menor risco de resistência parasitária, além da boa tolerabilidade e aceitabilidade da NTZ pelo hospedeiro (ZHANG et.al., 2010). Embora o mecanismo de ação da NTZ sobre a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (L.) infantum chagasi* não sejam conhecidos, estudos para elucidá-lo estão em andamento.

No presente estudo também foi investigada a ação do Alopurinol, um análogo de purina inibidor da xantina oxidase, sobre as formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. Foi demonstrado que esse fármaco apresentou atividade leishmanicida significativa sobre ambas as espécies, além de índice de seletividade satisfatório, não apresentando toxicidade à célula hospedeira até concentrações 6 vezes maiores do que as que promoveram atividade leishmanicida sobre *L. (L.) amazonensis* e até 60 vezes maiores sobre *L. (L.) infantum chagasi*.

Os dados apresentados corroboram estudos prévios que demonstraram a atividade desse fármaco sobre as formas amastigotas de um isolado de *L. (L.) tropica* resistente ao antimoniato de meglumina, tendo promovido a redução de 7,5 vezes do número de macrófagos infectados, assim como do número de amastigotas por macrófago que foi aproximadamente 10 vezes menor que o do grupo controle

(REZAEI et al., 2013). Sua atividade leishmanicida também foi reportada em pacientes portadores de *L. (V.) panamensis*, tendo levado à resolução das lesões em 80% dos casos sem registro de efeitos adversos importantes (MARTINEZ et al., 1992).

A atividade do Alopurinol na destruição dos amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* e o alto índice de seletividade sobre esse parasita corroboram a sua eficácia para o tratamento da leishmaniose visceral canina em concentrações não tóxicas para os animais. Entretanto, o tratamento com Alopurinol não leva à cura parasitológica dos cães e somente o tratamento intermitente com esse fármaco evita as recidivas da doença nos cães tratados. Por outro lado, a longa duração do tratamento potencialmente pode levar à seleção de resistência que foi recentemente demonstrada em *L. (L.) infantum chagasi* isolada de cães tratados com Alopurinol com recidiva da doença (YASUR-LANDAU et al., 2016).

Esses dados e os resultados do presente estudo que mostraram a ação da NTZ sobre a *L. (L.) infantum chagasi* abrem a perspectiva de testar o efeito da associação desses fármacos sobre a infecção por esse parasita. Esses ensaios estão em andamento em nosso laboratório e resultados prévios mostraram a possível ação sinérgica entre o Alopurinol e a NTZ na destruição dos amastigotas da *L. (L.) infantum chagasi*. Se confirmados, esses dados justificarão estender o tratamento da LVC com esses fármacos em associação com a expectativa de evitar as recidivas da doença recorrentes da terapia com o Alopurinol.

6. CONCLUSÃO

Considerando as doses de ambos os fármacos utilizados no homem, no caso do Alopurinol para o tratamento da gota, recomenda-se iniciar o tratamento com uma dose baixa 100 mg/dia a fim de reduzir os riscos de reações adversas. A dose deve ser aumentada somente se a resposta referente à redução de urato for insatisfatória. Se for requerida uma dosagem em função de mg/kg de peso corporal, a dosagem de 2 a 10 mg/kg de peso corporal por dia deve ser usada (TATIANA DE CAMPOS, 2018). No caso da NTZ para o tratamento de parasitoses, recomenda-se 7,5 mg por kg, duas vezes por dia (MARCIA WEISS I. CAMPOS, 2015).

Nota-se neste experimento que, as concentrações que obtiveram êxito em matar os amastigotas de ambas as espécies do parasita são significativamente menores às utilizadas nos tratamentos. Podendo ser testadas no tratamento da leishmaniose *in vivo* com menor potencial para toxicidade.

Apesar da diferença significativa entre o índice de seletividade do Alopurinol sobre as duas espécies estudadas, tendo-se demonstrado que esse índice é 5 vezes maior contra a *L. (L.) infantum chagasi*, verificou-se que ele é aceitável sobre a *L. (L.) amazonensis*, abrindo ainda mais perspectiva de testar a ação desse fármaco contra esse parasita *in vivo*.

É importante ressaltar ainda que efeito leishmanicida similar contra as duas espécies estudadas é obtido com Glucantime, o antimonial pentavalente frequentemente utilizado como o primeiro fármaco de escolha para o tratamento das leishmanioses. Entretanto, concentrações significativamente maiores de antimonial são necessárias para destruir os amastigotas dessas espécies comparadas às utilizadas no presente estudo (dados não mostrados) e um dos efeitos adversos do tratamento com antimoniais é a toxicidade principalmente devida às altas doses necessárias para a remissão das várias formas das leishmanioses.

Em conclusão, os resultados apresentados indicam a validade de estender esse estudo na infecção *in vivo* pelas duas espécies estudadas. Além disso, como já ressaltado, os dados abriram a perspectiva de avaliar o efeito da associação desses fármacos no tratamento da LVC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL SALABI, Koning HP. **Purine nucleobase transport in amastigotes of Leishmania Mexicana: involvement in allopurinol uptake.** Antimicrob Agents Chemother. Glasgow: American Society for Microbiology, 2005. 3682–3689 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Coordenação geral da Epidemiologia em Serviços.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. PREFEITURA DE SÃO PAULO. (Org.). **Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2018. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/control_de_zoonoses/lab_zoonoses/index.php?p=5652&>. Acesso em: 11 nov. 2018.

BRAY PG, Barret MP, Ward AS, Koning HP. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** [S.l]: Trends Parasitol: [s.n.], 2003. 232-239 p.

CASTELLANO, L. R. C. **Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms.** Universidad Central de Venezuela, 2005. Disponível em: <<https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/9254/1/va05017.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

CROFT SL, Coombs GH. **Leishmaniasis – Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** [S.l]: Trends Parasitol: [s.n.], 2003. 502-508 p.

CRUZ, Fernanda; ROMILDO, José (Ed.). **Cientistas da USP usam proteínas para eliminar a leishmaniose.** 2014. Disponível em: <<http://www.ebc.com.br/noticias/brasil/2014/11/cientistas-da-usp-usam-proteinas-para-eliminar-a-leishmaniose>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

DE SOUZA, F. S. P., **Caracterização da proteína TcKAP3 do cinetoplasto do protozoário Trypanosoma cruzi.** Repositório UFPR, 2009. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/20201/Dissertacao%20>

%20FLAVIA%20SA%20PEREIRA%20DE%20SOUZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
>. Acesso em: 22 nov. 2018.

DUTTA A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. **Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis.**India: ParasitolInt: [s.n.], 2005. 119-122 p.

GAZANION E, Vergnes B, Seveno M, et al. **In vitro activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations.**França:ParasitolInt: [s.n.], 2011. 60: 19-24 p.

GHALIB H.W., Whittle J.A., Kubin M., Hashim F.A., el-Hassan A.M., Grabstein K.H., Trinchieri G., Reed S.G. **IL-12 enhances Th1-type responses in human Leishmaniadonovani infections.**Sudão: J. Immunol.: [s.n.], 1995. 154: 4623-4629 p.

GINEL PJ, Lucena R, López R, Molleda JM. **Use ofallopurinolfor maintenance of remission in dogs withleishmaniasis.** [S.l.]: [s.n.], 1998. 39: 271-274 p.

GOMES-PEREIRA S., Rodrigues O.R., Rolao N., Almeida P.D., Santos-Gomes G.M. **Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to Leishmania infantum infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production.**Lisboa: FEMS Immunol. Med. Microbiol.: [s.n.], 2004. 41: 59-68 p.

GONÇALVES GS, Fernandes AP, Souza RC, et al. **Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis.**Belo Horizonte: Acta Trop, 2005. 93: 161-167 p.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.**2004. Disponível em: <https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S1415-790X2004000300011&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 11 nov. 2018.

GOTO H, Lindoso JA. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneousleishmaniasis.** São Paulo: Expert Rev Anti Infect Ther: [s.n.], 2010.8: 419-433 p.

GURGEN J, Hogan D, Grace E, et al. **Nitazoxanide in the treatment of chronic cutaneous leishmaniasis resistant to traditional sodium stibogluconate.** India: J Am Acad Dermatol: [s.n.], 2011. 64:202-3 p.

HANDMAN E. **Leishmaniasis: current status of vaccine development.** Australia: Clin Microbiol Rev: [s.n.], 2001. 14: 229-243 p.

HOFFMAN PS1, Sisson G, Croxen MA, et al. **Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of Helicobacter pylori, selected anaerobic bacteria and parasites, and Campylobacter jejuni.** Zaragoza: Antimicrob Agents Chemother: [s.n.], 2007.51:868-76 p.

JHA, TK, Sundar S, Thakur CP, et al. **A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India.** India: Am. J. Trop. Med. Hyg: [s.n.], 2005 Dec. 73: 1005-1011 p.

LIMA, Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha. **Estudo da Variabilidade Genética de Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil.** 2010. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <<http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/351D.PDF>>. Acesso em: 11 nov. 2018.

MARCIA WEISS I. CAMPOS (Rio de Janeiro). Farmoquímica S/a. **Annita.** 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10362522015&pIdAnexo=2967875>. Acesso em: 11 nov. 2018.

MARTINEZ S, Marr J. **Allopurinol in the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis.** Inglaterra: N. Engl. J. Med: [s.n.], 1992. 326:741-744 p.

MELBY P.C., Tabares A., Restrepo B.I., Cardona A.E., McGuff H.S., Teale J.M. **Leishmaniadonovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection.** Texas: Exp. Parasitol.: [s.n.], 2001. 99: 17-25 p.

MESQUITA JT, Pinto EG, Taniwaki NN, et al. **Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in Leishmania (L.) infantum.** [S.I.]: Acta Trop, 2013.128:666-73 p.

MESQUITA JT. **Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum***. São Paulo: Tese de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2013.

MEYERHOFF A. U. S. **Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis**. San Dimas: ClinInfectDis: [s.n.], 1999. 28: 42-51 p.

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Palo Alto: J Immunol Methods: [s.n.], 1983. 65: 55-63 p.

NAGLE AS, Khare S, Kumar AB, et al. **Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis**. San Diego: Chem Rev: [s.n.], 2014. 114:11305-47 p.

NEAL RA, Croft SL, Nelson DJ. **Anti-leishmanial effect of allopurinol ribonucleoside and related compounds, allopurinol, thiopurinol, thiopurinolribonucleoside, and of formycin B, sinefungin and lepidine WR6026**. [S.I.]: Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene: [s.n.], 1985. 79: 122-128 p.

NEVES DP, et al. **Parasitologia humana**. 10. Ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 12ª edição, São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

PAHO (Org.). Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses**. Washington, p. 1-7. fev. 2018. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5>. Acesso em: 14 nov. 2018.

PFALLER, MA, Marr, JJ. **Antileishmanial effect of allopurinol**. Liverpool: Antimicrob Agents Chemother: [s.n.], 1974. 5: 469-472 p.

Portal Brasil (Org.). **Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção.** 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao#wrapper>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

REZAEI TR, Sharifi I, Miramin AM, et al. **Evaluation of a possible synergistic effect of MeglumineAntimoniate with Paramomycin, Miltefosine or Allopurinol on *in vitro* susceptibility of *Leishmaniatropica* resistant isolate.** Teerã: Iranian J Parasitol: [s.n.], 2013. 8:396-401 p.

ROBINSON RF, Nahata MC. **A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B.** Ohio: J Clin Pharm Ther: [s.n.], 1999. 24: 249-257 p.

ROSSIGNOL JF, Maisonneuve H. **Nitazoxanide in the treatment of *Taeniasaginata* and *Hymenolepis nana* infections.** [S.l.]:Am J Trop Med Hyg.: [s.n.], 1984. 33:511-2 p.

SOTO J, Arana BA, Toledo J, et al. **Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis.** Guatemala: Clin Infect Dis: [s.n.], 2004. 38: 1266-1272 p.

SUNDAR S. **Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.** India: Trop. Med. Int. Health.: [s.n.], 2001. 6: 849-854 p.

SUNDAR S, Jha TK, Thakur CP, et al. **Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis.** India: N Engl J Med: [s.n.], 2002. 347: 1739-1746 p.

TAÍS SEIBT (Porto Alegre). Bbc Brasil. **Por que a leishmaniose avança no sul do Brasil e o que os cães têm a ver com isso.** 2017. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-41753612>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

TATIANA DE CAMPOS (São Paulo). Medley Farmacêutica Ltda. **Alopurinol.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12524362016&pIdAnexo=3100939>. Acesso em: 11 nov. 2018.

THAKUR CP, Kanyok TP, Pandey AK, et al. **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.**[S.l.]:Trans R SocTropMedHyg: [s.n.], 2000. 94: 429-431 p.

VAZQUEZ N, Silva CF, Ramos AR, et al. **Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity.**Morelos:Bioorg Med Chem Lett: [s.n.], 2011. 21:3168-71 p.

YASUR-LANDAU D, Jaffe CL, David L, et al. **Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* dogs with disease relapse.**Jerusalém:Plos Neglected Tropical Diseases: [s.n.], 2016.

WHO. **Global Health Observatory Map Gallery.** Acesso em: 26 maio 2018.

ZHANG R, Shang L, Jin H, et al.**In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of nitazoxanide against *Leishmaniadonovani*.**Changchun:Parasitol Res: [s.n.], 2010. 107:475-9 p.

Avaliação Final do TCC

Trabalho de Conclusão de Curso

	Nome	Assinatura
Docente Orientador:	_____	_____
Alunos:	_____	_____
	_____	_____

Coerência do Objetivo X Metodologia:

Coerência do Objetivo X Resultado:

Mérito do Trabalho e Relevância da Discussão:

Atualização e Abrangência das Referências Bibliográficas:

Avaliação Final

() Ótimo () Bom () Regular () Ruim

