

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA,
TRIPANOCIDA DE DERIVADOS DE DIAMINAS**

CELINA NORIKO YAMANAKA

**FLORIANÓPOLIS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA,
TRIPANOCIDA DE DERIVADOS DE DIAMINAS**

CELINA NORIKO YAMANAKA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

**Orientadores: Prof. Dr. Mário Steindel
Profa. Dra. Iriane Eger**

**FLORIANÓPOLIS
2012**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

Y19a Yamanaka, Celina Noriko
Avaliação in vitro da atividade leishmanicida, tripanocida
de derivados de diaminas [dissertação] / Celina Noriko
Yamanaka ; orientador, Mario Steindel. - Florianópolis, SC,
2012.

71 p.: il., tabs., graf.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Chagas, Doença de. 3. Tripanossoma
cruzi. 4. Diaminas. 5. Leishmania brasiliensis. I. Steindel,
Mario. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

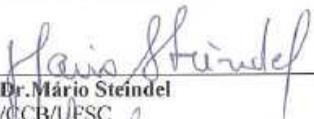
“Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida, tripanocida de derivados de diaminas.”

POR

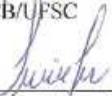
CELINA NORIKO YAMANAKA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientadores e membros da Comissão Examinadora.

Orientadores:

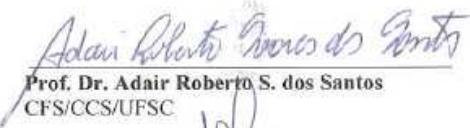


Prof. Dr. Mário Steindel
MIP/CCB/UFSC

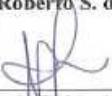


Prof. Dra. Iriane Eger
Univali

Comissão Examinadora:



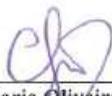
Prof. Dr. Adair Roberto S. dos Santos
CFS/CCS/UFSC



Prof. Dra. Michele Debiasi A. Magina
Farmácia/FURB



Prof. Dr. Alvaço José Romanha
MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Fevereiro de 2012.

Aos que dependem dos avanços na pesquisa para a redução de sua dor:

*"E guardemos a certeza pelas próprias dificuldades já superadas
que não há mal que dure para sempre."*

(Francisco C. Xavier)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e encorajamento que fui recebendo ao longo deste período. A todos deixo meu agradecimento.

Ao Professor Doutor Mário Steindel, pelo privilégio de tê-lo como orientador, pelos ensinamentos fundamentais, incentivo e apoio incondicional. Principalmente pela pessoa admirável. Aqui expresso o meu sincero agradecimento.

À Doutora Iriane Eger, minha co-orientadora preferida, pelo apoio imprescindível, pela confiança e disponibilidade sempre demonstradas e fundamentais na realização deste trabalho. Meus profundos agradecimentos e minha sincera amizade.

Ao Prof. Mauro Vieira de Almeida da UFJF e Profa Raquel Brandt Giordani da UFRN pela síntese das diaminas. O meu sincero agradecimento.

Ao meu amigo Maiko Tonini, pelo auxílio às infindáveis contagens das amastigotas e por sua sempre agradável companhia. Aos seus olhos, os meus agradecem.

Ao Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas pelo apoio inicial nas culturas de macrófagos e auxílio nos ensaios imunológicos. O meu sincero agradecimento ao Álvaro, Nicole e Stefanny.

Ao meu amigo, Prof. Eduardo M. Dalmarco responsável pela minha vinda ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, pelo auxílio às dosagens de NO. Meu profundo agradecimento.

Ao Prof. Ricardo José Nunes e Alessandra Mascarello pelo auxílio com as avaliações REA, disponibilidade e sugestões. Meu sincero agradecimento.

A todos os amigos que me deram apoio, antes e durante a minha recuperação cirúrgica. Meu carinho eterno.

A todas as pessoas com as quais compartilhei esses dois anos, àquelas que tiveram influência no meu trabalho direta ou indiretamente, por tudo o que aprendi e cresci. Ao Denis e Bibiana pelo apoio nas leituras e cinéticas no Tecan. A todos os companheiros de mestrado. Finalmente, um agradecimento especial à minha família, pelo amor incondicional e confiança depositada. A eles, dedico todo este trabalho.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antiparasitária intracelular e a citotoxicidade de diaminas sintéticas em macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi*. A perda do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) de formas epimastigotas de *T. cruzi*, a indução de TNF α e óxido nítrico e a inibição da enzima tripanotona redutase recombinante de *L. braziliensis* e *T. cruzi* foram utilizados para investigar possíveis mecanismos de ação dos compostos ativos. Dentre 17 diaminas estudadas, 13 inibiram a proliferação de formas promastigotas de *L. braziliensis* e 10 de epimastigotas de *T. cruzi* ($CI_{50} < 20 \mu M$). Destas, 12 foram ativas contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI_{50} de 2,6 a 28,2 μM) e 6 foram ativas contra formas intracelulares de *T. cruzi* (CI_{50} de 1,6 a 23,6 μM). A diamina DP23 foi a mais ativa contra *L. braziliensis* e *L. chagasi* (CI_{50} 2,6 e 3,0 μM e IS de >100 e $>115,4$, respectivamente). A diamina DP24 foi a mais ativa contra *T. cruzi* (CI_{50} 1,6 μM e IS $>187,5$). A CC_{50} para macrófagos variou de 149,5 a $>300 \mu M$. Diaminas cloridratadas foram mais citotóxicas que seus análogos não cloridratados. Quatro compostos (DP23Cl, DP25, RAG10 e RAG11) mostraram elevada citotoxicidade para macrófagos infectados em concentração $>10 \mu M$. A análise da estrutura e da lipofilicidade (logP) das diaminas mostrou que as estruturas com 15 a 17 carbonos metilênicos foram mais ativas enquanto que, estruturas com mais de 19 carbonos não apresentaram nenhuma atividade antiparasitária. A melhor atividade leishmanicida foi observada para as diaminas com valor de logP = 5,36, sugerindo que a atividade não depende somente da distribuição de carbonos metilênicos na molécula mas também do logP ideal. Epimastigotas tratados com o composto DP24 na concentração de 6 e 12 μM mostraram despolarização da membrana mitocondrial e morte celular a partir de 6 horas de incubação de forma dose-dependente. O tratamento de células infectadas com os compostos ativos não induziu níveis significantes de produção de TNF α e NO. Com relação a inibição das enzimas tripanotona redutase recombinante de *L. braziliensis* e *T. cruzi*, quatro compostos (DP23Cl, DP25, DP25Cl e RAG10) inibiram a atividade enzimática de LbTR entre 74,2 a 89,4% na concentração do 100 μM , enquanto que para a TcTR apenas o composto DP25Cl ocasionou inibição de 74,5% na concentração de 100 μM , sugerindo diferenças entre a tripanotona destas duas espécies de tripanosomatídeos. As diaminas avaliadas no presente estudo apresentaram potente efeito *in vitro* contra formas intracelulares de *Leishmania* spp e *T. cruzi* e podem ser consideradas moléculas líder para o desenvolvimento de novos compostos contra *Leishmania* e *T. cruzi*.

Palavras-chave: atividade leishmanicida, atividade tripanocida, diaminas, *Leishmania braziliensis*, *L. chagasi*, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antiparasitic activity and cytotoxicity of synthetic diamines in murine macrophages infected with *Leishmania braziliensis*, *L. chagasi* and *Trypanosoma cruzi*. The loss of mitochondrial membrane potential (ψ_m) of *T. cruzi* epimastigotes, the induction of TNF α and nitric oxide and inhibition of the recombinant trypanothione reductase of *L. braziliensis* and *T. cruzi* were used to investigate possible mechanisms of active compounds. Among 17 evaluated diamines, 13 inhibited the proliferation of *L. braziliensis* promastigotes and 10 inhibited *T. cruzi* epimastigotes ($IC_{50} < 20 \mu M$). Of these, 12 were active against intracellular amastigotes of *L. braziliensis* and *L. chagasi* (IC_{50} of 2.6 to 28.2 μM) and 6 were active against *T. cruzi* ($IC_{50} = 1.6$ to 23.6 μM). The compound DP23 was the most active compound against both *L. braziliensis* and *L. chagasi* ($IC_{50} = 2.6$ and 3.0 μM and SI > 100 and > 115.4) respectively. The compound DP24 was the most active against *T. cruzi* ($IC_{50} = 1.6 \mu M$ and SI > 187.5). The cytotoxicity CC_{50} for macrophages ranged from 149.5 to > 300 μM . Chlorinated diamines were more cytotoxic than their non-chlorinated analogs. Four compounds (DP23Cl, DP25, RAG10 and RAG11) showed high cytotoxicity for infected macrophages at a concentration > 10 μM . The analysis of the structure and lipophilicity (logP) of the diamines showed that structures with 15 to 17 methylenic carbons were more active while structures with more than 19 carbons did not present any antiparasitic activity. The higher leishmanicidal activity was observed for the diamine DP23 with a value of logP = 5.36 and 13-NH-4 distribution of methylenic carbon suggesting that the activity does not depend solely on the distribution of methylenic carbon atoms in the molecule but also depends on ideal logP value. Epimastigotes treated with the compound DP24 at a concentration of 6 and 12 μM demonstrated dose-dependent membrane depolarization and cell death starting at 6 hours of incubation. Treatment of cells infected with the active compounds did not induce significant levels of TNF α and NO production. Concerning the inhibition of the recombinant trypanothione reductase enzymes of *L. braziliensis* and *T. cruzi*, four compounds (DP23Cl, DP25, DP25Cl and RAG10) inhibited the enzymatic activity of *LbTR* between 74.2 to 89.4% at a concentration of 100 μM , whereas for *TcTR*, only the compound DP25Cl caused inhibition of 74.5% at the same concentration, suggesting differences between the trypanothione of these two species of trypanosomatids. The diamines evaluated in the study presented potent *in vitro* effect against intracellular forms of *Leishmania* spp and *T. cruzi* and therefore may be considered as leader molecules for developing new compounds against *Leishmania* and *T. cruzi*.

Keywords: leishmanicidal activity, trypanocidal activity, diamines, *Leishmania braziliensis*, *L. chagasi*, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manifestações clínicas de leishmanioses.....	5
Figura 2. Estruturas moleculares das poliaminas naturais.....	14
Figura 3. Representação esquemática da biossíntese de poliaminas....	15
Figura 4. Organograma dos ensaios de atividade antiparasitária e investigação de possíveis mecanismos de ação de diaminas.....	21
Figura 5. Representação esquemática da re-oxidação de tripanotona reduzida (T[S] ₂) mediada pelo DTNB	27
Figura 6. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com o composto DP23 em diferentes concentrações.....	30
Figura 7. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com <i>L. chagasi</i> e tratados com o composto DP23 em diferentes concentrações.....	31
Figura 8. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com o composto DP24 em diferentes concentrações.....	32
Figura 9. Relação da atividade antiparasitária (CI ₅₀) com a lipofilicidade (logP) das diaminas com distribuição de carbonos metilênicos -NH-4 e -NH-6.....	36
Figura 10. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) e viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após diferentes tempos de incubação com DP24.....	37
Figura 11. Dados de citometria de fluxo de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com DP24 em função da concentração do composto e do tempo de incubação.....	38

Figura 12. Níveis indiretos de produção de NO por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e *T. cruzi* e tratados com 10µM das diaminas DP23 e DP24.....39

Figura 13. Titulação das enzimas para a padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição.....40

Figura 14. Taxa de inibição da enzima tripanotona redutase recombinante pelas diaminas a 100 µM.....41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Compostos sintéticos derivados de diaminas.....18
- Tabela 2.** Atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* de derivados de diaminas frente a formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.....28
- Tabela 3.** Citotoxicidade e atividade dos compostos contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi* expressa em CI_{50} e índice de seletividade (IS) em relação ao macrófago murino.....33
- Tabela 4.** Relação da atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e *T. cruzi* com características químicas das diaminas: peso molecular (MM), lipofilicidade (logP) e distribuição dos carbonos metilênicos nas estruturas.....35

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS- 2,2-azino-di-3-etil sulfonato de bentiazolina
AdoMetDC- S-adenosilmetionina descarboxilase
AIDS- síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC- *American Type Culture Collection*
CI₅₀- concentração que inibe 50% do crescimento celular
DAB- 1,4-diamino-2-butanona
DFMO- alfa-difluorometilornitina
DMEM- *Dulbelcco's Modified Eagle Medium*
DMSO- dimetil sulfóxido
DNA- ácido desoxirribonucléico
DTN- doença tropical negligenciada
DTNB- *5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)* (reagente de Ellman)
EDTA- ácido etileno diamino tetracético
ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática
HEPES- Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HIV- vírus da imunodeficiência humana
IS- índice de seletividade
LbTR- tripanotiona redutase recombinante de *L. braziliensis*
LIT- *liver infusion tryptose*
LPS- lipopolissacarídeo
LTA- leishmaniose tegumentar americana
LV- leishmaniose visceral
MTT- 3-(4,5-dimetil tiazole-2-il)-2-5-difenil brometo de tetrazólio
NADPH- *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NO- óxido nítrico
ODC- ornitina descarboxilase
OMS- Organização Mundial de Saúde
PBS- tampão salina fosfato
PI- percentual de inibição
SBF- soro bovino fetal
SDS- dodecil sulfato de sódio
SpdS- espermidina sintase
T[S]₂- tripanotiona dissulfeto
T[SH]₂- tripanotiona ditiol
TcTR- tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi*
TNB- *2-nitro-5-mercaptobenzoic acid*
TNF α - fator de necrose tumoral - alfa
TR- tripanotiona redutase

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora

UFPR- Universidade Federal do Paraná

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Impacto das doenças tropicais negligenciadas no Brasil....	4
2.2	Leishmaniose.....	4
2.2.1	Tratamento das leishmanioses.....	7
2.3	Tripanossomíase americana.....	9
2.3.1	Tratamento da doença de Chagas.....	12
2.4	Diaminas.....	13
3	OBJETIVO.....	17
3.1	Objetivo geral.....	17
3.2	Objetivos específicos.....	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	Compostos.....	18
4.2	Parasitas.....	19
4.2.1	Amastigogênese de <i>Leishmania braziliensis</i>	19
4.2.2	Obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	19
4.3	Células.....	20
4.4	Bioensaios <i>in vitro</i>	20
4.4.1	Triagem das atividades leishmanicida e tripanocida.....	21
4.4.2	Avaliação da citotoxicidade.....	22
4.4.3	Atividade leishmanicida frente a formas amastigotas intracelulares em macrófagos murinos.....	23
4.4.4	Atividade tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em macrófagos murinos.....	24
4.4.5	Citometria de fluxo: avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) e lise celular em formas epimastigotas..	24
4.4.6	Dosagem da produção de NO.....	25
4.4.7	Dosagem de TNF- α	25
4.4.8	Ensaio de inibição da TR heteróloga de <i>T. cruzi</i> (<i>TcTR</i>) e <i>L. braziliensis</i> (<i>LbTR</i>).....	26
4.5	Determinação da lipofilicidade e avaliação estrutural dos compostos.....	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Triagem das atividades leishmanicida e tripanocida.....	28
5.2	Citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida frente a formas amastigotas intracelulares em macrófagos murinos.....	29

5.3	Correlação da atividade antiparasitária com a estrutura e lipofilicidade dos compostos.....	35
5.4	Avaliação do potencial de membrana (Ψ_m) em formas epimastigotas após tratamento.....	36
5.5	Ensaio de investigação de indução de TNF α e NO em macrófagos.....	39
5.6	Ensaio de inibição <i>in vitro</i> da tripanotona redutase recombinante de <i>T. cruzi</i> (TcTR) e de <i>L. braziliensis</i> (LbTR).....	40
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÕES.....	51
8	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE: Diaminas: Nomenclatura e estruturas químicas.....	69

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil é um dos países com a maior ocorrência de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). As doenças de maior prevalência são: malária, doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue, hanseníase, oncocercose e filariose linfática. O impacto dessas doenças difere de região para região mas apresenta uma estreita relação com as áreas de maior pobreza e menor desenvolvimento sócio-econômico, que no Brasil se concentram nas regiões Norte e Nordeste (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

As doenças parasitárias são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade humana nos países em desenvolvimento gerando elevados custos para o sistema de saúde. A complexidade eco-epidemiológica, associado as dificuldades no controle vetorial e a ausência de vacinas eficazes para uso humano, fazem do tratamento medicamentoso uma das únicas alternativas para enfrentar estes agravos de saúde. Além disso, o escasso arsenal quimioterápico disponível para tratamento destas doenças, somado a limitada eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados na clínica e o surgimento de parasitos resistentes aos quimioterápicos são problemas de ordem global (LINDOSO; LINDOSO, 2009). Onze das dezessete Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) priorizadas pela Organização Mundial da Saúde ocorrem de forma endêmica no Brasil. Dentre essas, malária, doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue e hanseníase são as DTNs que causam maior impacto social e econômico no país (WHO, 2006).

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias endêmicas em 88 países de quatro continentes que afetam aproximadamente 12 milhões de indivíduos, ocasionando anualmente cerca de 2 milhões de casos novos e 70 mil óbitos (WHO, 2010). A maior incidência da doença ocorre nas áreas mais pobres das regiões endêmicas visto que aproximadamente 80% dos portadores de leishmanioses recebem menos de 60 dólares por mês (DAVIES *et al.*, 2003). O Brasil ao lado de Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru, Índia, Bangladesh e Nepal integram o grupo de nove países que concentram 90% de todos os casos registrados de leishmanioses (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; MISHRA *et al.*, 2009).

O ciclo de transmissão das leishmanioses é complexo e envolve diferentes espécies de hospedeiros mamíferos e insetos fêmeas de

flebotomíneos. A doença originalmente de caráter silvestre foi se adaptando aos novos ambientes criados pelo homem e atualmente ocorre de forma endêmica nas regiões periurbanas e urbanas das cidades, ampliando sua distribuição geográfica e facilitando sua propagação entre a população humana (COLLA-JACQUES; CASANOVA; PRADO, 2010; MARZOCHI et al., 2009).

O tratamento medicamentoso da leishmaniose teve início nos princípios do século XX com o uso do tártaro emético (antimonial trivalente) pelo médico brasileiro Gaspar Vianna. Devido a elevada toxicidade este fármaco foi substituído pelos antimoniais pentavalentes na década de 1930 a 1940 e, desde então, nenhum outro fármaco foi desenvolvido especificamente para o tratamento das leishmanioses. Os poucos fármacos atualmente disponíveis (Anfotericina B, Pentamidina e o Miltefosine), são medicamentos de segunda escolha utilizados no tratamento das leishmanioses quando há falha na resposta terapêutica aos antimoniais pentavalentes (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPAPOPOULOU, 2004). Os fármacos disponíveis têm limitações de seu uso, devido a alta toxicidade e graves efeitos colaterais. A via parenteral de administração aliado ao longo período de utilização, muitas vezes leva ao abandono do tratamento por parte do paciente e conseqüente falha terapêutica. Além disso, a utilização dos antimoniais pentavalentes em áreas endêmicas há mais de 70 anos vem mostrando resistência do parasito a essa classe de compostos (REITHINGER, et al. 2007).

O Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas priorizado em 1983 disponibilizou recursos para o combate aos vetores e melhorias habitacionais. Em julho de 1991 foi implementada a Iniciativa do Cone Sul (Incosul) um dos maiores programas de cooperação internacional contra doença Chagas envolvendo sete países (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru), com objetivo de controlar o *Triatoma infestans*, principal vetor doméstico do *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 2011; TARLETON et al., 2007). Este programa reduziu drasticamente as populações do vetor e consequentemente a transmissão vetorial da doença de Chagas.

Também na década de 1980 com a epidemia de HIV/AIDS foram realizadas reformulações do Sistema Nacional de Bancos de sangue e seus derivados, tornando a sorologia pré-transfusional obrigatória. Esta medida teve impacto positivo no controle da transmissão transfusional da doença de Chagas, colaborando expressivamente para a redução da sua prevalência da doença no país (DIAS, 2011). Contudo, estima-se que entre 10 a 12 milhões de

pacientes chagásicos crônicos permanecem sem tratamento adequado, uma vez que o arsenal terapêutico disponível é restrito a dois fármacos, o Benzonidazol e o Nifurtimox com eficácia comprovada apenas na fase aguda e crônica recente da doença de Chagas.

A inexistência de vacinas eficazes contra protozoários parasitos, associado a dificuldade do controle da transmissão e a complexidade biológica dos agentes fazem dos poucos quimioterápicos existentes uma das únicas alternativas viáveis para o tratamento dos indivíduos infectados (BRENER, 2000). Contudo os diversos efeitos colaterais, a resistência dos parasitos aos fármacos existentes, bem como o aumento de novos casos e a expansão geográfica destas endemias requer a busca urgente de novos agentes terapêuticos para o tratamento dessas doenças (MESQUITA et al., 2007).

Nesse sentido, a via de biossíntese de poliaminas tem sido explorada como possível alvo terapêutico contra patógenos causadores de doenças (HEBY; ROBERTS; ULLMAN, 2003). Os tripanosomatídeos sintetizam ou captam do meio celular as poliaminas necessárias para seu crescimento e proliferação celular a partir da ornitina, envolvendo enzimas fundamentais como a ornitina descarboxilase (ODC) e a S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC) (HIGASHI et al., 2004). Dessa forma, o desenvolvimento de moléculas inibidoras desta via de biossíntese ou de captação de poliaminas pode ser de grande relevância na busca de novas moléculas líder visando o desenvolvimento de novos antiparasitários. Os compostos diaminados e/ou análogos de poliaminas naturais podem atuar como inibidores enzimáticos e/ou reguladores de captação de poliaminas exógenas, interferindo de forma seletiva nas enzimas envolvidas na biossíntese e no mecanismo de transporte de poliaminas, bem como no metabolismo de tiol destes patógenos (BIRKHOLTZ et al., 2011).

Estudos prévios de bioatividade de diaminas mostraram uma promissora atividade *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* e tripomastigotas de *T. cruzi* (DA COSTA et al., 2009; REZENDE-JUNIOR et al., 2010). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a atividade de derivados de diaminas contra formas amastigotas de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi*, agentes etiológicos da leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e doença de Chagas, respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impacto das doenças tropicais negligenciadas no Brasil

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) afetam mais de 1 bilhão de pessoas, especialmente em países pobres ou em desenvolvimento nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2006). Dentre dezessete DTN priorizadas pela Organização Mundial da Saúde estão várias doenças parasitárias transmitidas por vetores (malária, tripanosomíases, leishmanioses, esquistossomose e as filaríases), as quais ocasionam elevadas taxas de morbidade e mortalidade das populações atingidas constituindo-se em um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres (REGUERA; TEKWANI; BALAÑA-FOUCE, 2005). No Brasil, a malária, a doença de Chagas, as leishmanioses, a esquistossomose e a dengue estão entre as DTN com maiores taxas de prevalência (HOTEZ et al., 2008). Embora progressos significativos na compreensão da biologia, bioquímica e epidemiologia de várias destas doenças tenham sido alcançadas nos últimos cinquenta anos, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento destes agravos de saúde permanece ainda inadequado (LABADIE; CHOI; AVERY, 2004).

Para a maioria destas enfermidades, o arsenal quimioterápico disponível é restrito e a eficácia dos medicamentos insatisfatória. Além disso, muitos dos fármacos desenvolvidos na primeira metade do século 20 apresentam significativos riscos ao paciente em virtude dos seus efeitos colaterais. Embora as DTNs respondam por 5% do impacto de doenças no mundo, apenas 0,1% dos investimentos globais em pesquisa são destinados à busca de novas alternativas terapêuticas, como o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas para o tratamento destas enfermidades. Do montante de recursos aplicados na pesquisa de novos medicamentos para DTN, 5% são oriundos de instituições privadas como as indústrias farmacêuticas, 54% de instituições filantrópicas e 41% de instituições públicas (FREARSON et al., 2007; KETTER; MARJANOVIC, 2004).

2.2 Leishmaniose

No Brasil, as leishmanioses ocorrem de forma endêmica em todos Estados da Federação, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença se concentram na região Norte, Nordeste, Centro-Oeste, e Sudeste. Embora ocasionado baixas taxas de mortalidade, estas

parasitoses apresentam elevada morbidade, intensificando ainda mais sua associação com as desigualdades sociais, já que reduz drasticamente a qualidade de vida dos infectados. Entre as principais causas do aumento da incidência desta parasitose podemos elencar a devastação das florestas, o crescimento da população em regiões periurbanas e urbanas, a ausência de saneamento, bem como a desnutrição infantil que implica em uma diminuição da imunidade tornando o hospedeiro mais suscetível a doença (ASHFORD, 2000).

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas com acometimento visceral, cutâneo ou mucocutâneo, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (Figura 1). O gênero *Leishmania* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae), compreende protozoários parasitos, com um ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente em hospedeiros mamíferos e insetos fêmea (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), os quais são responsáveis pela transmissão do parasito de um mamífero a outro (REITHINGER et al., 2007; CHAPPUIS et al., 2007).

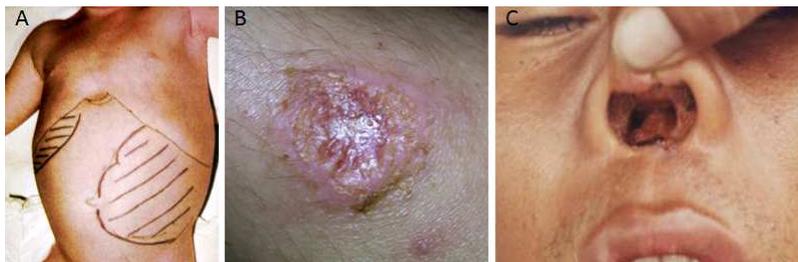


Figura 1. Manifestações clínicas de leishmanioses. A. leishmaniose visceral com evidências de hepatoesplenomegalia, B. lesão característica em leishmaniose cutânea e C. leishmaniose mucocutânea desfigurante (www.who.int/leishmaniasis).

De maneira geral, durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere formas amastigotas, as quais no intestino do inseto se desenvolverão em formas promastigotas flageladas que passam a se multiplicar por um processo de divisão binária e, aproximadamente após uma semana se transformam em formas promastigotas metacíclicas (LAINSON, 2010). O desenvolvimento do parasito no vetor depende da espécie de *Leishmania* e de forma geral, parece haver um elevado grau de especificidade na

relação parasito-hospedeiro, fato este que pode ter implicações epidemiológicas importantes na transmissão e distribuição da doença (CORTÊS et al., 2011; LAINSON, 2010).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas no local da picada pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Os parasitos são prontamente internalizados em macrófagos ou células dendríticas através de fagocitose mediada por receptores na superfície da célula hospedeira (CUNNINGHAM, 2002). No interior do fagolisossomo, os promastigotas sobreviventes transformam-se em amastigotas, os quais passam a se multiplicar por divisão binária levando a destruição da célula hospedeira. Os amastigotas liberados no processo infectam novos macrófagos e reiniciam o ciclo de multiplicação intracelular. A lesão leishmaniótica, em sua apresentação clássica, se apresenta como uma úlcera de bordos elevados e endurecidos, fundo granuloso e soropurulento e, na maioria das vezes, indolor. De maneira geral a lesão pode se restringir apenas ao local da picada ou ocorrer em outras partes do organismo do hospedeiro através de um processo de disseminação do parasito ainda pouco compreendido (REITHINGER et al., 2007). Em pacientes suscetíveis, a inflamação local ou sistêmica se desenvolve e, dependendo do padrão da resposta imune do hospedeiro, a doença clínica pode ou não se estabelecer. Cerca de 10 a 15% dos pacientes que desenvolvem a doença clínica podem evoluir para cura espontânea da úlcera em um período de 6 meses a 1 ano, enquanto que nos demais, as lesões podem perdurar por longos períodos (MURRAY et al., 2005).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por uma variedade de espécies dermatrópicas de *Leishmania*, onde se destacam a *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* sendo registrados 21.981 casos em 2010 (Ministério da Saúde, 2012). Embora a maioria dos casos de LTA tenha apresentação da forma cutânea simples, a infecção por *L. braziliensis* pode ocasionar formas mucocutâneas desfigurantes e de difícil tratamento (CARVALHO et al, 1994, GOTO; LINDOSO, 2010). Além disso, outra preocupação é a coinfeção *Leishmania/HIV* que apresenta manifestações clínicas de elevada gravidade e baixa a resposta ao tratamento (ALVAR et al., 2008).

A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre de forma endêmica em 65 países, com uma incidência estimada em 500 mil novos casos e 59 mil mortes por ano. No Brasil, a doença é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, transmitido pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi* (LAINSON, 2010).

Contudo, há evidências de que outras espécies como *Lu. migonei* possam estar envolvidas na transmissão do parasito em algumas regiões (CARVALHO et al, 2010; RANGEL; LAINSON, 2009). A LV é considerada uma antroponose rural e periurbana com forte tendência a urbanização (COLLA-JACQUES; CASANOVA; PRADO, 2010). Embora raposas e marsupiais sejam considerados reservatórios silvestres do parasito, o cão doméstico possui um papel fundamental como reservatório da leishmaniose visceral no ciclo de transmissão nas áreas urbanas (WERNECK, 2010).

A primeira grande epidemia de calazar humano no Brasil ocorreu em Teresina, Estado do Piauí, em 1980 (COSTA et al., 1990), seguida de outras epidemias no Rio Grande do Norte (Natal) e Maranhão (São Luís), estendendo-se também para outras regiões do país. Desde a década de 1980 a doença tem sido registrada em regiões urbanas, mudando seu panorama epidemiológico clássico (GONTIJO; MELO, 2004). Mais de 70 mil casos de LV foram registrados no Brasil de 1980 a 2008, com 3.800 mortes. Só na Região Nordeste houve um aumento de 40% de casos nos últimos dez anos. De 2006 a 2008, a transmissão autóctone foi registrada em mais de 1.200 cidades em 21 Estados. A pobreza, a migração, o crescimento urbano não planejado, a destruição do meio ambiente, as condições sanitárias precárias e a desnutrição são alguns agravantes para a expansão e urbanização da leishmaniose visceral (MARZOCHI et al., 2009).

2.2.1 Tratamento das leishmanioses

Em abril de 1912, Gaspar Vianna comunicou à Sociedade Brasileira de Dermatologia, durante o Congresso realizado em Belo Horizonte, a cura do primeiro paciente de leishmaniose tegumentar utilizando o tártaro emético, um antimônio trivalente. O tratamento mostrava ação específica com o desaparecimento das lesões após as primeiras doses do medicamento (DO VALE; FURTADO, 2005). A partir desse trabalho, com a evidência da eficácia do tártaro emético, outros complexos antimônio pentavalente foram desenvolvidos, essencialmente o antimônio de N-metil-glucamina (Glucantime®) e o estiboglucanato de sódio (Pentostam®). Desde então, estas moléculas representam os medicamentos de primeira escolha de tratamento para leishmanioses desde a década de 40 (GONZALEZ et al., 2010).

O tratamento das leishmanioses no Brasil é clinicamente realizado com o Glucantime®, fármaco de primeira escolha e em casos de não resposta ao tratamento convencional, são utilizadas a

pentamidina ou a anfotericina B como segunda escolha (DEMICHELI et al, 2002; Ministério de Saúde, 2007; SERENO; HOLMULLER; LEMESTRE, 2000). O mecanismo de ação dos antimoniais não é conhecido, mas há evidências da inibição da atividade glicolítica e da via oxidativa dos ácidos graxos e indução de morte celular com características de apoptose (*apoptosis-like*) em formas amastigotas (BERMAN; GALLALEE; BEST, 1987; SERENO; HOLMULLER; LEMESTRE, 2000).

Quanto aos medicamentos de segunda escolha, o uso da pentamidina foi iniciado na Índia em pacientes com leishmaniose visceral resistente aos antimoniais pentavalentes. Atualmente tem sido usado com sucesso no tratamento de leishmaniose mucosa e cutânea em algumas regiões do Novo Mundo. A pentamidina interfere na síntese de DNA, modificando a morfologia do cinetoplasto e promove a fragmentação da membrana mitocondrial do parasito (WILSON et al., 2008). No entanto, o elevado custo e a toxicidade por indução de diabetes mellitus insulino-dependente irreversível são as desvantagens no uso desse medicamento (MURRAY et al., 2005).

Outra alternativa é a Anfotericina B, um antifúngico poliênico, utilizado pela primeira vez com sucesso como agente leishmanicida em 1960 (RAMOS et al, 1996). Este composto interfere na biossíntese de ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana celular, promovendo a morte em promastigotas e amastigotas. Da mesma forma como nos fármacos anteriores, a anfotericina B também pode provocar inúmeros efeitos colaterais (febre alta e calafrios, tromboflebitas, miocardite, hipocalemia severa, insuficiência renal e até morte), o que limita o seu uso clínico (SUNDAR; RAI, 2002). Os efeitos tóxicos têm sido reduzidos com a substituição do desoxicolato por outros lipídeos na formulação da anfotericina B, aumentando sua eficácia e reduzindo a toxicidade. Três formulações estão disponíveis: anfotericina lipossomal, complexo lipídico e dispersão coloidal de anfotericina B.

Dentre os tratamentos alternativos recentes está a miltefosina, um alquil fosfolipídeo, inicialmente desenvolvido para o tratamento de câncer de mama e tumores sólidos. A identificação da atividade leishmanicida ocorreu na década de 80, representando o primeiro tratamento oral registrado para LV e mais recentemente para a forma cutânea da doença (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Estudos mostraram que miltefosina é ativa em modelo animal deficiente em células T, diferente dos medicamentos padrões, os antimoniais pentavalentes, os quais são inativos em modelos animais imunodeficientes. Estes resultados são relevantes para o tratamento em pacientes

leishmanióticos coinfectados pelo HIV/AIDS (MURRAY, 2000). Estudos mostraram elevada atividade antiparasitária da miltefosina em cepas isoladas de pacientes infectados com *L. lainsoni*, porém reduzida ação contra as espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (YARDLEY et al., 2005).

Na Índia, a miltefosina mostrou taxas de cura similares quando comparada com a anfotericina B. Em estudo em fase IV, realizado com 1.132 pacientes, 82% deles apresentaram cura em seis meses e somente 3% dos pacientes tiveram grau três de toxicidade ao medicamento (SUNDAR et al., 2002). Em estudo de fase IV na Índia, a paramomicina demonstrou alta eficácia no tratamento de leishmaniose visceral, com taxa de cura de 94,2% em seis meses de tratamento, porém, apresentou hepatotoxicidade em cerca de 40% dos pacientes (SINHA et al., 2011). Este fármaco tem sido utilizado na formulação tópica e parenteral para o tratamento de leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Outros fármacos como a azitromicina, o alopurinol, a dapsona e a rifampicina foram estudados *in vitro* contra diferentes espécies de *Leishmania* e tiveram resultados divergentes no Novo e no Velho Mundo (GOTO; LINDOSO, 2010).

Além do limitado arsenal terapêutico eficaz, as dificuldades quanto à forma de administração e o tratamento prolongado, levam com frequência ao abandono do tratamento por parte do paciente e consequente falha terapêutica. Por esse motivo, a busca de novas moléculas e também de novas formas farmacêuticas para o tratamento das leishmanioses tem sido incentivada (MALTEZOU, 2010).

2.3 Tripanossomíase americana

A Tripanossomíase americana, também denominada doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma antroponose transmitida por triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, adaptados às áreas rurais e peridomiciliares.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo biológico complexo, envolvendo pelo menos três formas evolutivas distintas. O parasito infecta inúmeras espécies de mamíferos, incluindo o homem, os quais funcionam como reservatórios, e experimentalmente, todas as espécies de triatomíneos conhecidas. O ciclo no triatomíneo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do inseto, o parasito se diferencia para forma epimastigota que se multiplica por sucessivas divisões

binárias e se diferencia em tripomastigotas metacíclicas. As formas metacíclicas são eliminadas com as fezes e urina do triatomíneo durante um novo repasto sanguíneo e constituem a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Após penetrarem pelo local da picada ou por qualquer solução de continuidade, os tripomastigotas invadem diversos tipos celulares, onde realizam seu ciclo de multiplicação intracelular, sob a forma amastigota. Cerca de três a quatro dias após a invasão da célula hospedeira, precedendo o seu rompimento, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas móveis, que rompem a célula e são liberados no meio extracelular, podendo migrar para a circulação sanguínea e serem ingeridos pelo inseto vetor ou recomeçar novo ciclo intracelular (BRENER, 2000). O tropismo tecidual do parasito para o coração, aparelho digestivo, sistema nervoso, entre outros, parece estar fortemente associado com características bioquímicas e moleculares (ANDRADE et al., 1999; PRATA, 2001).

Considerado um importante problema de saúde pública na América Latina, a doença de Chagas é responsável por consideráveis taxas de morbidade e mortalidade e estima-se que cerca de 16 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasito, das quais aproximadamente 8 milhões encontram-se na fase crônica sintomática da infecção (ZULANTAY et al., 2004). Na fase crônica, o número de tripomastigotas sanguíneos reduz-se até níveis difíceis de serem detectados pelos métodos parasitológicos convencionais. A maioria dos infectados são assintomáticos, podendo permanecer nesta condição por cerca de 20 a 30 anos ou mais (RASSI-JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). No entanto, entre 10 a 30%, dependendo da região, exibem manifestações clínicas crônicas incluindo formas cardíacas e/ou digestivas relacionadas com destruição da rede neuronal mioentérica, mais frequente no esôfago e no intestino grosso (PRATA, 2001; TEIXEIRA et al., 2006).

A fase aguda inicia com a entrada do parasito no hospedeiro, seguido de manifestações clínicas como febre, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia. Na maioria dos indivíduos afetados as manifestações clínicas desaparecem em quatro a oito semanas após o início. Em casos mais graves podem ocorrer miocardite aguda e meningoencefalite, geralmente fatal. No Brasil, ocorreram 686 casos agudos, com 18 mortes no período de 2006 a 2010 nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Centro-Oeste, segundo o Ministério da Saúde (2011). A principal via de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, seguida das vias transfusional, congênita, oral e acidental. De acordo com Dias (2011), a transmissão vetorial vem gradativamente reduzindo durante as

últimas décadas, sendo que o Brasil foi certificado como área livre de transmissão vetorial em 2005. Contudo, diante do risco da transmissão continuada em outros países latino-americanos há uma possibilidade real do ressurgimento de vetores em áreas controladas (DIAS; PRATA; CORREIA, 2008).

Na transmissão por transfusão o risco de infecção estimado é de 12 a 20%. No entanto, fatores como a parasitemia do doador, o número e o volume da transfusão recebida, a imunidade do receptor e o tempo entre a coleta do sangue e transfusão podem afetar estas taxas (SOUZA; SILVA, 2011). Em 2006, a prevalência sorológica em bancos de sangue para América Latina foi de 1,3% e para o Brasil de 0,2% (OPS, 2006). O risco de transmissão congênita do *T. cruzi* varia regionalmente entre 0,3 a 14% e estima-se que em 2005 ocorreram 14.000 casos da doença por esta via de transmissão na América Latina (YADON; SCHMUNIS, 2009). Resultado do inquérito nacional de soroprevalência da doença de Chagas em crianças até cinco anos de idade realizado entre 2001 a 2008 mostrou uma soropositividade global de 0,1%, sendo que as maiores prevalências de transmissão congênita foram registradas nos estados do Rio Grande do Sul (12%) dos casos, seguido por Minas Gerais (3%) (OSTERMAYER et al., 2011).

A transmissibilidade, de modo geral, reduziu drasticamente desde a década de 70, graças às medidas de prevenção e o controle da doença, com programas rigorosos combate aos vetores e a triagem obrigatória dos doadores de sangue. Entretanto, a propagação da doença ainda continua através da transfusão e dos transplantes de órgãos em regiões endêmicas e não-endêmicas, assim como em casos isolados pela via oral (RASSI-JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010, STEINDEL et al., 2008). Como agravante, os pacientes com doença de Chagas em fase crônica que apresentam coinfeção pelo HIV/AIDS ou que estão sob terapia de imunossupressão por tratamento de neoplasias ou transplantados podem ter a reativação da doença com o aumento da parasitemia e da replicação intracelular de parasito (VADIAN; WEISS; TANOWITZ, 2004).

Da mesma forma como nas leishmanioses, o panorama da doença de Chagas tem relação direta com as baixas condições socioeconômicas, o que leva a crer que a prevenção e controle da doença dependem das condições de saúde, alimentação, educação e, sobretudo o acesso ao diagnóstico e tratamento eficiente (VIOTTI et al., 2009).

2.3.1 Tratamento da doença de Chagas

Após a descoberta da doença em 1909 por Carlos Chagas, várias substâncias foram utilizadas experimentalmente ou clinicamente, para o tratamento da doença. O primeiro resultado experimental que demonstrou efetividade foi observado com o grupo dos nitrofuranos na década de 50. Esses resultados levaram o professor Zigman Brener a conduzir experimentos com a nitrofurazona em camundongos infectados com *T. cruzi*, demonstrando a atividade *in vivo* deste fármaco contra a forma circulante do parasito (COURA, 2009). Entre as décadas de 60-70, outros dois nitroderivados surgiram, o nifurtimox (Lampit®-Bayer) 3-metil-4-(5'-nitrofurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido e o benzonidazol (Rochagan®, da Roche) *N*-benzyl-2-nitroimidazol acetamida (COURA; CASTRO, 2002). O mecanismo de ação de ambos envolve a produção de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (R-NO₂) é reduzido a um grupo amino (R-NH₂) por nitroredutases (NADPH-citocromo P-450 redutase) com formação de radicais livres intermediários (R-NO₂⁻). A atividade destes compostos se dá pela formação de ânion superóxido O₂⁻ e H₂O₂ que na presença de Fe³⁺ formam radicais livres, hidroxilas (OH⁻), os quais se ligam covalentemente aos lipídeos, proteínas e DNA causando o efeito antiparasitário (MAYA et al., 2007; MORENO; MASON; DO CAMPO, 1984).

Apesar da baixa eficácia do nifurtimox e do benzonidazol na fase crônica da doença e dos efeitos adversos como anorexia, alterações psicológicas, erupções cutâneas, leucopenia, polineuropatia periférica e anormalidades teciduais estes são os únicos fármacos até hoje disponíveis para o uso clínico (BRENER, 2000). Dados da literatura mostram que o tratamento etiológico com estes fármacos na fase aguda da doença de Chagas a taxa de cura é superior a 80% e na fase crônica recente é de 50% a 60%, porém, diferentes estudos mostraram taxas de cura de apenas 5 a 8% em pacientes crônicos adultos tratados com benzonidazol ou nifurtimox (CANÇADO, 2002; COURA, 2009; URBINA; DO CAMPO, 2003). Estudo preliminar de 80 pacientes chagásicos crônicos na forma indeterminada da doença do Rio Grande do Sul submetidos ao tratamento com benzonidazol mostrou a taxa de cura de 5% dos pacientes em um período de três anos de acompanhamento (FERNANDES et al., 2009). Dados sobre tratamento de pacientes chagásicos crônicos são escassos em virtude da incerteza sobre o risco x benefício a esse grupo. Em 2004 foi iniciado um estudo multicêntrico randomizado (Projeto BENEFIT) no qual se pretende avaliar a eficácia do tratamento com benzonidazol em mais de 3.000

pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica (MARIN-NETO et al., 2008).

Estudos com diversos derivados triazólicos tem mostrado resultados muito promissores na quimioterapia experimental da doença de Chagas em modelo murino. Dentre este grupo de compostos o posaconazol, o bis-triazol D0870 (MOLINA et al., 2000) e o ravuconazol (URBINA et al., 2003) foram os mais ativos. A eficácia tripanocida *in vivo* variou de 60 a 100% de cura parasitológica no modelo murino dependendo da cepa de *T. cruzi* e da fase da infecção experimental. Um interessante efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* do posaconazol e da amiodarona, um antiarrítmico utilizado no tratamento sintomático da cardiomiopatia tem sido relatado (BENAIM et al., 2006).

Estes derivados triazólicos apresentam vantagens em relação às terapias atuais, com potencial de cura de infecções agudas e crônicas, bem como em casos de reativação da doença em pacientes com imunossupressão (URBINA, 2009). Estudos de fase II com posaconazol e com a prodroga ravuconazol-E1224 estão sendo planejados com o apoio das companhias farmacêuticas Merck & Co. e Eisai Pharmaceuticals, respectivamente (BUCKNER; NAVABI, 2010).

De acordo com a recomendação do Ministério da Saúde (2005), o tratamento de pessoas infectadas tem sido recomendado para todos os casos agudos e crônicos, bem como para infecções congênicas, infecções acidentais e casos de reativação da doença.

2.4 Diaminas

As poliaminas naturais são encontradas em todas as células procarióticas e eucarióticas. Podem ser definidas como aminas com duas ou três cadeias alifáticas conectadas por átomos de nitrogênio. A figura 2 mostra as estruturas da putrescina, espermidina e espermina.

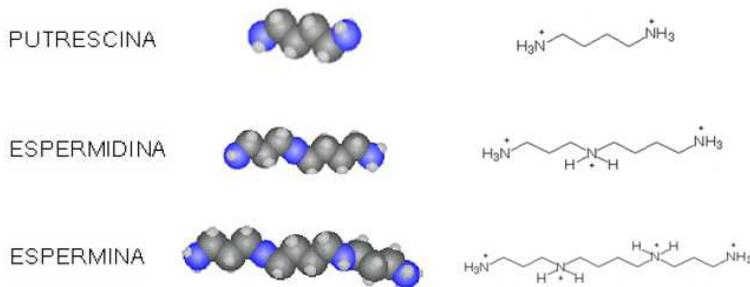


Figura 2. Estruturas moleculares das poliaminas naturais (WILLIAMS, 1997 e GUGLIUCCI, 2004).

Para tripanosomatídeos as poliaminas são essenciais para o crescimento e proliferação celular. Nestes organismos, esse grupo de moléculas é sintetizado a partir da ornitina, que é descarboxilada em putrescina pela enzima ODC, ocorrendo o primeiro passo da biossíntese de poliaminas (Figura 3). A seguir, a enzima AdoMetDC cataliza a formação de AdoMet descarboxilada que doa o grupo aminopropil para a conversão de putrescina em espermidina (HIGASHI et al., 2004). A via das poliaminas apresenta características diferentes entre os parasitos e as células de mamíferos, sendo, portanto, uma via interessante como alvo quimioterápico que irá atuar seletivamente (HEBY; ROBERTS; ULLMAN, 2003). A poliamina espermidina biossintetizada quando conjugada com a glutatona forma a tripanotona dissulfeto [T(S)₂] que é reduzida a tripanotona ditiol [T(SH)₂] pela tripanotona redutase (TR), desencadeando a neutralização de espécies reativas de oxigênio em tripanosomatídeos, nos mamíferos este balanço é realizado via glutatona/glutatona redutase, sendo equivalente ao sistema [T(S)₂]/TR nos tripanossomatídeos. Esta diferença é alvo de estudo de novos fármacos inibidores desta via metabólica (BIRKHOLTZ et al., 2011; HAMILTON et al., 2003).

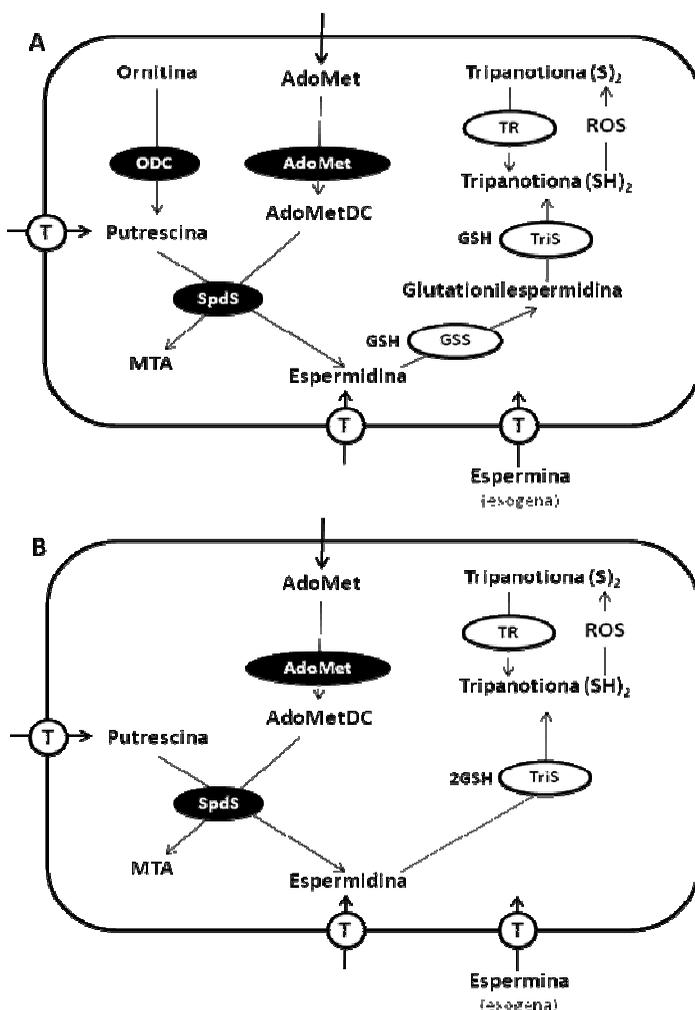


Figura 3. Representação esquemática da biossíntese de poliaminas. A. *Leishmania* spp. B. *Trypanosoma cruzi*. Abreviações: ODC ornitina descarboxilase; AdoMetDC S-adenosilmetionina descarboxilase; SpdS espermidina sintase; GSH glutationa; TriS tripanotona sintase; TR tripanotona redutase; T transporte de poliaminas exógenas.

A via da biossíntese das poliaminas tem sido explorada como possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias como a malária, tripanosomíase

africana, doença de Chagas e leishmanioses. Estudos recentes mostraram que o análogo da putrescina DAB compete pelo sítio ativo da TR em formas epimastigotas de *T. cruzi* provocando a inibição do crescimento celular, aumento do estresse oxidativo e danos na mitocôndria (HASNE et al., 2010).

Outros estudos com inibidores da ODC mostraram que a alfa-difluorometilornitina (DFMO) e 1,4-diamino-2-butanona (DAB) causaram elevada atividade antiparasitária contra *T. brucei* e *L. donovani* e contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*, respectivamente (BARKER et al., 2009; BOITZ et al., 2009; SOARES; ALVES; BECHARA, 2011; VANNIER-SANTOS et al., 2008). Já diferentes análogos de poliaminas *N,N'*-bis(benzil)poliamina e *N,N'*-bis(etiltiofeno)poliamina inibiram a invasão e a multiplicação intracelular do *T. cruzi* (ARIYANAYAGAM et al., 2003).

A atividade antiparasitária *in vitro* de diaminas alifáticas e amino-álcoois tem sido reportada em diferentes modelos experimentais: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (DA COSTA et al., 2009; DEL OLMO et al., 2002), *T. cruzi* e *T. brucei* (DEL OLMO et al., 2012; REZENDE-JUNIOR et al., 2010; REBOLLO et al., 2008), *Plasmodium falciparum* (LABADIE; CHOI; AVERY, 2004) e *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI et al., 2009). As evidências da atividade antiparasitária e da ação sobre a via de biossíntese de poliaminas, aliadas a facilidade de síntese química fazem das diaminas um grupo de compostos relevantes na investigação de novas moléculas antiparasitárias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* de compostos derivados de diaminas.

3.2 Objetivos Específicos:

Avaliar a atividade dos compostos derivados de diaminas frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* e epimastigotas de *T. cruzi*.

Determinar a citotoxicidade de derivados de diaminas frente a macrófagos murinos derivados de medula óssea.

Avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida *in vitro* de derivados de diaminas contra amastigotas intracelulares em macrófagos murinos derivados de medula óssea.

Verificar a correlação entre a atividade antiparasitária com a estrutura e lipofilicidade dos compostos

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) e lise celular em formas epimastigotas tratados com os compostos ativos.

Avaliar a indução de TNF α e NO em macrófagos murinos pelos compostos ativos.

Investigar o efeito inibitório dos compostos ativos sobre a enzima tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi* e *L. braziliensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos

Os 17 derivados de diaminas utilizados no presente estudo estão relacionados na Tabela 1. Estes compostos foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) sob a Coordenação do Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida. Todos os compostos obtidos foram quimicamente caracterizados por ponto de fusão (PF), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

Tabela 1. Compostos sintéticos derivados de diaminas

Código	Fórmula	Fórmula Molecular	PM
DP22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	$\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{N}_2$	228
DP22 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Cl}_2$	301
DP23	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	$\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_2$	284
DP23 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{Cl}_2$	357
DP24	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	$\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N}_2$	250
DP24 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{Cl}_2$	329
DP25	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	$\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{N}_2$	312
DP25 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{Cl}_2$	385
DP28	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	$\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}_2$	340
DP28 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{Cl}_2$	413
CR40	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$	$\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_2$	284
CR40 Cl	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$	$\text{C}_{18}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{Cl}_2$	357
GUT1c	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$	$\text{C}_{26}\text{H}_{56}\text{N}_2$	396
RAG05	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$	$\text{C}_{28}\text{H}_{60}\text{N}_2$	424
RAG08	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	$\text{C}_{36}\text{H}_{76}\text{N}_2$	536
RAG10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	$\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{N}_2$	312
RAG11	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	$\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N}_2$	256

Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido – DMSO (Merck) na concentração estoque de 25 mM e armazenados a -20°C. Os fármacos benzonidazol a anfotericina B (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foram utilizados como controles positivos para *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, respectivamente. Para os ensaios de inibição da tripanotona

redutase recombinante foi utilizado como controle positivo a clomipramina (Sigma-Aldrich, Saint Louis).

4.2 Parasitos

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/96/LSC96-H3) e *L. chagasi* (LSC-D2) foram cultivadas em meio Schneider (pH 7,4 suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), 2% de urina, 10U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina). Epimastigotas de *T. cruzi* (MHOM/BR/00/Y) foram cultivadas em meio LIT pH 7,2 (Liver infusion tryptose) suplementado com 10% de SBF, penicilina 10 U/mL e estreptomicina 10 µg/mL em pH 7,2. As culturas foram mantidas a 26°C através de repiques semanais.

4.2.1 Amastigogênese de *Leishmania braziliensis*

As formas amastigotas para ensaios de atividade intracelular foram obtidas a partir de promastigotas. Após quatro dias de cultivo, promastigotas na fase estacionária foram centrifugados a 2000 x g/10 minutos, semeados em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 5ml de meio Schneider pH 6,3 + 20% SBF + 2% de urina em uma concentração de 25 x 10⁶ parasitos/mL. A suspensão celular foi mantida sem aeração a 34°C por 72 horas para diferenciação, conforme da Silva (2008). As formas amastigotas foram passadas três vezes por agulha 26G½ para desagregação dos grumos parasitários e utilizados para infecção dos macrófagos.

4.2.2 Obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidos do sobrenadante de cultura celular da linhagem Vero (ATCC CCL-81), conforme descrito por Toma (2000). Para tanto, tripomastigotas derivados de cultura celular foram descongelados e utilizados para infecção de monocamadas de células Vero na razão de 5:1 (parasito:célula) e cultivadas em meio DMEM + 2,5% de SBF a 37°C e 5% de CO₂. No sexto ou sétimo dia de cultivo, o sobrenadante de cultura foi coletado, os tripomastigotas concentrados por centrifugação e utilizados para infecção de macrófagos.

4.3 Células

Macrófagos murinos derivados de medula óssea foram obtidos de camundongos da linhagem BALB/c. Para tanto, os animais foram eutanasiados e a medula óssea foi obtida por lavagens sucessivas com meio DMEM do interior do fêmur e da tíbia. As células foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C e suspensas em meio DMEM suplementado com SFB 10%, 10 U/ml de penicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 1% de L-glutamina, 2,5% de HEPES (Gibco, UK) e 25% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 (ATCC CCL-1), semeadas em placas de seis poços e cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 por uma semana quando os promonócitos já se diferenciaram em macrófagos. No sétimo dia de cultivo, as monocamadas foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) pH 7,4 e tratadas com tripsina 0,25% (Gibco, UK), lavadas uma vez em meio DMEM a $1.000 \times g$ por 5 minutos, e a concentração celular ajustada para 2×10^6 células/mL em meio DMEM + SFB 10%. A seguir, a suspensão celular foi semeada em placas de 96 poços, cultivada a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas e realizados os bioensaios. Para os ensaios de citotoxicidade foi utilizado uma concentração celular de 2×10^5 células/poço e para os ensaios de atividade antiparasitária 4×10^4 células/poço.

4.4 Bioensaios *in vitro*

O organograma (Figura 4) mostra a dinâmica dos bioensaios realizados ao longo deste trabalho. Todos os compostos foram testados na fase I e aqueles que apresentaram concentração inibitória a 50% (CI_{50}) inferior a $20 \mu\text{M}$ seguiram para a fase II, que compreende avaliar a atividade antiparasitária intracelular e a citotoxicidade. Os compostos que apresentaram índice de seletividade (IS) maior que 50 seguiram para a fase III, com o intuito de investigar o possível mecanismo de ação, avaliando a perda do potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas, detecção de TNF α e óxido nítrico e inibição da enzima tripanotioina redutase recombinante de *L. braziliensis* e *T. cruzi*.

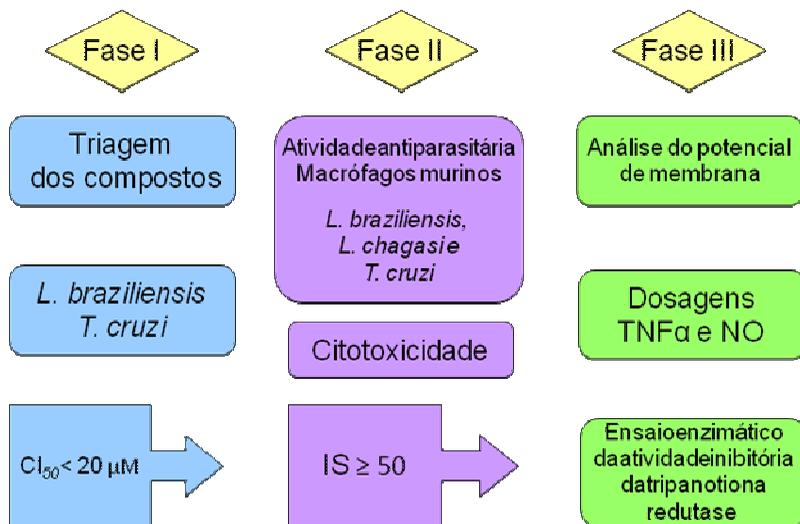


Figura 4. Organograma dos ensaios de atividade antiparasitária e investigação de possíveis mecanismos de ação de diaminas.

4.4.1 Triagem das atividades leishmanicida e tripanocida

Para a triagem da atividade leishmanicida dos compostos, 180 μl /poço de uma suspensão contendo 3×10^6 promastigotas de *L. braziliensis* foram semeadas em placas de 96 poços; e incubadas com 20 μl dos compostos em diferentes concentrações (100, 20, 4, 1 e 0,2 μM) por 48 horas a 26°C. Como controle positivo e negativo foram utilizados anfotericina B (1; 0,5; 0,25; 0,12 μM) e DMSO (1%), respectivamente. A atividade antiparasitária foi avaliada através da técnica do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Amresco, Ohio), conforme Sieuwerts et al. (1995). Para tanto, após 48h de cultivo dos parasitos na presença dos compostos, foi adicionado 50 μl da solução 2 mg/ml de MTT em cada poço e as culturas incubadas a 26°C por 4 horas. Após centrifugação a 1.700 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os cristais de formazan solubilizados com 100 μL de DMSO/poço (da SILVA, 2008). A seguir, a densidade óptica (D.O.) foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN®, Modelo Infinite M2000.

Para triagem da atividade tripanocida dos compostos, 180 μl /poço de uma suspensão contendo 5×10^6 epimastigotas de *T.*

cruzi/mL foi semeado em placas de 96 poços e incubadas com as mesmas concentrações dos compostos e condições descritas para a atividade leishmanicida. Como controle positivo e negativo foi utilizado benzonidazol (50, 20, 5 e 1 μ M) e DMSO (1%), respectivamente. A atividade antiparasitária foi avaliada através da técnica do MTT, com adição de 50 μ l da solução 10 mg/ml de MTT em cada poço e incubação a 26°C por 6 horas. Após centrifugação a 1.700 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e para otimizar a lise celular, o sedimento de parasitos foi incubado por 1 hora com 20 μ l de SDS 10% em HCl 0,01 M em seguida os cristais de formazan foram solubilizados pela adição 80 μ L de DMSO/poço (EGER, 2010). A seguir, a densidade óptica foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN®, Modelo Infinite M2000. Para cada composto foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Os valores de CI_{50} de cada composto foram estimados a partir dos valores médios obtidos de três réplicas em triplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism InStat 3®. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.4.2 Avaliação da citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/poço a 37°C, 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Após 12 horas de cultivo as células foram tratadas com os compostos em diferentes concentrações (300, 50, 10 e 4 μ M) e com os controles, DMSO 1% e anfotericina B 1 μ M. Após 48 horas foram adicionados em cada poço, 50 μ l da solução de MTT 1 mg/mL e as células incubadas nas mesmas condições por 4 horas. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazan solubilizados com 100 μ l de DMSO/poço. A densidade óptica foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN®, Modelo Infinite M2000. Os valores de CI_{50} de cada composto foram estimados como descrito no item 4.4.1.

4.4.3 Atividade leishmanicida de diaminas contra amastigotas intracelulares em macrófagos murinos

Macrófagos cultivados em placas de 96 poços foram infectados com amastigotas axênicos de *L. braziliensis* na proporção 10:1 parasitos/célula. Os parasitos suspensos em meio DMEM sem SBF foram semeados sobre a camada de macrófagos e após duas horas de interação as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não interiorizados e mantidas em meio DMEM suplementado a 34°C, 5% de CO₂ por 24 horas. A seguir, os compostos que foram ativos na triagem foram adicionados, nas concentrações de 50, 10, 2 e 0,4 µM e as culturas mantidas a 34°C, 5% de CO₂ por 48 horas. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B (1; 0,5; 0,25; 0,12 µM) e como controle negativo o DMSO 1%.

Para os ensaios com *L. chagasi*, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas obtidos de fase estacionária. Os parasitos foram previamente lavados com PBS, e opsonizados por uma hora a 37°C com soro humano (AB⁺) inativado e diluído a 10% em meio DMEM sem SBF. A seguir, os parasitos foram centrifugados a 2.000 x g por 10 minutos e suspensos na concentração apropriada em meio DMEM completo e adicionados aos macrófagos na proporção de 20:1 parasitos/célula e incubados a 37°C, 5% de CO₂. Após a incubação, as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não aderidos e cultivadas a 37°C, 5% de CO₂ em meio DMEM completo por 24 horas. Os compostos nas mesmas concentrações e condições descritas no item 4.4.3 foram adicionados e as culturas mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 48 horas.

As monocamadas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa (Merck, Darmstadt). Para avaliação da atividade leishmanicida, 300 células para cada concentração dos compostos foram avaliadas randomicamente determinando-se a porcentagem de células infectadas e o número de parasitos intracelulares em microscópio invertido Olympus IX70 em objetiva de 40x.

O percentual de inibição (PI) foi determinado segundo Guru et al. (1989) e modificado por Lakshmi et al. (2007), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{PI} = 100 - (\text{T/C} \times 100)$$

Onde T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas; C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle DMSO 1%.

Os valores de CI_{50} foram estimados a partir dos valores de PI obtidos em três réplicas em triplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa Graph Prism Instat 3®.

4.4.4 Atividade tripanocida de diaminas contra amastigotas intracelulares em macrófagos murinos

Macrófagos previamente semeados em placas de 96 poços foram infectados com tripomastigotas de cultura, na proporção de 4:1 parasitos/célula. Após quatro horas, as monocamadas foram lavadas com PBS e cultivadas por 12 horas em DMEM suplementado a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as monocamadas foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos como descrito anteriormente e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Como controles, foram utilizados o benzonidazol em diferentes concentrações (50, 20, 5 e 1 µM) e o DMSO 1%. As placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa. O percentual de inibição e a estimativa da CI_{50} foram determinados como descrito no item 4.4.3

4.4.5 Citometria de fluxo: avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) e lise celular em formas epimastigotas

A rhodamina 123 (R123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Esse fluorocromo tem características lipofílicas e catiônicas, que permitem sua atração pelo alto potencial elétrico presente na membrana mitocondrial e assim acumulando-se preferencialmente na matriz dessa organela. Devido a essa propriedade, a R123 tem sido utilizada para quantificar o potencial de membrana em diferentes tipos celulares (KOOPMANN et al., 2005).

A análise do potencial de membrana mitocondrial dos parasitos tratados com as diaminas ativas foi realizada através de citometria de fluxo utilizando como marcador a rhodamina R123 (CHAZOTTE et al., 2011). Para os experimentos, 4 ml de cultura (5×10^6 parasitos/ml) de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram semeados em placas de 6 poços e incubados a 27°C com 12, 6 e 3 µM da diamina DP24. Após 2, 6, 12 e 24 horas de incubação, 10^6 parasitos foram centrifugados a $3.000 \times g$ por 5 minutos e incubados com 500 µl da solução de R123 (10 µg/ml)

em PBS por 15 minutos a 27°C. Após 3 lavagens em PBS, a marcação de R123 foi quantificada por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 20.000 eventos foram adquiridos na região de espalhamento de luz (FSCxSSC) correspondente aos parasitos. Os dados foram analisados posteriormente através do programa FlowJo (TreeStar software). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, utilizando como controle DMSO 1%.

Paralelamente, a viabilidade celular foi avaliada com o corante vital iodeto de propídeo, o qual penetra exclusivamente em células com membrana danificada, permitindo quantificar o número de células mortas (KROEMER *et al*, 2009). Para este ensaio, os parasitos foram coletados como descrito acima e incubados a 28°C em PBS contendo 5 µg/ml de iodeto de propídeo. Após 10 minutos, os parasitos foram lavados e quantificados por citometria de fluxo como descrito acima.

4.4.6 Dosagem da produção de NO

A dosagem de nitrito (NO₂⁻) liberado pelos macrófagos e determinado pela reação de Griess foi utilizado como um indicador da produção de NO. Para tanto, monocamadas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi* e tratadas com as diaminas na concentração de 10µM / 48 horas. Foram utilizados 100 µL do sobrenadante misturados com igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido clorídrico/0,1% de α-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q). Como controle positivo as monocamadas foram tratadas com 10µg/mL de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, Saint Louis) e como controle negativo, com DMSO 1%. Após incubação a 37°C / 40 minutos, a densidade óptica da reação foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas TECAN, conforme descrito por Miranda e colaboradores (2001). A concentração de NO₂⁻ foi determinada a partir de uma curva de calibração e expressa em µM.

4.4.7 Dosagem de TNFα

Após 48 horas de incubação com os compostos, a concentração de TNFα foi dosada no sobrenadante das culturas de macrófagos através do método de ELISA sanduíche segundo protocolo descrito pelo fabricante (BD Biosciences – San José, USA). Para tanto, placas de

ELISA foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF α e incubados a 4°C por 12 horas. A seguir a placa foi bloqueada com PBS 1x + 0,05% Tween 20 + 5% de leite desnatado a temperatura ambiente por uma hora, seguido da adição de 100 μ l das amostras e do padrão. A placa foi mantida a 4°C e após 12 horas foi adicionado o anticorpo de detecção (anti-TNF α biotilado) e o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase), os quais foram incubados ao abrigo da luz por duas horas a temperatura ambiente. Para a revelação do ensaio foi utilizado o substrato ABTS, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). O desenvolvimento da reação foi interrompido pela adição de SDS 1% e a leitura realizada em 540 nm. Os resultados da concentração de TNF α foram expressos em pg/mL. Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante de macrófagos infectados e tratados com 10 μ g/ml de LPS. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de macrófagos infectados tratados com DMSO 1%.

4.4.8 Ensaio de inibição da TR heteróloga de *T. cruzi* (TcTR) e *L. braziliensis* (LbTR)

A tripanotona redutase (TR) recombinante de *L. braziliensis* (LbTR) e de *T. cruzi* (TcTR) foi expressa em *E. coli* BL21 DE3 (pET14B) no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. Os ensaios de inibição enzimática foram realizados segundo o método descrito por Hamilton e colaboradores (2003). O fundamento da técnica consiste na redução do substrato tripanotona (T[S]₂) pela enzima LbTR ou TcTR (T[S]₂ → T[SH]₂) e regeneração da tripanotona reduzida (T[SH]₂ → T[S]₂) pelo ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB (reagente de Ellman) formando íons amarelos de tionitrobenzoato (TNB) de cor amarelada, os quais podem ser mensurados a 412 nm (Figura 5). Desta forma, o reagente de Ellman mantém constante a concentração do substrato e permite a linearidade da cinética enzimática.

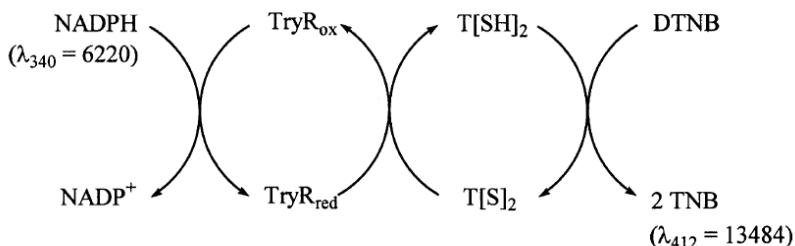


Figura 5. Representação esquemática da re-oxidação de tripanotona reduzida (T[S]₂) mediada por DTNB (Fonte: Hamilton et al., 2003).

Os ensaios de inibição da tripanotona redutase recombinante foram realizados em microplacas com 96 poços conforme descrito por Eger (2010). Os ensaios foram feitos em volume final de 250 µl contendo: 230 µl de tampão de ensaio (40 mM HEPES, 1 mM EDTA com pH ajustado para 7,5), *Lb*TR (41 ng) ou *Tc*TR (37 ng), 1 µM de tripanotona (Bachem, Torrance), 25 µM de DTNB (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 150 µM de NADPH (Sigma-Aldrich, Saint Louis) e diferentes concentrações dos compostos. Como controles foram utilizados o inibidor clomipramina (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em diferentes concentrações e o solubilizante DMSO 1%. Como branco, foram utilizados os compostos na maior concentração (100 µM) incubados com todos os reagentes, menos a enzima. A reação ocorreu com pré-incubação a 27°C durante 30 minutos e a leitura iniciada após a adição de 25 µM de DTNB em λ₄₁₂ nm, medindo-se a inclinação da curva durante 30 minutos (δAbs/δt). Os ensaios foram realizados em triplicata com três réplicas e os resultados foram expressos como inibição da atividade enzimática de 50% (CI₅₀) comparando com o controle DMSO 1%.

4.5 Determinação da lipofilicidade e avaliação estrutural dos compostos

A lipofilicidade das diaminas foi determinada através do cálculo do coeficiente de partição (logP) utilizando o programa MarvinSketch 5.6®. A avaliação estrutural foi realizada a partir das estruturas químicas com determinação do número de carbonos metilênicos, da distribuição das cadeias alquílicas e do peso molecular.

5. RESULTADOS

5.1 Triagem das atividades leishmanicida e tripanocida

A triagem inicial evidenciou que dos 17 compostos avaliados, 14 foram ativos ($CI_{50} \leq 20 \mu\text{M}$) contra promastigotas de *L. braziliensis* e 10 foram ativos contra epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* de derivados de diaminas frente a formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Compostos	CI_{50} (μM)	
	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>
DP22	13,6 (\pm 1,4)	14,5 (\pm 5,1)
DP22 (cloridrato)	14,2 (\pm 0,2)	14,1 (\pm 4,7)
D23	12,5 (\pm 0,6)	14,8 (\pm 0,9)
DP23 (cloridrato)	9,4 (\pm 3,4)	14,1 (\pm 4,9)
DP24	15,4 (\pm 2,4)	14,5 (\pm 1,3)
DP24 (cloridrato)	12,3 (\pm 3,5)	14,3 (\pm 0,7)
DP25	11,3 (\pm 2,8)	14,2 (\pm 2,6)
DP25 (cloridrato)	9,0 (\pm 2,9)	15,1 (\pm 2,7)
DP28	20,0	NA
DP28 (cloridrato)	NA	NA
CR40	18,3 (\pm 3,9)	NA
CR40 (cloridrato)	11,7 (\pm 4,1)	NA
GUT1c	NA	NA
RAG05	15,1 (\pm 1,1)	NA
RAG08	NA	NA
RAG10	12,2 (\pm 0,2)	13,5 (\pm 0,7)
RAG11	9,8 (\pm 0,4)	11,9 (\pm 2,4)
ANF/BNZ	0,13 (\pm 0,05)	31,2 (\pm 1,2)

NA=Não ativo na concentração de 100 μM . ANF=Anfotericina B e BNZ=benzonidazol.

Dentre os 17 compostos avaliados, 76,5% foram ativos contra promastigotas de *L. braziliensis* e 58,8% foram ativos contra epimastigotas de *T. cruzi*, com valores de CI_{50} variando de 9,0 a 18,3 μM e 11,9 a 15,1 μM , respectivamente. Quatro compostos (DP28, CR40, CR40Cl e RAG05), foram ativos apenas contra promastigotas de

L. braziliensis. Os demais compostos (DP28Cl, GUT1c e RAG08) não mostraram atividade antiparasitária numa concentração de até 100 μM . Os quatorze compostos com valores de $\text{CI}_{50} > 20 \mu\text{M}$ foram selecionados para os ensaios de citotoxicidade e atividade contra amastigotas intracelulares em macrófagos murinos.

5.2 Atividade leishmanicida, tripanocida e citotoxicidade das diaminas sobre as formas amastigotas intracelulares em macrófagos murinos

A citotoxicidade de 50% (CC_{50}) dos compostos para macrófagos murinos variou de 149,5 a $>300 \mu\text{M}$ (Tabela 3). De maneira geral, a forma cloridrato dos compostos mostrou-se mais citotóxica para os macrófagos que a forma não cloridratada, a exceção do composto DP22Cl. A CI_{50} dos diferentes compostos contra amastigotas intracelulares variou de 2,6 a 28,2 μM para *L. braziliensis*, de 3,0 a 15,5 μM para *L. chagasi* e de 1,6 a 23,6 μM para *T. cruzi*. O composto DP23 foi o mais ativo para as duas espécies de *Leishmania* (CI_{50} 2,6 a 3,0 μM) com IS variando de 100 a 115,4, enquanto que o composto DP24 foi o mais ativo para o *T. cruzi* (CI_{50} 1,6 μM) e $\text{IS} > 187$ (Tabela 3). O DP23Cl em concentrações $>10 \mu\text{M}$ mostrou-se altamente citotóxico para macrófagos infectados independente da espécie de parasito. Efeito semelhante foi observado para os compostos DP25, RAG10 e RAG11 em macrófagos infectados pelo *T. cruzi* (Tabela 3).

As figuras 6 e 7 mostram a redução da taxa de infecção e da carga parasitária de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e *L. chagasi* tratados por 48 horas com o composto DP23 em diferentes concentrações. Na concentração de 2 μM , a redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos infectados por *L. chagasi* foi de 13,7% e 52,6%, enquanto que para *L. braziliensis* a redução da taxa de infecção e da carga parasitária foi de 34,9% e 58,3%, respectivamente. Na concentração de 10 μM a redução da taxa de infecção e da carga parasitária foi de 17,3% e 57,7% para *L. chagasi* e de 63,4% e 88,2% para *L. braziliensis*, respectivamente. Considerando a CI_{50} , o composto DP23 foi cerca de 40 vezes menos ativo que a anfotericina B.

A redução da taxa de infecção e da carga parasitária de macrófagos infectados com *T. cruzi* e tratados por 48 horas com diferentes concentrações do composto DP24 estão mostrados na figura 8. Na concentração de 2 μM a redução da taxa de infecção e da carga parasitária foi de 80,6% e 89,6%. Já na concentração de 10 μM a

redução da taxa de infecção foi de 90,5% e da carga parasitária foi de 97,5%. Considerando a CI_{50} , o composto DP24 foi cerca de sete vezes mais ativo que o benzonidazol.

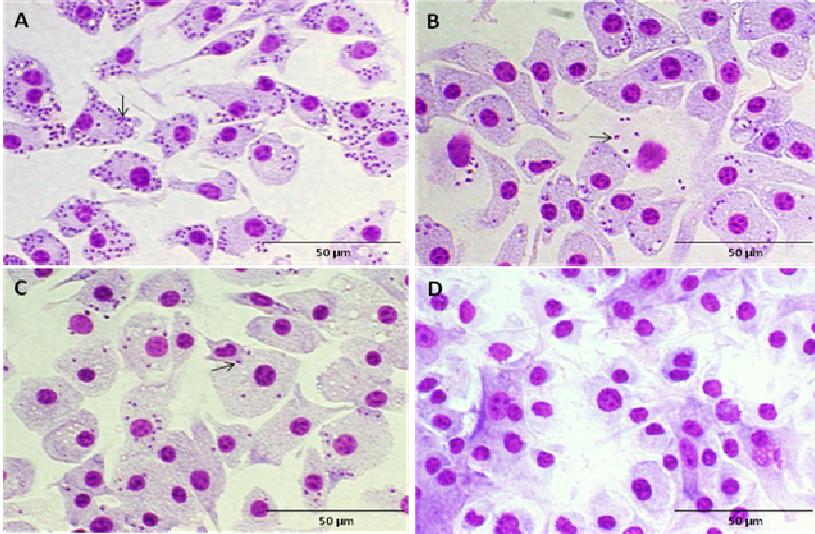


Figura 6. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e tratados com o composto DP23 em diferentes concentrações. (A) Controle; (B) DP23 (2 μ M); (C) DP23 (10 μ M) e (D) Anfotericina B (0,1 μ M). A seta indica as formas amastigotas intracelulares. Aumento: 400x.

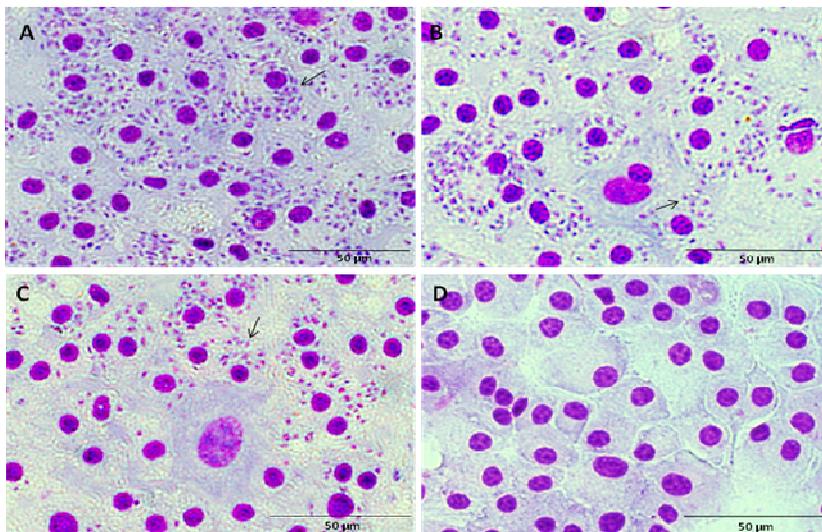


Figura 7. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* e tratados com o composto DP23 em diferentes concentrações. (A) Controle; (B) DP23 (2 μM); (C) DP23 (10 μM) e (D) Anfotericina B (0,1 μM). A seta indica as formas amastigotas intracelulares. Aumento: 400x.

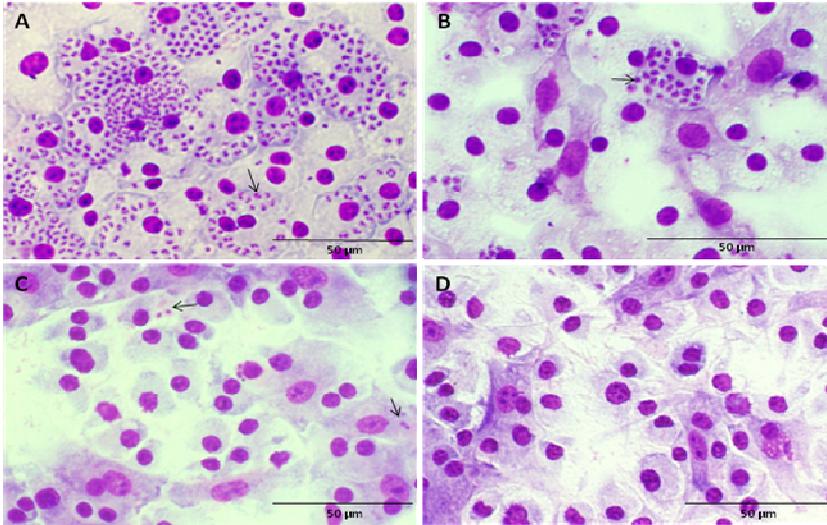


Figura 8. Redução da taxa de infecção e da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com o composto DP24 em diferentes concentrações. (A) Controle; (B) DP24 (2 μ M); (C) DP24 (10 μ M) e (D) Benzimidazol (20 μ M). A seta indica as formas amastigotas intracelulares. Aumento: 400x.

Tabela 3. Atividade e citotoxicidade dos compostos contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi* expressa em CI_{50} e índice de seletividade (IS) em relação ao macrófago murino (continua).

Compostos	MØ	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. chagasi</i>		<i>T. cruzi</i>	
	CC_{50} (μ M)	CI_{50} (μ M)	IS	CI_{50} (μ M)	IS	CI_{50} (μ M)	IS
DP22	220,9	8,5 (\pm 0,9)	26,0	8,0 (\pm 1,0)	27,6	23,6 (\pm 1,2)	9,4
DP22Cl	273,1	5,2 (\pm 0,8)	52,5	6,6 (\pm 0,7)	41,4	5,9 (\pm 0,1)	45,9
DP23	>300	2,6 (\pm 0,1)	>115,4	3,0 (\pm 0,8)	>100	9,2 (\pm 0,1)	>32,6
DP23Cl	217,6	CT	-	CT	-	CT	-
DP24	>300	8,2 (\pm 1,1)	>36,5	7,1 (\pm 0,3)	>42,2	1,6 (\pm 0,5)	>187,5
DP24Cl	240,8	4,6 (\pm 0,2)	52,3	6,2 (\pm 0,4)	38,8	8,7 (\pm 0,1)	27,6
DP25	220,3	5,3 (\pm 0,2)	41,6	7,1 (\pm 2,0)	31,0	CT	-
DP25Cl	174,3	4,4 (\pm 1,0)	39,6	4,3 (\pm 0,7)	40,5	5,2 (\pm 0,8)	33,3

IS= CC_{50}/CI_{50}

CT=citotóxico

Tabela 3. Atividade e citotoxicidade dos compostos contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi* expressa em CI_{50} e índice de seletividade (IS) em relação ao macrófago murino (conclusão).

Compostos	MØ	<i>L. braziliensis</i>		<i>L. chagasi</i>		<i>T. cruzi</i>	
	CC_{50} (μ M)	CI_{50} (μ M)	IS	CI_{50} (μ M)	IS	CI_{50} (μ M)	IS
CR40	216,2	11,7 (\pm 0,8)	18,5	9,1 (\pm 1,5)	23,7	NA	-
CR40Cl	149,5	4,3 (\pm 0,7)	34,8	12,5 (\pm 2,0)	12,0	NA	-
RAG05	227,5	7,4 (\pm 0,9)	30,7	14,0 (\pm 3,1)	16,2	NA	-
RAG10	216,7	28,2 (\pm 3,3)	7,7	15,5 (\pm 2,6)	14,0	CT	-
RAG11	168,0	5,3 (\pm 1,1)	31,7	5,6 (\pm 0,4)	30,0	CT	-
Anfotericina B	-	0,06(\pm 0,02)	-	0,07(\pm 0,03)	-	-	-
Benzonidazol	-	-	-	-	-	10,8 (\pm 1,5)	-
IS= CC_{50}/CI_{50}		CT=citotóxico		NA=não ativo			

5.3 Correlação da atividade antiparasitária com a estrutura e lipofilicidade dos compostos

O logP, a distribuição dos carbonos e o total de carbonos metilênicos das diaminas ativas está mostrada na tabela 4. Os valores de logP variaram de 3,58 a 7,14. As duas diaminas mais ativas, DP23 e DP24, apresentaram valores de logP de 5,36 e 4,47 respectivamente (Figura 9). A distribuição dos carbonos metilênicos é mostrada em dois grupos distintos: -NH-4 e -NH-6 apresentando 4 e 6 carbonos metilênicos, respectivamente, após o grupamento amina e variando de 9 a 15 carbonos nas estruturas de ambos grupos. O número total de carbonos metilênicos nos compostos variou de 13 a 19. As diaminas mais ativas contra *Leishmania* e *T. cruzi* apresentam distribuições 13-NH-4 e 9-NH-6; e 17 e 15 carbonos, respectivamente.

Tabela 4. Relação da atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e *T. cruzi* com características químicas das diaminas: peso molecular (MM), lipofilicidade (logP) e distribuição dos carbonos metilênicos nas estruturas: $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{NH}(\text{CH}_2)_y\text{NH}_2]$ onde $x = 9, 11, 13$ e 15 ; $y = 4$ ou 6

Composto	IC ₅₀ <i>L. braziliensis</i>	IC ₅₀ <i>L. chagasi</i>	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i>	MM g/Mol	logP	Distribuição C metilênicos	Total de C metilênicos
DP22	8,5	8,0	23,6	228	3,58	9-NH-4	13
RAG11	5,3	5,6	CT	256	4,47	11-NH-4	15
DP23	2,6	3,0	9,2	284	5,36	13-NH-4	17
RAG10	28,2	15,5	CT	312	6,25	15-NH-4	19
DP24	8,2	7,1	1,6	250	4,47	9-NH-6	15
CR40	11,7	9,1	NA	284	5,36	11-NH-6	17
DP25	5,3	7,1	5,2	312	6,25	13-NH-6	19

A relação atividade antiparasitária (CI₅₀) com a lipofilicidade (logP) das diaminas foi estabelecida pela análise dos valores de atividade leishmanicida e tripanocida com os valores de logP das diaminas separadas em dois grupos de distribuição de carbonos metilênicos, -NH-4 e -NH-6. A Figura 8 mostra que no grupo com a distribuição -NH-4 o valor de logP que obteve melhor relação com

atividade foi 5,36. Dentre os compostos que possuem a distribuição -NH-6 a melhor relação foi com o logP 6,25.

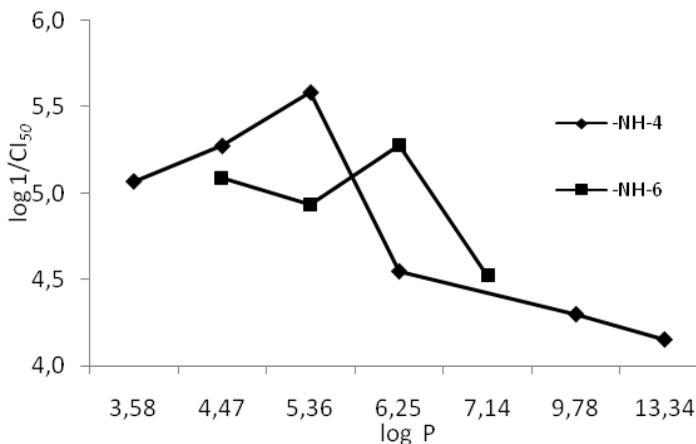


Figura 9. Relação da atividade antiparasitária (CI₅₀) com a lipofilicidade (logP) das diaminas com distribuição de carbonos metilênicos -NH-4 e -NH-6.

5.4 Efeito dos compostos sob o potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) em formas epimastigotas

A alteração do potencial de membrana mitocondrial e da integridade celular foram avaliados utilizando os corantes rodamina (R123) e iodeto de propídeo, respectivamente, através de citometria de fluxo. A Figura 10 mostra que epimastigotas de *T. cruzi* tratados com DP24 nas concentrações de 6 e 12 μ M apresentaram progressiva despolarização da membrana mitocondrial (painel superior) concomitante a diminuição da viabilidade celular (painel inferior) a partir de 6 horas de incubação. Após 24 horas de incubação, a mortalidade celular atingiu taxas de cerca de 90% e 40% nas concentrações de 6 e 12 μ M, respectivamente (Figura 9). Contrariamente, epimastigotas não expostos ao DP24 (área hachureada) não apresentaram alterações no (ψ_m) e se mantiveram viáveis ao longo de toda a avaliação.

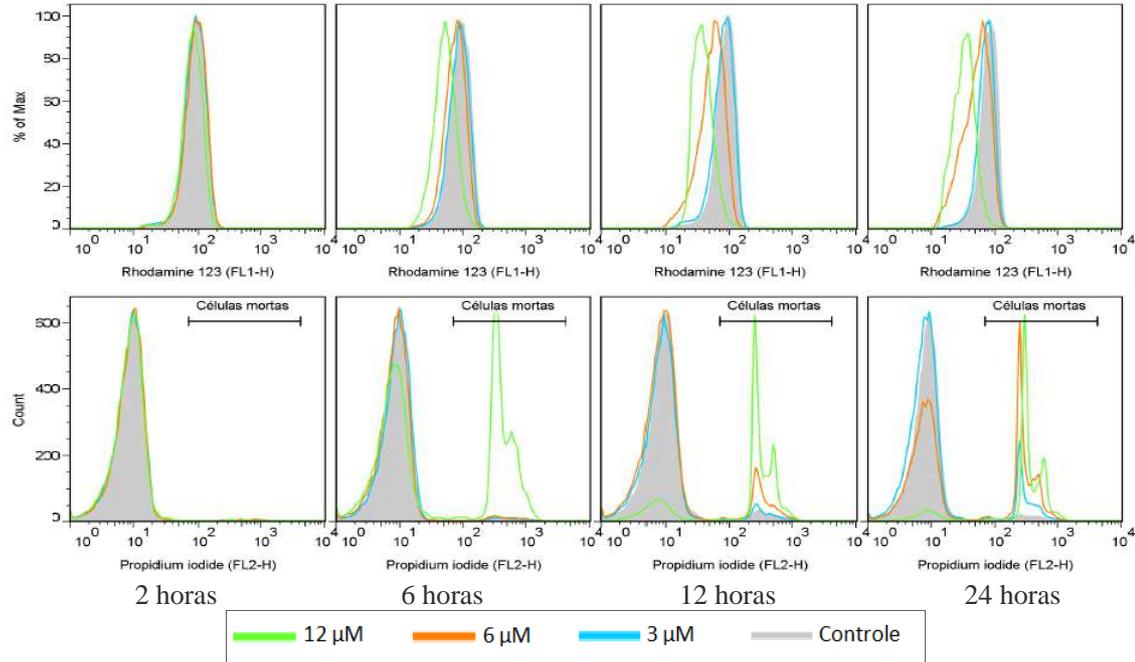


Figura 10. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ψ_m) e viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi*, marcadas com R123 (painel superior) e iodeto de propídio (painel inferior), respectivamente. Com leituras por citometria de fluxo após diferentes tempos de incubação com DP24 em diferentes concentrações.

A análise concomitante do ensaio de R123 e IP, durante as duas primeiras horas de tratamento com DP24 não resultou em alteração do potencial de membrana mitocondrial nem morte celular. No entanto, no tempo 6 horas de tratamento ocorreu a despolarização e morte celular somente na concentração de 12 μM do composto. Nos tempos de 12 e 24 horas de tratamento observou-se um aumento na despolarização e morte celular nas concentrações de 12 e 6 μM (Figura 11).

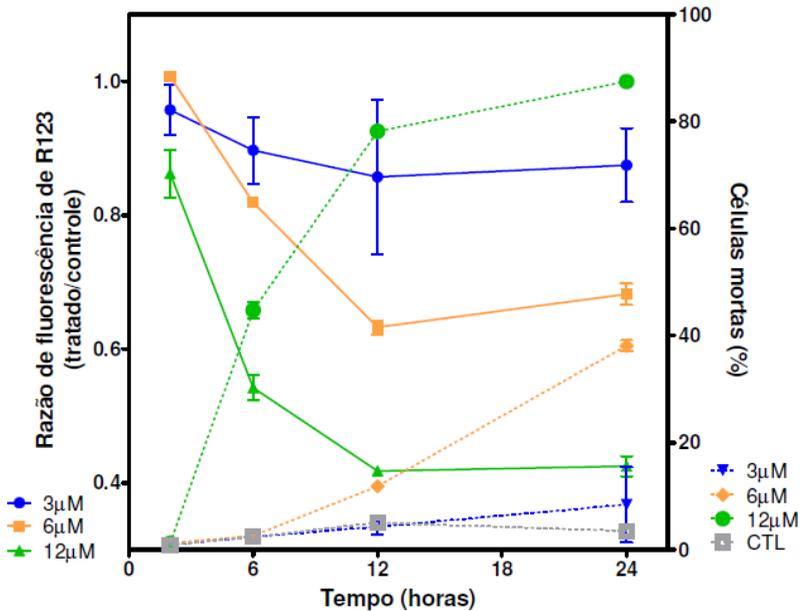


Figura 11. Dados de citometria de fluxo de formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com DP24 em função da concentração do composto e do tempo de incubação. O eixo Y, à esquerda, indica a relação média da intensidade de fluorescência de R123 em epimastigotas DP24-tratados/não tratados (linhas sólidas), enquanto que o eixo Y, à direita, indica o percentual de epimastigotas mortas (linhas pontilhadas), marcados pelo iodeto de propídio.

5.5 Detecções de $\text{TNF}\alpha$ e NO em macrófagos tratados com diaminas

Macrófagos infectados e não infectados submetidos ao tratamento com os compostos ativos não apresentaram uma elevação nos níveis de TNF α , sugerindo que esta via não participa do mecanismo de destruição intracelular do parasito. Por outro lado, TNF α foi detectado no sobrenadante de macrófagos não infectados e estimulados com LPS (dados não mostrados).

Em relação à ativação da via do óxido nítrico, os resultados do presente trabalho mostraram que macrófagos infectados por *T. cruzi* ou por *L. braziliensis* não foram estimulados a produzir NO quando tratados com o composto DP23, mas foram estimulados mediante o tratamento com DP24, onde foi possível detectar 2,4 μ M de nitrito no sobrenadante da cultura. Entretanto, esta indução foi pelo menos cinco vezes menor do que o controle estimulado com LPS (Figura 12).

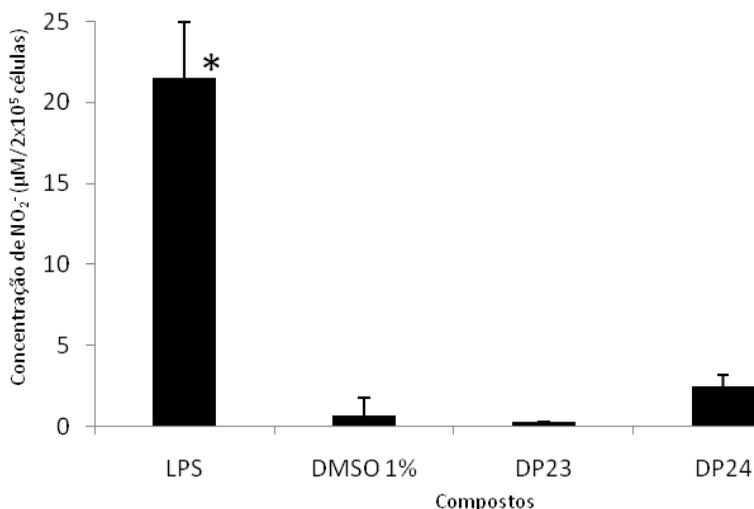


Figura 12. Níveis indiretos de produção de NO por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e *T. cruzi* e tratados com 10 μ M das diaminas DP23 e DP24. Controle positivo: LPS 10 μ g/ml; controle negativo: DMSO 1%. * diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo.

5.6 Ensaios de inibição *in vitro* da tripanotiona redutase recombinante de *T. cruzi* (TcTR) e de *L. braziliensis* (LbTR)

Inicialmente foi padronizada a concentração necessária de cada uma das enzimas através do coeficiente de correlação linear (Figura 13 A e B). Para a tripanotona redutase recombinante de *L. braziliensis* (*LbTR*) a concentração foi de 41,3 ng ($r = 0,9999$) e para a tripanotona redutase recombinante de *T. cruzi* (*TcTR*) a concentração foi de 36,71 ng ($r = 0,9885$).

Os compostos com maior atividade antiparasitária intracelular foram submetidos aos ensaios de inibição da tripanotona redutase. Para a triagem, os compostos foram testados na concentração final de 100 μM (Figura 14 A e B).

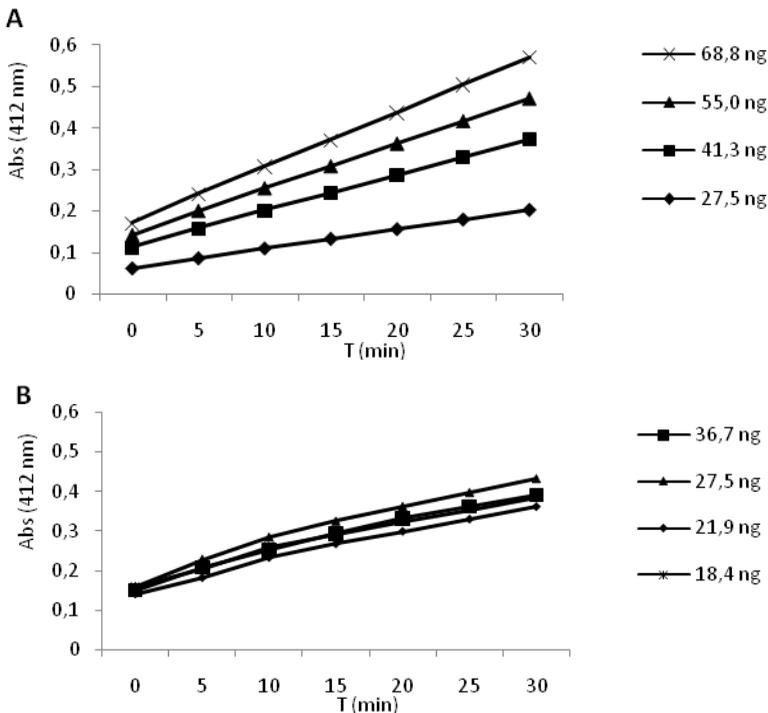


Figura 13. Titulação das enzimas para a padronização da concentração enzimática para os ensaios de inibição. A- *LbTR* (41,3 ng) B- *TcTR* (36,7 ng).

Quatro compostos (DP23Cl, DP25, DP25Cl e RAG10) inibiram em mais de 50% a atividade enzimática de *LbTR*, enquanto que somente o composto DP25Cl causou inibição superior a 50% da atividade

enzimática da *Tc*TR. A CI_{50} destes compostos variou de 46,3 a 54 μ M para *Lb*TR e 73,3 μ M para *Tc*TR, cujos valores foram cerca de dez vezes maiores do que a do controle clomipramina.

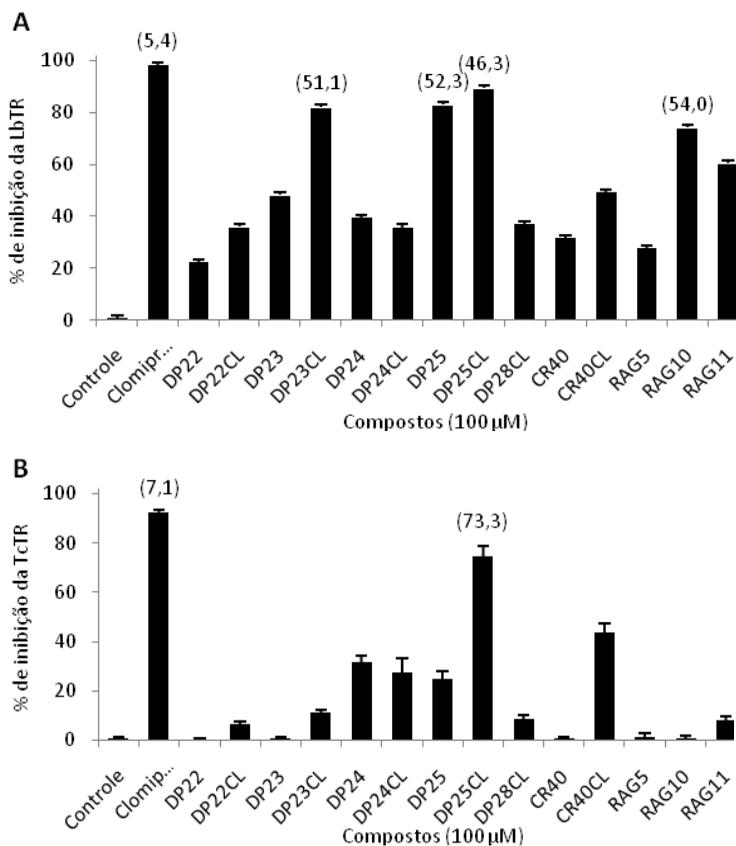


Figura 14. Taxa de inibição da enzima tripanotriazine redutase recombinante (%) pelas diaminas na concentração de 100 μ M. A- tripanotriazine redutase de *L. braziliensis* (*Lb*TR). B- tripanotriazine redutase de *T. cruzi* (*Tc*TR). Entre parênteses: CI_{50} (μ M) das diaminas e do inibidor clomipramina.

6. DISCUSSÃO

Embora as doenças tropicais negligenciadas afetem cerca de 25% da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, estes agravos de saúde parecem ser pouco atrativos para a indústria farmacêutica (TROUILLER *et al.*, 2002; WHO, 2010). A precariedade das condições de vida aliado a desorganização social, a ausência de ações políticas efetivas e de programas educacionais contribuem para a manutenção destas doenças nas regiões mais pobres do mundo (CRUZ *et al.*, 2009). Apesar do grande progresso científico das últimas décadas (sequenciamento dos genomas do homem, de vários patógenos de importância na saúde e de seus vetores), os avanços no conhecimento da biologia dos parasitos não se traduziram ainda efetivamente em programas mais abrangentes de interrupção da transmissão e no desenvolvimento de vacinas e/ou de novos agentes quimioterápicos mais efetivos e acessíveis.

As leishmanioses assim como a malária são as doenças parasitárias para as quais o desenvolvimento de uma vacina parece ser factível. Apesar de resultados em modelos animais indicarem a possibilidade de imunização protetora contra a *Leishmania* e de uma vacina efetiva para leishmaniose visceral canina estar em fase avançada de testes, nenhuma das vacinas ou formulações vacinais desenvolvidas até o presente foi aprovada em estudos clínicos em humanos (KEDZIERSKI, 2010). Em decorrência disso, o controle da doença depende ainda primariamente do diagnóstico precoce e do tratamento medicamentoso (CRUZ *et al.*, 2009).

O tratamento das leishmanioses está limitado a um número reduzido de fármacos com eficácia limitada, custos elevados e toxicidade ao paciente (KEDZIERSKI *et al.*, 2009, MURRAY *et al.*, 2005). Os antimoniais pentavalentes, fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses requerem tratamento prolongado, administração parenteral e em muitos casos, ocasionam efeitos colaterais severos resultando no abandono do tratamento pelo paciente (MURRAY *et al.*, 2005; CRUZ *et al.*, 2009).

A pesquisa de novos fármacos é um processo oneroso, de longa duração que requer a participação de equipes multidisciplinares e necessita de investimentos vultuosos. Em média, estima-se que para se ter um novo fármaco em fase de testes clínicos um investimento de 500 milhões de dólares e 10 a 12 anos de pesquisa seja necessário (FREARSON *et al.*, 2007). No período de 1975 a 2009 dos 52 novos medicamentos aprovados para doenças negligenciadas, 82% deles

constam da lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (COHEN et al., 2009). No entanto, cerca de 70% destes medicamentos atendem apenas 3 doenças (malária, AIDS e tuberculose) e somente três foram introduzidas no tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos (COHEN et al., 2009).

Inúmeros compostos de diferentes classes químicas obtidas a partir de produtos naturais ou por síntese tem sido estudados quanto às suas propriedades antiparasitárias. Poliaminas são moléculas de natureza policatiônica presentes em microrganismos, plantas e animais que estão envolvidas em processos essenciais de diferenciação e crescimento celular (FAIRLAMB; Le QUESNE, 1997). A diamina (putrescina), a triamina (espermidina) e a tetramina (espermina) são as poliaminas mais conhecidas e estudadas. Devido a sua natureza policatiônica, essas moléculas podem ligar-se e estabilizar diferentes polímeros ricos em cargas negativas como DNA, fosfolípidos e proteínas (FAIRLAMB; Le QUESNE, 1997). O metabolismo de poliaminas é de vital importância para o ciclo celular e desta forma se constitui em alvo farmacológico relevante para o desenvolvimento de novos compostos quimioterapêuticos (HUANG et al., 2005). Diferentes estudos demonstraram que vários análogos de poliaminas possuem propriedades antitumoral, antibacteriana, antiparasitária, entre outras (DEL OLMO et al 2002, 2012; GIORDANI et al., 2009; HUANG et al., 2005; LABADIE; CHOI; AVERY, 2004; SPIGELMANN, 2007; XIAO et al., 2005).

Estudos de outros autores demonstraram promissora atividade leishmanicida de diaminas lipofílicas e amino alcoóis contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (DA COSTA et al., 2009; DEL OLMO et al., 2002), *T. cruzi* e *T. brucei* (DEL OLMO et al., 2012; REZENDE-JUNIOR et al., 2010; REBOLLO et al., 2008), *Plasmodium falciparum* (LABADIE; CHOI; AVERY, 2004) e *Trichomonas vaginalis* (GIORDANI et al., 2009).

No presente estudo, das 17 diaminas testadas, 14 foram ativas contra promastigotas de *L. braziliensis* e *L. chagasi* e 10 contra epimastigotas de *T. cruzi* com $CI_{50} \leq 20 \mu M$. De maneira geral os compostos foram sempre mais ativos contra *Leishmania* spp. do que contra *T. cruzi*. Del Olmo et al. (2002) avaliando 33 derivados de poliaminas, verificaram que as diaminas lipofílicas apresentaram melhor atividade antiparasitária do que os amino alcoóis contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, com inibição de até 70% a $10 \mu g/mL$ em 3 compostos. Em outro estudo Del Olmo et al.

(2012), demonstrou que 14 diaminas lipofílicas ensaiadas contra promastigotas de *L. braziliensis* apenas 4 apresentaram atividade antiproliferativa do parasito com CI_{50} variando de 59 a 81 μM . Coimbra et al. (2009) avaliando a atividade leishmanicida de 23 amino alcoóis verificaram que 10 compostos foram ativos contra promastigotas de *L. chagasi* e sete contra *L. amazonensis* com $CI_{50} < 10 \mu M$. Da Costa et al. (2009) estudando uma série de 17 diaminas lipofílicas, verificaram que 7 apresentaram atividade antiproliferativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* com $CI_{50} < 10 \mu M$. Os autores verificaram que um derivado de etilenodiamino apresentou CI_{50} de 0,9 e 0,26 μM contra *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente, mostrando atividade leishmanicida semelhante a anfotericina B. Em nosso estudo a CI_{50} das 14 diaminas com atividade leishmanicida variou de 9 a 20 μM , contra promastigotas de *L. braziliensis*.

O composto 1,4 diamino-2-butanona (DAB), um análogo da poliamina putrescina e inibidor da enzima ODC em tripanosomatídeos mostrou atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. donovani* e *L. amazonensis* (LABADIE; CHOI; AVERY, 2004; VANNIER-SANTOS et al., 2008). Esses autores demonstraram que na concentração de 100 μM de DAB ocorreu completa inibição da ODC.

Rezende-Junior et al. (2010), demonstraram que diaminas lipofílicas foram mais ativas do que os amino alcoóis contra tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*. Neste estudo, a diamina N-dodecil-1,3-propanodiamina e N-dodecil-1,2-etanodiamina apresentaram CI_{50} de 128,9 e 136,8 μM , respectivamente contra tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*.

Recentemente, Del Olmo et al. (2012) avaliando a atividade tripanocida de 20 compostos derivados de 1,2-diamina e 2-aminoalcano-1-ol verificaram que 8 deles apresentaram elevada atividade contra formas tripomastigotas de *T. brucei* com CI_{50} variando de 436 a 961 nM. Em nosso estudo, 10 diaminas apresentaram atividade tripanocida contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (CI_{50} 11,9 a 15,1 μM). Entretanto, nenhuns desses estudos avaliaram a atividade destes compostos contra formas intracelulares dos parasitos.

No presente estudo, os compostos foram inicialmente avaliados quanto à sua atividade leishmanicida e tripanocida contra promastigotas de *L. braziliensis* e epimastigotas de *T. cruzi* como um critério de seleção de compostos ativos para ensaios de citotoxicidade e atividade antiparasitária contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi* em macrófagos murinos. As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) dos 14 compostos variaram de 149,5 a $>300 \mu M$ e as CI_{50}

contra formas amastigotas variaram de 2,6 a 28,2 μM para *L. braziliensis*, de 3,0 a 15,5 μM para *L. chagasi* e de 1,6 a 23,6 μM para *T. cruzi*. Os compostos cloridratados foram mais citotóxicos que suas formas não cloridratadas a exceção do composto DP22. De maneira inesperada os compostos DP23Cl, DP25, RAG10 e RAG11 apresentaram maior citotoxicidade em macrófagos infectados independente da espécie de parasito. Pinheiro et al. (2011) verificaram que compostos aminados com cadeia alquílica apresentaram menor toxicidade do que compostos aminados com o grupo protetor mono-*t*-butiloxicarbonil como substituinte. Além da diferença nas substituições, essas moléculas apresentaram diferença no tamanho da cadeia alquílica. Moléculas com cadeias maiores se mostraram mais tóxicas, porém foram as mais ativas contra *L. amazonensis*. Isso mostra que a ação dos compostos e sua interação com os possíveis alvos é dependente da estrutura química, uma vez que as alterações têm como consequência as mudanças das propriedades físico-químicas, o que sugere a interferência no grau de citotoxicidade (SMITH, et al., 2011).

O composto DP23 (*N*-tetradecil-1,4-butanodiamina) foi o mais ativo para *Leishmania*, com IS de >100 a >115,4 e o DP24 (*N*-decil-1,6-hexanodiamina) foi o mais ativo contra *T. cruzi* com IS >187,5. Pinheiro et al. (2011), avaliando a atividade leishmanicida intracelular de 18 derivados de poliaminas em macrófagos murinos mostraram que as diaminas mono-*t*-butiloxicarbonil as mais ativas contra *L. amazonensis* apresentaram CI_{50} de 38,2 e 12,6 μM e IS < 6,4. Em nosso estudo, os compostos DP23 e DP24 mostraram-se seletivos respectivamente, contra formas amastigotas de duas espécies de *Leishmania* e de *T. cruzi*.

Apesar de vários estudos confirmarem a atividade de diaminas em diferentes espécies de tripanosomatídeos, poucas avaliações têm sido realizadas em formas clinicamente relevantes dos parasitos (TAVARES et al., 2005). Amastigotas axênicas de *Leishmania* podem ser facilmente obtidos e tem sido utilizados em ensaios de atividade antiparasitária (Da SILVA, 2008). Contudo, estudos de proteômica demonstraram diferenças significativas no perfil de proteínas expressas entre amastigotas axênicas e amastigotas obtidos de lesão de animais ou de cultivo celular (PAAPE, et al., 2008). Desta forma, a utilização de amastigotas axênicos pode não ser o melhor modelo para avaliação de atividade antiparasitária. Por outro lado, a realização de ensaios contra formas amastigotas intracelulares é ainda um processo muito laborioso, uma vez que a avaliação de atividade requer a contagem de parasitos em microscópio. Já para o *T. cruzi* já há um ensaio padronizado utilizando

parasitos transfectados com o gene da β -galactosidase, o que permite a leitura colorimétrica do ensaio (ROMANHA et al., 2010). No entanto, para *Leishmania* não há ainda disponível cepas de parasitos com transfecção estável de genes de interesse para ensaios de atividade antiparasitária.

Com objetivo de verificar a possível relação química com a atividade biológica analisamos as alterações nas estruturas, como a distribuição de carbonos e dimensão por alteração no número de grupamentos metileno (-CH₂-) nas cadeias. Os compostos foram agrupados segundo a disposição dos carbonos metilênicos em relação aos grupamentos amina para a análise das estruturas (Tabela 4).

O número de carbonos metilênicos variou de 13 a 21 em compostos testados contra *Leishmania*. A variação no tamanho da cadeia alquílica acarreta em aumento ou redução do logP, coeficiente de partição de uma substância entre a fase orgânica e a aquosa. Estudo com derivados de poliaminas semelhantes às diaminas avaliadas no presente trabalho mostrou que a atividade intracelular contra *L. amazonensis* está relacionada com a lipofilicidade das moléculas possibilitando que o composto alcance os amastigotas no vacúolo parasitóforo (PINHEIRO et al., 2011).

O composto DP23, foi a molécula mais promissora contra *Leishmania*, entre todas as testadas. Essa molécula apresenta logP de 5,36 e 17 carbonos metilênicos em sua estrutura. Pinheiro et al. (2011) observaram que nas moléculas mais ativas contra *L. amazonensis* o logP variou de 3,51 a 4,52. Contudo, a redução no número de carbonos entre os grupamentos amina e consequente redução do logP para -1,81 ocasionou uma diminuição de dez vezes na atividade antiparasitária. Em nosso estudo verificou-se que o aumento da cadeia acima de 19 carbonos metilênicos também reduziu a atividade. Compostos com 21 a 34 carbonos (DP28, GUT1c, RAG05 e RAG08) não apresentaram atividade biológica contra formas promastigotas de *Leishmaniae* epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 1). Isto provavelmente é determinado pela elevada massa molecular de compostos com cadeias carbônicas longas que embora mais lipofílicas apresentam logP elevados (7,14 a 13,34), mostrando que a atividade antiparasitária depende de uma característica lipofílica ideal.

Embora os compostos DP23 e CR40 apresentem o mesmo logP (5,36) e o mesmo número de carbonos metilênicos (17), a distribuição dos carbonos nestas diaminas é diferente. O composto DP23 apresenta distribuição 13-NH-4 e o CR40 11-NH-6, ou seja, somente o número de carbonos metilênicos e o logP parecem não ser os fatores determinantes

para a atividade biológica da molécula. O composto DP24 com distribuição 9-NH-6, 15 carbonos metilênicos e logP de 4,47 foi o mais promissor contra amastigotas de *T. cruzi*. Rezende-Júnior et al. (2010) mostraram que as poliaminas com distribuições 11-NH-3 e 11-NH-2, tiveram maior atividade antiparasitária contra tripomastigotas de *T. cruzi*. Estruturas que possuíam cadeias carbônicas menores apresentaram em menor atividade biológica, mostrando a importância da lipofilicidade. Apesar da atividade promissora da diamina DP24 a avaliação da estrutura em relação à atividade tripanocida ficou comprometida, uma vez que somente 6 diaminas foram ativas contra formas intracelulares de *T. cruzi* e essas moléculas apresentaram reduzida variabilidade na distribuição das estruturas químicas (Tabela 4).

Com objetivo de verificar possíveis mecanismos de ação das diaminas mais ativas foram realizados ensaios de citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 (R123) como marcador de integridade do potencial de membrana mitocondrial e iodeto de propídeo como marcador de viabilidade de parasitos, após a incubação com os compostos ativos. As mitocôndrias são organelas essenciais para produção energética celular, e o equilíbrio do metabolismo energético é estabelecido através de um gradiente de íons através da membrana mitocondrial. Variações no potencial de membrana induzida por diversos compostos estão associados com a morte de parasitos intracelulares como *L. amazonensis* e *T. cruzi* (FONSECA-SILVA et al., 2011; MACEDO-SILVA et al., 2011; MENNA-BARRETO et al, 2005).

O potencial de membrana é gerado pela diferença na concentração de íons no interior e exterior da membrana e pode ser avaliado com R123, um corante catiônico lipofílico que atravessa facilmente a membrana mitocondrial e se acumula no interior da organela (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980). Quando a membrana está intacta o gradiente de concentração de R123 é determinado pelo potencial diferencial transmembranar, resultando em um acúmulo do corante no interior da membrana. Quando a célula se despolariza, ocorre o mecanismo inverso, há menor distribuição de cargas negativas no interior da membrana e o corante se acumula no exterior da membrana, reduzindo a intensidade da fluorescência (KOOPMANN et al., 2005; JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980). Contrariamente, por ser impermeável à membrana íntegra, o iodeto de propídeo (IP) é utilizado como corante vital, sendo que nas células inviáveis há uma forte marcação do corante ao DNA, de maneira que a intensidade da

fluorescência é inversamente proporcional à viabilidade celular. A perda da integridade da membrana plasmática é um indicativo de necrose ou de apoptose tardia (KROEMER *et al*, 2009).

Esta abordagem é utilizada em diversos estudos de atividade antiparasitária e mostrou que alguns análogos de lisofosfolídeos como a adelfosina, a ilmofosina e a miltefosina podem atuar sobre a mitocôndria de formas promastigotas de *L. amazonensis* (SANTA-RITA, *et al.*, 2004). Menna-Barreto *et al.* (2007) ao analisar a ação de naftoimidazóis sobre mitocôndria e DNA em *T. cruzi* verificaram que ocorre uma diminuição dose-dependente da fluorescência com R123 em formas epimastigotas e tripomastigotas.

No presente estudo, foi observado que a diamina DP24 a 3 μM não teve efeito sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* ao longo de 24 horas de incubação. Entretanto, a partir das 6 horas de incubação, houve uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, de forma concentração dependente. Entretanto, o dano à mitocôndria sempre foi concomitante à perda da viabilidade celular. Desta forma, não é possível afirmar que a interrupção da cadeia respiratória, demonstrada pela R123, seja decorrente de um efeito primário, sugerindo ser muito mais um efeito secundário observado em células em avançado estágio de morte celular.

A atividade dos antimoniais utilizados na terapia anti-leishmania são dependentes da ativação celular e da liberação de citocinas (IFN γ e IL-10). Da mesma forma a atividade tripanocida do benzonidazol envolve a participação de citocinas (IFN γ e IL-12), fazendo da resposta imunológica do hospedeiro um dos principais fatores que podem interferir na eficácia do tratamento da doença de Chagas (FERRAZ *et al*, 2007). A indução de óxido nítrico NO e de citocinas tem sido descrita como via alternativa de atuação antiparasitária de compostos. O NO é o mediador de processo oxidativo intracelular de maior importância produzido por macrófagos ativados, e é responsável pela redução dos amastigotas intracelulares (BHATTACHARJEE *et al.* 2008; ZHANG *et al.*, 2010). Em contraste com os antimoniais pentavalentes, compostos como a Anfotericina B e o Miltefosine funcionam independentemente do sistema imune, mostrando toxicidade direta contra os parasitos intracelulares (SAHA *et al.*, 2007; GRIEWANK *et al.*, 2010).

No presente estudo, analisamos a indução de NO e TNF α em macrófagos murinos infectados e não infectados após o tratamento com as diaminas ativas contra *Leishmania* e *T. cruzi*, como um possível

mediador responsável pela inibição da proliferação intracelular desses parasitos. No entanto, nenhum dos compostos induziu a produção de NO ou TNF α , sugerindo que as diaminas não induzem essa resposta celular neste modelo *in vitro*. No entanto, compostos diaminados tem mostrado efetividade contra tripanosomatídeos em outros alvos como as enzimas ODC e AdoMetDC, o mecanismo de transporte transmembrana e o mecanismo de tióis da via de biossíntese de poliaminas (HASNE et al., 2010; NISHIMURA et al., 2006; TORRIE et al., 2009).

O mecanismo de tióis confere defesa contra o estresse oxidativo que é dependente de poliaminas biossintetizadas, possuindo como enzimas chaves a tripanotiona sintase e a tripanotiona redutase que são alvos validados para desenvolvimento de novos compostos antiparasitários (KAPOOR; SACHDEV; MADHUBALA et al., 2000; TORRIE et al., 2009). Tripanotiona é um tiol de baixo peso molecular sintetizado pela conjugação de glutationa reduzida e da poliamina espermidina. A homeostase da tripanotiona é estabelecida pela constante redução da sua forma oxidada [T(SH) $_2$] em dissulfeto [T(S) $_2$] pela tripanotiona redutase, enzima característica de tripanosomatídeos que atua como um protetor celular contra o estresse oxidativo gerado pelo mecanismo de defesa do hospedeiro (KHAN, 2007).

Em mamíferos o mecanismo de defesa enzimático contra radicais livres inclui a superóxido desmutase, catalase, glutationa peroxidase e glutationa-S-transferase e os mecanismos não enzimáticos são os compostos redutores o α -tocoferol, ascorbato, β -caroteno e a glutationa reduzida. Análogos de poliaminas e derivados de diaminas tem sido descritos como inibidores da biossíntese de poliaminas em *Leishmania* e *Trypanosoma* (ARIYANAYAGAM et al., 2003; BARKER et al., 2009; BOITZ et al., 2009; SOARES; ALVES; BECHARA, 2011; VANNIER-SANTOS et al., 2008).

O análogo de poliamina 1,4-diamino-2-butanona (DAB) que atua como inibidor da ODC promove uma significativa diminuição na concentração de poliaminas e redução na proliferação intracelular de *Leishmaniain in vitro* (VANNIER-SANTOS et al., 2008). Além disso, os autores observaram alteração na arquitetura celular, disfunção mitocondrial e aumento de peroxidação de lipídeos. Soares e colaboradores (2011) demonstraram que a ação de oxidação de DAB catalisada por metais provoca o aumento de radicais livres mostrando que além de reduzir a concentração de tripanotiona por inibição da ODC, comprometeu mecanismo de tióis com a alteração no balanço redox.

Recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Protozoologia – UFSC, validou o ensaio de inibição da enzima tripanotona redutase utilizando a enzima recombinante de *T. cruzi* (*TcTR*) e de *L. braziliensis* (*LbTR*) obtida por expressão heteróloga (EGER, 2010; NUNES, 2011). O estabelecimento desta metodologia permite um novo modelo de investigação do mecanismo de ação de compostos naturais ou sintéticos. No presente estudo, 14 diaminas foram testadas quanto a sua atividade inibitória da tripanotona redutase de *L. braziliensis* e *T. cruzi*. Quatro compostos (DP23Cl, DP25, DP25Cl e RAG10) na concentração de 100 μ M inibiram entre 74,2% e 89,4% a atividade enzimática de *LbTR* e somente o composto DP25Cl inibiu *TcTR* na mesma proporção. Estes resultados sugerem diferenças significativas entre essas duas enzimas e mostram a necessidade de utilização destes dois sistemas nos ensaios de inibição da atividade. Nunes (2011), analisando a atividade inibitória de oito chalconas com atividade leishmanicida observou que os compostos 1- (3'-hidroxifenil)-3- (2,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-ona e 1- (3',4',5'- trimetoxifenil)-3-fenil-2-propen-1-ona, na concentração de 100 μ M, inibiram a atividade enzimática de *LbTR* em 42% e 27%, respectivamente. As diaminas DP25Cl, DP25, DP23Cl e RAG10 que na concentração de 100 μ M inibiram a atividade da *LbTR* em 89%, 82,9%, 82,1% e 74,2%, respectivamente não mostraram expressiva atividade antiparasitária contra formas amastigotas. Embora validada como um importante alvo terapêutico, vários artigos científicos vem discutindo a correlação entre os inibidores *in vitro* da TR com a atividade antiparasitária destes compostos. Girault et al (2001) mostraram ausência de correlação entre potentes inibidores da TR como os aminodifenilsulfetos (CI50 = 200 a 750 nM) e sua atividade antiparasitária *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. infantum* e tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei*. Eger (2010) avaliando o ácido gálico e vários de seus ésteres observou que o ácido gálico que teve uma atividade inibitória sobre a *TcTR* superior a clomipramina, não mostrou nenhum efeito contra formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Por outro lado, vários ésteres de galato que mostraram um potente efeito tripanocida contra formas amastigotas *in vitro* promoveram apenas uma fraca inibição da TR.

7. CONCLUSÕES

Doze entre 17 diaminas avaliadas apresentaram efeito inibitório *in vitro* em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. chagasi*. No entanto, nenhum dos compostos foi mais ativo que a anfotericina B;

Seis diaminas foram ativas contra formas intracelulares de *T. cruzi*. O composto DP24 foi seis vezes mais ativo que o benzonidazol;

A citotoxicidade 50% das diaminas para macrófagos murinos variou de 149,5 a $> 300 \mu\text{M}$ sendo os compostos cloridrados mais citotóxicos que seus análogos não cloridrados;

O IS dos compostos mais ativos contra *Leishmania* (DP23) e *T. cruzi* (DP24) foram de >100 e $>187,4$, respectivamente;

Diaminas alquílicas com mais de 19 carbonos metilênicos em sua estrutura não apresentaram atividade antiparasitária para *Leishmania* e *T. cruzi*;

A despolarização da membrana mitocondrial em formas epimastigotas de *T. cruzi* parece não ser causada por efeito primário nas mitocôndrias uma vez que a perda da polaridade foi verificada concomitante à morte celular;

Não houve indução de NO e/ou TNF α em macrófagos infectados e tratados com as diaminas *N*-tetradecil-1,4- butanodiamina (DP23) e *N*-decil-1,6-hexanodiamina (DP24);

Os compostos DP23Cl, DP25, DP25Cl, RAG10 apresentaram efeito inibitório sobre a *LbTR* e o composto DP25Cl sobre a *TcTR* na concentração de $100 \mu\text{M}$.

8. REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CAÑAVATE, C.; et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.100, p.1 63-172, 1999.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ARIYANAYAGAM, M.R.; OZA, S.L.; MEHLERT, A.; FAIRLAMB, A.H. Bis(glutathionyl)spermidine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27612-27619, 2003.

BARKER, R.H.; LIU, H.; HIRTH, B.; CELATKA, C.A.; FITZPATRICK, R.; XIANG, Y.; WILLERT, E.K.; PHILLIPS, M.A.; KAISER, M.; BACCHI, C.J. RODRIGUEZ, A.; YARLETT, N.; KLINGER, D.; SYBERTZ, E. Novel S-adenosylmethionine descarboxylase inhibitors for the treatment of Human African Trypanosomiasis. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2052-2058, 2009.

BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, G.; BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, A.; MUJUMDAR, S.B.; PAL, A.; MAJUMDAR, S. Quassin alters the immunological patterns of murine macrophages through generation of nitric oxide to exert antileishmanial activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 317–324, 2009.

BENAIM, G.; SANDERS, J.M.; MARCHÁN-GARCIA, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A.R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J.M.; LEON-ROSSELL, A.; CONCEPCION, J.L.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts

synergistically with posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.892-899, 2006.

BERMAN, J.D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania Mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 197-201, 1987.

BIRKHOLTZ, L.M.; WILLIAMS, M.; NIEMAND, J.; LOUW, A.I.; PERSSON, L.; HEBY, O. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochem. J.**, v. 438, p. 229-244, 2011.

BOITZ, J.M.; YATES, P.A.; KLINE, C.; GAUR, U.; WILSON, M.E.; ULLMAN, B.; ROBERTS, S.C. *Leishmania donovani* ornithine decarboxylase is indispensable for parasite survival in the mammalian host. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 756-763, 2009.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (eds.), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.379-388.

BUCKNER, F.S. and NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Curr. Opin. Infect Dis.** v. 23, p. 609-616, 2010.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 44, p 29-37, 2002.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 56, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, M.R.; VALENÇA, H.F.; SILVA, F.J.; PEREIRA, D.P.; PEREIRA, T.A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative

vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, p. 108-110, 2010.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S. ; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, p. 873–882, 2007.

CHARZOTTE, B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. **Cold Spring Harb. Protoc.**, v. 7, p. 892-894, 2011.

COHEN, J; DIBNER, M.S.; PRADO, A.P. Development of and access to products for neglected diseases. **PLoS One**, v.12, p. e10610, 2010.

COIMBRA, E.S.; DE ALMEIDA, M.V.; JUNIOR, C.O.;TAVEIRA, A.F.;DA COSTA, C.F.; DE ALMEIDA, A.C.; REIS, E.F.; DA SILVA, A.D. Synthesis and antileishmanial activity of lipidic amino alcohols. **Chem Biol Drug Des.**, v. 75, n. 2, p. 233-235, 2010.

COLLA-JACQUES, F.E.; CASANOVA, C.; PRADO, A.P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 208-215, March 2010.

CÔRTEZ, L.M.C.; SILVA, R.M.M.; PEREIRA, A.S.; GUERRA, C.; ZAPATA, A.C.; BELLO, F.J.; FINKELSTEIN, L.C.; MADEIRA, M.F.; BRAZIL, R.P.; CÔRTE-REAL, S.; ALVES, C.A. Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. **Parasites & Vectors**, v. 216, n. 4, p. 1-5, 2011.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Rev. Saúde públ.**, v. 24, p 361-72,1990.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R.; Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.

CRUZ, A.K.; TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M.C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; UTHAIPIBULL, C. Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.*: A Review. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 178-192, 2009.

CUNNINGHAM, A.C. Parasite adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA COSTA, C.F.; COIMBRA, E.S.; BRAGA, F.G.; REIS, R.C.N.; DA SILVA, A.D. e DE ALMEIDA, M.V. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 40-42, 2009.

DA SILVA, D.G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania spp.* e análise da atividade leishmanicida de chalconas. Florianópolis, 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – PPGB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **British Medical Journal**, v. 326, p. 377-382, 2003.

DEL OLMO, E.; ALVES, M.; LOPES, J.L.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G. et al. Leishmanicidal Activity of Some Aliphatic Diamines and Amino-Alcohols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 659–662, 2002.

DEL OLMO, E.; DIAZ-GONZÁLEZ, R.; ESCARCENA, R.; CARVALHO, L.; BUSTOS, L.A.; NAVARRO, M.; FELICIANO, A.S. Diamine and aminoalcohol derivatives active against *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 440-443, 2012.

DEMICHELI, C; FRÉZARD, F; LECOUEVEY, M AND GARNIER-SUILLEROT, A, Antimony (V) complex formation with adenine

nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1570, p. 192-198, 2002.

DIAS, C.P.D.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p.193-196, 2008.

DIAS, C.P.D. Os primórdios do controle da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, supl. 2, p. 12-18, 2011.

DO VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. **An Bras Dermatol.**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

EGER, I. Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo*. Florianópolis, 2010. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – PPGB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

FAIRLAMB, A.H; LE QUESNE, S.A. Polyamine metabolism in trypanosomes. In: HIDE, G et al. (Eds). Trypanosomiasis and leishmaniasis. Biology and control. Walingford, UK: CAB International, 1997, p. 149-161.

FERNANDES, C.D.; TIECHER, F.M.; BALBINOT, M.M.; LIARTE, D.B.; SCHOLL, D.; STEINDEL, M. ROMANHA, A.J. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 27-32, February 2009.

FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; URBINA, J.A.; ROMANHA, A.J. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 1359-1364, 2007.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.F; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin

Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **Public Library of Science**, v. 6, n. 2, 2011.

FREARSON, J. A.; WYATT, P.G.; GILBERT, I.H.; FAIRLAMB, A.H. Target assessment for antiparasitic drug discovery. **Trends Parasitol.**, 23(12), 589-95, 2007.

GIORDANI, B; ALMEIDA; M.V.; FERNANDES, E.; COSTA, C.F.; DE CARLI, G.; TASCA, T.; ZUANAZZI, J.A.S. Anti-Trichomonas vaginalis activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 613-617, 2009.

GIRAULT, S.; DAVIOUD-CHARVET, T.E.; MAES, L.; DUBREMETZ, J.F.; DEBREU, M.A.; LANDRY, V.; SERGUERAERT, C. Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies. **Bioorg Med Chem.**, v. 9, n. 4, p. 837-846, 2001.

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

GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: Current status, challenger and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; REVEIZ, L.; RENGIFO-PARDO, M.; TWEED, J.; MACAYA, A.; ALVAR, J. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 4, p. 409-419, 2010.

GOTO, H. and LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRIEWANK, K.; GAZEAU, C.; EICHHORN, A. and STEBUT, E. Miltefosine Efficiently Eliminates *Leishmania major* Amastigotes from Infected Murine Dendritic Cells without Altering Their Immune

Functions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54(2), p. 652–659, 2010.

GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin. Chim. Acta**, v. 344, p. 23-35, 2004.

GURU, P.Y.; AGRAWI, A.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin-bearing liposomes as drug vehicles. **Federation of European Biochemical Societies**, n. 1, v. 2, p. 204-208, 1989.

HAMILTON, C.J.; SARAVANAMUTHU, A.; EGGLESTON, I.M.; FAIRLAMB, A.H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **The Biochemical Journal**, v.369, p.529-537, 2003.

HASNE, M.P.; COPPENS, I.; SOYSA, R.; ULLMAN, B.A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Microbiol.**, v. 76, n. 1, p. 78–91, 2010.

HEBY, O.; ROBERTS, S.C.; ULLMAN, B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, part 2, p. 415-419, 2003.

HIGASHI, K.; YOSHIDA, K.; NISHIMURA, K.; MOMIYAMA, E.; KASHIWAGI, K.; MATSUFUJI, S.; SHIRAHATA, A.; IGARASHI, K. Structural and functional relationship among diamines in terms of inhibition of cell growth. **J. Biochem.**, v. 136, p. 533-539, 2004.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. **Neglected Tropical Diseases**, v.2, p. 1-11, 2008.

HUANG, Y; PLEDGIE, A.; CASERO, R.A.; DAVISON JR, N.E. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells. **Anticancer Drugs**. v. 3, p. 229-241, 2005.

JOHSON, L.V.; WALSH, M.L.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, p. 990-994, 1980.

KAPOOR, P.; SACHDEV, M.; MADHUBALA, R. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 6, p. 438-442, 2000.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **Journal of Global Infect Disease**, v. 2, n. 2, p. 177-185, 2010.

KETTER, H.; MARJANOVIC, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 171-176, 2004.

KHAN, M.O.F. Trypanothione Reductase: A Viable Chemotherapeutic Target for Antitrypanosomal and Antileishmanial Drug Design. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 129-146, 2007.

KOOPMAN, W.J.H.; VISCH, H.J.; SMEITINK, J.A.M.; WILLEMS, P.H.G.M. Simultaneous Quantitative Measurement and Automated Analysis of Mitochondrial Morphology, Mass, Potential, and Motility in Living Human Skin Fibroblasts. **International Society for Analytical - Cytology Cytometry**, v. 69A, p. 1-12, 2005.

KROEMER, G., et al., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee. **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LABADIE, G.R.; CHOI, S.R. and AVERY, M.A. Diamine derivatives with antiparasitic activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 615-619, 2004.

LAISON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazonense de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-18, 2010.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SINGH, N.; SAMANT, M.; DUBE, A. In vitro and In vivo leishmanicidal activity of Dysoxylum

binectariferum and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, n.14, p. 36-42, 2007.

LINDOSO, J.A.L. & LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

MACEDO-SILVA, S.T.; SILVA, T.L.A.O.; URBINA, J.A.; SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-12, 2011.

MALTEZOU, H.C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-8, 2010.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI-JR, A.; MORILLO, C.A.; AVEZUM, A.; CONNOLLY, S.J.; , SOSA-ESTANI, S.; ROSAS F.; YUSUF, S. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) **American Heart Journal**, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARZOCHI, M.C.A; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M.V.; SOUZA, M.B.; MADEIRA, M.F.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, A.O. and MARZOCH, K.B.F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 570-580, 2009.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p.601-620, 2007.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A.V.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SOARES, M.J.; DE CASTRO, S.L. Effect of a b-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1034–1041, 2005.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; CORRÊA, J.R.; PINTO, A.V.; SOARES, M.J.; CASTRO, S.L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. **Parasitol. Res.**, v. 101, p. 895–905, 2007.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E. de; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as tradicional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 165 – 170, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, supl. III, p. 1-29, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2^a edição. Brasília-DF, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:

[HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454) acesso em: 20/01/12.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G. and WINK, D.A.A. Rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90. 2009.

MOLINA, J.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; URBINA, J.A. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p.137-140, 2000.

MOORE, E.M. and LOCKWOOD, D.N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, p. 151-158, 2010.

MORENO, S.N.J.; MASON, R.P.; DO CAMPO, R. Reduction of Nifurtimox and Nitrofurantoin to Free Radical Metabolites by Rat Liver

Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 10, p. 6298-6303, 1984.

MURRAY, H.W. Suppression of Posttreatment Recurrence of Experimental Visceral Leishmaniasis in T-Cell-Deficient Mice by Oral Miltefosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3235-3236, 2000.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NISHMURA, K.; YANASE, T.; ARAKI, N.; OHNISHI, Y.; KOZAKI, S.; SHIMA, K.; ASAKURA, M.; SAMOSOMSUK, W.; YAMASAKI, S. Effects of polyamines on two strains of *Trypanosoma brucei* in infected rats and in vitro culture. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 211-217, 2006.

NUNES, R.K. Clonagem e expressão da enzima tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* e atividade leishmanicida de chalconas. Florianópolis, 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – PPGB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

OPS: **Organización Panamericana de La Salud**. Estimación cuantitativa de La enfermedad de Chagas em lãs Américas. (OPS/HDM/CD/425-06), 2006.

OSTERMAYER, A.L.; PASSOS, A.D.C.; SILVEIRA, A.C.; FERREIRA, A.W.; MACEDO, V.; PRATA, A.R. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, supl. 2, p. 108-121, 2011.

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

PAAPE, D.; LIPPUNER, C.; SCHMID, M.; ACKERMANN, R.; BARRIOS-LLERENA, M.E.; ZIMNY-ARNDT, U.; BRINKMANN, V.; ARNDT, B.; PLEISSNER, K.P.; JUNGBLUT, P.R.; AEBISCHER, T. Transgenic, Fluorescent *Leishmania Mexicana* Allow Direct Analysis

of the Proteome of Intracellular Amastigotes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 1688–1701, 2008.

PINHEIRO, A.C.; ROCHAB, M.N.; NOGUEIRA, P.M.; NOGUEIRA, T.C.M.; JASMINA, L.F.; SOUZA, M.V.N.; SOARES, R.P. Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-t-butylloxycarbonyl-protected diamines. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 273–278, 2011.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.92-100, 2001.

RAMOS, H.; VALDIVIESO, E.; GAMARGO, M; DAGGER, F; COHEN, B.E. Amphotericin B kills unicellular Leishmania by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. **J Membr Biol**, v. 152, p. 65-75, 1996.

RANGEL, E.F. & LAINSON, R. Proven and puntative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RASSI JÚNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REBOLLO, O.; DEL OLMO, E.; RUIZ, G.; LÓPEZ-PÉREZ, A.G.; FELICIANO, A.S. Leishmanicidal and trypanocidal activities of 2-aminocyclohexanol and 1,2-cyclohexanediamine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 184-187, 2008.

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

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. ; et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, p. 581–596, 2007.

REZENDE-JUNIOR, C.O.; ALVES, R.O.; REZENDE, C.A.M.; DA COSTA, C.F.; SILVA, H.; HYARIC, M.L.; FONTES, A.P.S.; ALVES, R.J.; ROMANHA, A.J.; DE ALMEIDA, M.V. Trypanocidal activity of lipophilic diamines and amino alcohols. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 624-626, 2010.

ROMANHA, A.J.; CASTRO, S.L.; SOEIRO, M.N.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J.E.; BUSTAMANTE, J.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; ROMERO, L.I.; BAHIA, M.T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S.G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z.A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.233-238, 2010.

SAHA, S.; MONDAL, S.; RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; MODAK, D.; et al. IL-10- and TGF- α -Mediated Susceptibility in Kala-azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis: The Significance of Amphotericin B in the Control of *Leishmania donovani* Infection in India. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 5592-5603, 2007.

SANTA-RITA, R.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; CASTRO, S. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 704–710, 2004.

SERENO, D; HOLZMULLER, P; LEMESTRE, J.L, Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*.**Acta Tropica**, v. 74, p. 25-31, 2000.

SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.813-823, 1995.

SILVA, E.O.R.; RODRIGUES, V.L.C.C.; SILVA, R.A.; WANDERLEY, D.M.V. Programa de controle da doença de Chagas no

Estado de São Paulo, Brasil: o controle e a vigilância da transmissão vetorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, supl. 2, p. 74-84, 2011.

SINHA, P.K.; JHA, T.; THAKUR, C.P.; NATH, D.; MUKHERJEE, S.; ADITYA, A.K.; SUNDAR, S. Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

SMITH, V.C.; CLEGHORN, L.A.T.; WOODLAND, A.; SPINKS, D.; HALLYBURTON, I.; COLLIE, I.T.; YI MOK, N.; NORVAL, S.; BRENK, R.; FAIRLAMB, A.H.; FREARSON, J.A.; READ, K.D.; GILBERT, I.H.; WYATT, P.G. Optimisation of the Anti-Trypanosoma brucei Activity of the Opioid Agonist U50488. **ChemMedChem**, v. 6, p. 1832 – 1840, 2011.

SOARES, C.O.; ALVES, M.J.M.; BECHARA, E.J.H. 1,4-Diamino-2-butanone, a wide-spectrum microbicide, yields reactive species by metal-catalyzed oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 1760-1770, 2011.

SOUZA, H.M.; SILVA, M.M.F. O controle da transmissão transfusional. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, supl. 2, p. 64-67, 2011

SPIGELMAN, M.K. New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 28-34, 2007.

STEINDEL, M., PACHECO, L.K., SCHOLL, D., SOARES, M., MORAES, M.H., EGER, I., KOSMANN, C., SINCERO, T.C.M., STOCO, P.H., MURTA, S.M.F., CARVALHO PINTO, C.J, GRISARD, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25–32, 2008.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Méd.**, v. 347, p. 1739-46, 2002.

SUNDAR, S; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect Dis.**, v. 15, p. 593-598, 2002.

TARLETON, R.L.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.E. The challenges of Chagas disease – grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v. 4, p. 1852-1857, 2007.

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

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgrad. Med. J.**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TOMA, H.K. 1994. **Interação *in vitro* de cepas de *Trypanosoma cruzi* de parasitemia alta em subpatente *in vivo* com diferentes linhagens celulares.** Dissertação de Mestrado do Programa de Parasitologia, UFMG, Belo Horizonte.

TOORIE, L.S.; WYLLIE, S.; SPINKS, D.; OZA, S.L.; THOMPSON, S.; HARRISON, J.R.; GILBERT, I.H.; WYATT, P.G.; FAIRLAMB, A.H.; FREARSON, J.A. Chemical Validation of Trypanothione Synthetase. A potential drug target for human trypanosomiasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 52, 2009.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v.359, n.9324, p.2188-2194, 2002.

URBINA, J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, Suppl. I, p. 311-318, 2009.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p. 495-501, 2003.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A.J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 27-38, 2003.

VAIDIAN, A.K.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.3, n. 2, 2004.

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

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.A.; ÁLVAREZ, M.G.; LOCOCO, B.E.; PETTI, M.A.; BERTOCCHI, G.L. and ARMENTI, A.H. The Impact of Socioeconomic Conditions on Chronic Chagas Disease Progression. **Rev Esp Cardiol.**, v. 62, n. 11, p.1224-32, 2009.

WERNECK, G.L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-45, 2010.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 2006. Neglected tropical disease, hidden successes emerging opportunities. Geneva: WHO, 41p.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, 2010. Control of the Leishmaniasis. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 186p.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J.**, v. 325, p. 289-297, 1997.

WILSON, W.D.; TANIUSA, F.A.; MATHIS, A.; TEVISA, D.; EDWIN, J. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie.**, v. 90, n. 7, p. 999-1014, 2008.

YADON, Z.E.; SCHMUNIS, G.A. Congenital Chagas Disease: Estimating the Potential Risk in the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 6, p. 927-933, 2009.

YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.C.; KOIRALA, S.; RIJAL, S.; MIRANDA, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from

Peru and Nepal to miltefosine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 2, p. 272-275, 2005.

XIAO, S.H.; HUI-MING, W.; TANNER, M.; UTZINGER, J.; CHONG, W. Tribendimidine: a promising, safe and broad-spectrum anthelmintic agent from China. **Acta Trop.**, v. 94, n. 1, p. 1-14, 2005.

ZHANG, S.; KIM, C.C.; BATRA, S.; MCKEROW, J.H.; LOKE, P. Delineation of Diverse Macrophage Activation Programs in Response to Intracellular Parasites and Cytokines. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-21, 2010.

ZULANTAY, I.; BAGÁN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L.C.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA, J.L.; APT, W. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. **Parasitol. Latinoam.**, n. 59, p. 93-98, 2004.

APÊNDICE 1

Diaminas: Nomenclaturas e estruturas químicas

Código	Nomenclatura (IUPAC)	Estruturas químicas
DP22	<i>N</i> -decil-1,4- butanodiamina	
DP22Cl	<i>N</i> -decil-1,4- butanodiamina cloridrato	.2HCl
DP23	<i>N</i> -tetradecil-1,4- butanodiamina	
DP23Cl	<i>N</i> -tetradecil-1,4- butanodiamina cloridrato	.2HCl
DP24	<i>N</i> -decil-1,6- hexanodiamina	
DP24Cl	<i>N</i> -decil-1,6- hexanodiamina cloridrato	.2HCl
DP25	<i>N</i> -tetradecil-1,6- hexanodiamina	
DP25Cl	<i>N</i> -tetradecil-1,6- hexanodiamina cloridrato	.2HCl

Código	Nomenclatura (IUPAC)	Estructuras químicas
DP28	<i>N</i> -hexadecil-1,6-hexanodiamina	
DP28Cl	<i>N</i> -hexadecil-1,6-hexanodiamina cloridrato	
CR40	<i>N</i> -dodecil-1,6-hexanodiamina	
CR40Cl	<i>N</i> -dodecil-1,6-hexanodiamina cloridrato	
GUT1c	<i>N,N'</i> -di-dodecil-etanodiamina	
RAG05	<i>N,N'</i> -di-dodecil-1,4-butanodiamina	
RAG08	<i>N,N'</i> -di-hexadecil-1,4-butanodiamina	
RAG10	<i>N</i> -hexadecil-1,4-butanodiamina	
RAG11	<i>N</i> -dodecil-1,4-butanodiamina	