

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	8
Lista de Figuras	11
Lista de Quadros	13
Lista de Gráficos	14
Resumo	19
Abstract	200
1. Introdução	21
2. Fundamentação Teórica	23
2.1. <i>Leishmania</i>	233
2.2. Apresentação clínica e eco-epidemiológica das leishmanioses	244
➤ Leishmaniose tegumentar (LT)	266
➤ Leishmaniose visceral (LV)	288
2.3. Tratamento	311
2.3.1. Mecanismo de ação dos antimoniais	322
2.3.2. Farmacocinética dos antimoniais pentavalentes	344
2.3.3. Limitações no tratamento das leishmanioses	344
2.3.4. Novas expectativas no tratamento das leishmanioses	366
2.4. Metabolismo de purinas em <i>Leishmania</i> e mamíferos	388
2.5. Complexos Sb ^v - ribonucleosídeos	488
3. Justificativa	50
4. Objetivo Geral	52
4.1. Objetivos Específicos	52
5. Material e Métodos	53
5.1. Parasitos	533
5.2. Animais	533
5.3. Compostos químicos	533
➤ Estrutura química dos complexos	555
5.4. Ensaio <i>in vitro</i>	566
5.4.1. Cultivo e manutenção das formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	566
5.4.2. Curva de crescimento dos parasitos	566
5.4.3. Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos murinos (MTT)	577
• Coleta e preparo dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	57
• Ensaio de citotoxicidade	588
5.4.4. Concentração citotóxica <i>in vitro</i> (MTT)	59
5.4.5. Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre formas promastigotas (MTT)	59
5.4.6. Determinação de Sb ^v intracelular em macrófagos murinos	600
5.4.7. Ensaio de toxicidade dos compostos sobre formas amastigotas	611
• Infecção de macrófagos com promastigotas	622
• Infecção de macrófagos com amastigotas de tecidos de animais experimentalmente infectados	62
2	
• Exposição dos macrófagos infectados com promastigotas e amastigotas aos complexos contendo antimônio pentavalente	633
5.4.8. Índice citotóxico <i>in vitro</i>	644
5.4.9. Índice terapêutico <i>in vitro</i>	644
6. Análise Estatística	65

7. Resultados	66
7.1. Curva de Crescimento das promastigotas de <i>L. chagasi</i> (BH400)	666
7.2. Ensaio de citotoxicidade (MTT) dos compostos antimoniais em promastigotas	677
7.2.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT) dos compostos antimoniais e ligantes em macrófagos	688
7.3. Incorporação de Sb ^v em macrófagos	733
7.4. Padronização dos experimentos de infecção de macrófagos com promastigotas e amastigotas de <i>L. chagasi</i>	744
7.4.1. Ação anti-amastigota dos complexos Sb ^v -ribonucleosídeos em macrófagos infectados com promastigotas de <i>L. chagasi</i>	866
7.4.2. Ação anti-amastigota dos complexos Sb ^v -ribonucleosídeos em macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. chagasi</i>	889
8. Discussão	96
9. Conclusão	109
10. Perspectivas	110
11. Referências Bibliográficas	114
12. Anexo	122
Publicação oriunda do presente trabalho	122

Lista de Abreviaturas

A1, A2A, A2B e A3- Receptores para adenosina
ACR- Enzima Arsenato Redutase
AdK- Enzima Adenosina Cinase
AM- Antimoniato de Meglumina
ATP- Adenosina Trifosfato
cAMP- Adenosina Monofosfato Cíclico
CEBIO/UFMG- Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
cGMP- Guanosina Monofosfato Cíclico
Clb- CNT insensível a NBMPR amplamente seletivo
Clf – CNT insensível a NBMPR seletivo para formicina B
Clt- CNT insensível a NBMPR seletivo para citidina
CNT´s- Transportadores concentrativos de nucleosídeos
DMSO- Dimetilsulfóxido
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
DP- Desvio padrão
ei - ENT´s insensíveis a NBMPR
ENT´s- Transportadores equilibrativos de nucleosídeos
es- ENT´s sensíveis a NBMPR
ESI- Eletrodispersão
FDA- Food and Drug Administration
Glu- Glucantime
hENT´s- Transportadores equilibrativos de nucleosídeos de células humanas
HGPRtase- Enzima Hipoxantina Guanina fosforribosiltransferase
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humano
ICB/UFMG- Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ICEX/UFMG- Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais
IL- Interleucina
IMP- Inosina Monofosfato
INF γ - Interferon gama
IT- Índice Terapêutico
KSb(OH) $_6$ - Hexahidróxido antimoniato de potássio ou antimoniato

LCD –Leishmaniose Cutânea Difusa
LCDs –Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL- Leishmaniose Cutânea Localizada
LdNT- Transportador de nucleosídeos em *Leishmania donovani*
LMC –Leishmaniose Mucocutânea
LT- Leishmaniose Tegumentar
LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
LVC –Leishmaniose Visceral Canina
MTT- Reagente brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium
N1 a N5- Subtipos de CNT's
NBMPR- Nitrobenzilmercaptopurina
Ng- Nanograma
NNN- Meio de cultura sólido Novy, McNeal e Nicolle
NT- Transportador de Nucleosídeos
OMS- Organização Mundial de Saúde
PRTase- Enzima fosforribosiltransferase
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
RNA- Ácido Ribonucléico
RPMI 1640- Roswell Park Memorial Institute medium 1640
Sb^{III}- Antimônio Trivalente
Sb^V- Antimônio Pentavalente
Sb^V-A- Complexo de antimônio pentavalente conjugado a adenosina
Sb^V-C- Complexo de antimônio pentavalente conjugado a citidina
Sb^V-G- Complexo de antimônio pentavalente conjugado a guanosina
Sb^V-U- Complexo de antimônio pentavalente conjugado a uridina
SbK- Hexahidróxido de antimoniato de potássio ou antimoniato
Sb:Rb- Complexo de antimônio pentavalente conjugado a ribonucleosídeo
SBF- Soro Fetal Bovino
SFM- Sistema fagocítico Mononuclear
SINAN- Sistema de Informação de Agravos e Notificações
TDR1 – Enzima Redutase Tiol Dependente
TDR- Treinamento em Doenças Tropicais
Th1 e Th2- Linfócitos T helper 1 e Linfócitos T helper 2

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa

WHO- World Health Organization

XPRTase- Enzima Xantina fosforribosiltransferase

α MEM- Meio de cultura (Minimum Essential Médium)

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania sp.* – Modificado de: http://www.parasitoliga.com/images/protozoarios/4_Leishmaniose__Ciclo_evolutivo.jpg. Acesso em: 01 fev.2009 _____ 24

Figura 2. Distribuição das áreas endêmicas para Leishmanioses no mundo (OMS, 2007) _____ 25

Figura 3. Dois modelos propostos por Demicheli e Frezard, para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. O modelo (1) envolve a redução de Sb^V a Sb^{III} pelos tióis; o modelo (2) envolve a formação de complexo Sb^V -ribonucleosídeo (Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n.6, jul, 2005). Desenho de autoria de Iara Caixeta Marques da Rocha (não publicado) _____ 33

Figura 4. Estrutura dos nucleosídeos (pentose, base nitrogenada) e nucleotídeos (pentose, base nitrogenada e fosfato). Disponível em: < <http://profs.ccems.pt/OlgaFranco/10ano/biomoleculas.htm> > Acesso em: 02 dec. 2009 _____ 38

Figura 5. Bases purínicas e pirimidínicas dos nucleotídeos e nucleosídeos. Disponível em: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/images/biomoleculas/purinas.gif> Acesso em 30 de Nov. 2009 _____ 39

Figura 6. Representação das reações enzimáticas da via de salvação em *Leishmania*. As linhas pontilhadas indicam reações ausentes ou não estabelecidas (Modificado de KOUNI, 2003) _____ 41

Figura 7. Captação de purinas por transportadores e esquema simplificado da via de salvação de purinas em promastigotas de *Leishmania*. A estrutura oval representa a superfície da membrana celular do parasito. Os quatro transportadores identificados em *Leishmania donovani* e *Leishmania major* estão indicados como NT1, NT2, NT3 e NT4, com seus respectivos substratos indicados entre parênteses (Ado: adenosina, Pyr: pirimidinas, Ino: inosina, Guo: guanosina; Hyp: hipoxantina; Xan: xantina; Ade: adenina; Gua: guanina). (Modificado de Landfear, 2004) _____ 43

Figura 8. Estrutura química dos complexos Sb^V -ribonucleosídeo caracterizados pelo grupo de Demicheli *et al* (2006) Sb^V -G, Sb^V -A, Sb^V -C e Sb^V -U) ligantes dos complexos Sb^V -ribonucleosídeo (guanosina, adenosina, citidina e uridina) e drogas de referência (SbK, glucantime e AM) utilizadas no presente trabalho _____ 56

Figura 9- A. Controle de macrófagos infectados com promastigotas de *L.chagasi* (aumento de 40X). **B-** (aumento de 100X). **C-** Ação anti-amastigota de SbK na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **D-** (aumento de 100X). **E-** Ação anti-amastigota de Sb^V -G na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **F-** (aumento de 100X) _____ 94

Figura 10- **A.** Controle de macrófagos infectados com amastigotas de *L.chagasi* (aumento de 40X). **B-** (aumento de 100X). **C-** Ação anti-amastigota de SbK na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **D-** (aumento de 100X). **E-** Ação anti-amastigota de Sb^V-G na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **F-** (aumento de 100X)_____ 95

Figura 11. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes proposto por Demicheli e cols (2005): formação de complexo Sb^V-ribonucleosídeo. Desenho de autoria de Rubens Lima do Monte Neto, em Ferreira *et al*, 2010_____ 102

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Relação simplificada entre *Leishmania* e as principais formas clínicas no homem _____ 26
- Quadro 2.** Comparação da especificidade de substrato entre humanos e *Leishmania donovani* _____ 45
- Quadro 3.** Porcentagem de Sb^V na estrutura de cada um dos compostos Sb^V-ribonucleosídeo, concentração dos compostos em µg de Sb^V/mL utilizada nos ensaios de citotoxicidade e concentração correspondente dos ligantes de cada composto _____ 70
- Quadro 4.** Porcentagem de Sb^V na estrutura de cada um dos compostos Sb^V-ribonucleosídeo, concentração dos compostos em µg de Sb^V/mL utilizada nos ensaios de atividade anti-amastigota e concentração correspondente dos ligantes de cada composto _____ 76
- Quadro 5.** Índice Citotóxico para 50% dos macrófagos (CC₅₀ obtido no ensaio MTT), Índice Citotóxico para 50% das amastigotas (IC₅₀ obtido no ensaio de atividade anti-amastigota em macrófagos infectados com promastigotas) e Índice Terapêutico (obtido pela razão CC₅₀ / IC₅₀), para os compostos Sb^V-purínicos em comparação com o SbK livre. Os valores de CC₅₀ e IC₅₀ foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o Software Sigma Plot[®] 10.0 _____ 88
- Quadro 6.** Índice Citotóxico para 50% dos macrófagos (CC₅₀ obtido no ensaio MTT), Índice Citotóxico para 50% das amastigotas (IC₅₀ obtido no ensaio de atividade anti-amastigota em macrófagos infectados com amastigotas) e Índice Terapêutico (obtido pela razão CC₅₀ / IC₅₀), para os compostos Sb^V-purínicos em comparação com o SbK livre. Os valores de CC₅₀ e IC₅₀ foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o Software Sigma Plot[®] 10.0 _____ 91
- Quadro 7.** Prováveis mecanismo de ação de Sb^V-G _____ 108

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L.chagasi* a 25°C±1, em α -MEM completo com 10%SFB. Símbolos em barras representam a média \pm DP de dois experimentos separados feitos em duplicata _____ 66

Gráfico.2-A. Ação dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência sobre formas promastigotas de *L.chagasi* nas concentrações de 10, 30, 60 e 100 μ g de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 48 horas. **B-** no tempo de exposição de 72 horas. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Astériscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os compostos em relação ao controle, que é considerado como 100% de promastigotas vivas (p<0,05)_____ 67

Gráfico.3-A. Ensaios de citotoxicidade (MTT) dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos sobre macrófagos murinos, nas concentrações de 10, 30, 60 e 100 μ g de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 24 horas. **B-** no tempo de exposição de 48 horas e **C-** no tempo de exposição e 72 horas. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas da citotoxicidade entre os compostos em relação ao controle, que é considerado como 100% de macrófagos viáveis. Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G é mais tóxico que todos os demais compostos do grupo (p<0,05)_____ 69

Gráfico.3.1- A. Citotoxicidade (MTT) dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos sobre macrófagos murinos, nas concentrações referentes a 10, 30, 60 e 100 μ g de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 24 horas. **B-** No tempo de exposição de 48 horas. **C-** No tempo de exposição de 72 horas. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas da citotoxicidade dos ligantes com relação ao controle, que é considerado como 100% de macrófagos viáveis / Símbolos em vermelho # indicam que a citotoxicidade de SbK é estatisticamente maior que a da Guanosina (p<0,05)_____ 72

Gráfico 4. Ensaio representativo da incorporação de Sb^V em macrófagos expostos por 72 horas a 10 μ g/mL de Sb^V calculado para cada um dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, em comparação com o controle sem Sb^V, antimoniato livre(SbK) e Glucantime. As barras representam a média \pm DP de um experimento feito em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na incorporação de Sb^V entre o compostos o Sb^VG e o controle. Símbolo em vermelho § indica diferenças estatisticamente significativas entre a incorporação do Sb^VG e a dos demais complexos Sb^V-ribonucleotídeos, SbK e Glucantime (p<0,001)_____ 73

Gráfico 5-A. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μ g de Sb/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três

feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05)_____ 78

Gráfico 5.1-A. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30 Sb^V/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção_____ 79

Gráfico 5-B. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05)_____ 79

Gráfico 5.1-B. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção_____ 80

Gráfico 5-C. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,001)_____ 80

Gráfico 5.1-C. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade de SbK com relação ao controle. Símbolos em vermelho § indicam que SbK possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os ligantes do grupo_____ 81

Gráfico 6-A. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05) _____ 83

Gráfico 6.1-A. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção _____ 83

Gráfico 6-B. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05) _____ 84

Gráfico 6.1-B. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5 a 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção _____ 84

Gráfico 6-C. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05) _____ 85

Gráfico 6.1-C. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na atividade de SbK com relação ao controle. Símbolos em vermelho § indicam que SbK

possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os ligantes do grupo _____ 85

Gráfico 7. Porcentagem de macrófagos infectados nos ensaios de infecção com promastigotas e com amastigotas. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. O símbolo vermelho # indica que amastigotas são estatisticamente mais internalizadas por macrófagos que promastigotas ($p < 0,05$) _____ 86

Gráfico 8- A. Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V -pirimidínicos. **B.** Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V -purínicos nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Observar a curva dose resposta dos compostos Sb^V -pirimidínicos no gráfico 7A e Sb^V -purínicos no gráfico 7B em comparação com o SbK livre _____ 87

Gráfico 9. Ação anti-amastigota de Sb^V -G nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V -G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todas as drogas de referência do grupo ($p < 0,05$). **Tóxico:** indica que o Sb^V -G é tóxico para macrófagos na concentração de 30 μg de Sb^V/mL de acordo com o ensaio de citotoxicidade MTT _____ 88

Gráfico 10. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos na concentração de 10 μg de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V -G possui ação anti-amastigota maior que a de todos os demais compostos ($p < 0,05$) _____ 89

Gráfico 11- A. Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V -pirimidínicos. **B.** Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V -purínicos nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Observar a curva dose resposta dos compostos Sb^V -pirimidínicos no gráfico 10A e Sb^V -purínicos no gráfico 10B, em comparação com o SbK livre _____ 90

Gráfico 12. Ação anti-amastigota de Sb^V -G nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é

representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteríscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todas as drogas de referência do grupo ($p < 0,05$). **Tóxico:** indica que o Sb^V-G é tóxico para macrófagos na concentração de 30 μ g de Sb^V/mL de acordo com o ensaio de citotoxicidade MTT _____ 91

Gráfico 13. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos na concentração de 10 μ g de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteríscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V-G possui ação anti-amastigota maior que a de todos os demais compostos ($p < 0,05$) _____ 92

Gráfico 14. Ação anti-amastigota de Sb^V-G em comparação a SbK livre, na infecção de macrófagos com promastigotas e na infecção de macrófagos com amastigotas, nas concentrações de 10 e 20 μ g de Sb/mL no tempo de 72 horas de exposição. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata _____ 93

Resumo

No presente trabalho, foi avaliada a influência das nucleobases (guanina, adenina, citosina e uracila), sobre a atividade biológica “in vitro” dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos.

A complexação do Sb^V a purino-nucleosídeos, em especial a guanosina, influenciou na atividade citotóxica para macrófagos, nos níveis de incorporação de antimônio intracelular e potencializou a atividade anti-*Leishmania* do fármaco antimonial.

Os complexos Sb^V -purínicos estimularam o crescimento de formas promastigotas do parasito e foram mais citotóxicos e eficazes contra *Leishmania chagasi* que os Sb^V -pirimidínicos, que apresentaram atividade equivalente àquela dos medicamentos antimoniais de referência, SbK e antimoniato de meglumina. Dos complexos Sb^V -purínicos, o Sb^V -G foi o mais tóxico e ativo em todos os ensaios, enquanto o Sb^V -A embora tenha apresentado citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania*, essa atividade não foi diferente dos compostos antimoniais de referência. Essas diferenças entre o potencial dos fármacos Sb^V -purínicos Sb^V -G e Sb^V -A, pode ser devida ao fato dos nucleosídeos de guanosina e adenosina, desencadearem diferentes respostas quanto à produção de óxido nítrico em macrófagos segundo a literatura, o que interferiria diretamente na atividade anti-amastigota de cada fármaco.

Os achados de citotoxicidade e atividade *anti-Leishmania*, reforçam o modelo de que a interação do Sb^V com nucleosídeos purínicos pode mediar as ações farmacológicas dos antimoniais pentavalentes, e abrem perspectivas para novos estudos sobre a influência dos nucleosídeos purínicos adenosina e guanosina na resposta imune do macrófago a infecção por *Leishmania chagasi*.

Palavras chave: *Leishmania chagasi*, Sb^V ribonucleosídeos, atividade citotóxica, atividade anti-*Leishmania*

Abstract

In the present work, the influence of the nucleobases (guanine, adenine, cytosine e uracyl) on the “in vitro” biological activities of Sb^V-ribonucleosídeos complexes, has been investigated.

The complexation of Sb^V with purine-nucleosides, especially guanosine, had influence on the cytotoxicity against macrophages, the levels of intracellular antimony incorporation and potentiated the antimonial drug anti-Leishmanial activity.

The Sb^V-purine complexes stimulated promastigotes growth and were more cytotoxic and effective against *Leishmania chagasi* than Sb^V-pyrimidine complexes, which showed activity equivalent to that of reference antimony drugs, Sb₃ and meglumine antimoniate. Among the Sb^V-purine complexes, the Sb^V-G was the most cytotoxic and active in all assays, and although the Sb^V-A has showed both cytotoxicity and anti-*Leishmania* activity, this activity did not differ from that of reference antimonial drugs. These differences between the Sb^V-purine complexes Sb^V-G and Sb^V-A, may be due to the fact that guanosine nucleoside and adenosine nucleoside triggered different responses in nitric oxide production by macrophages according to literature, which interfere directly in the anti-amastigote activity of each drug.

These findings on the cytotoxic and *anti-Leishmania* activity of Sb-ribonucleoside complexes, support the model that the interaction of Sb^V with purine nucleosides may mediate the antileishmanial activity of pentavalente antimonial drugs and opens new perspectives for studies about the influence of purine nucleosides and adenosina and guanosine in the immune response of macrophages infection by *Leishmania chagasi*.

Keywords: *Leishmania chagasi*, Sb^V ribonucleoside, cytotoxicity, anti-*Leishmania* activity

1.INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, classicamente divididas em leishmaniose tegumentar e visceral, causadas por diferentes espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS,1903), transmitidas através da picada de flebotomíneos vetores, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (HERWALDT,1999).

As leishmanioses são enfermidades endêmicas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Velho e do Novo Mundo, sendo dentre as doenças parasitárias causadas por protozoários uma das mais importantes, vindo logo depois da malária. São consideradas doenças negligenciadas e sua importância em saúde pública é evidente, pois segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença é endêmica em 88 países (OMS,2007).

A infecção caracteriza-se pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme, das mucosas ou de órgãos como o fígado, baço, medula óssea e outros órgãos do hospedeiro vertebrado, estando associada à alta morbidade na forma tegumentar e a alta mortalidade na forma visceral.

O tratamento das leishmanioses foi introduzido empiricamente na prática médica pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, com o uso do tártaro emético, um antimônio trivalente (VIANNA, 1912). Ainda hoje o tratamento convencional de ambas as formas tegumentar e visceral, é baseado no uso parenteral de antimônios pentavalentes, que há mais de 60 anos, vieram substituir o antimônio trivalente utilizado por Vianna, como medicamentos de primeira escolha. No Brasil o antimônio de N-metil-glucamina é a droga de escolha utilizada para o tratamento, cuja dosagem foi padronizada pela OMS em 10 a 20mg Sb^v/kg/dia, onde Sb^v significa antimônio pentavalente (BRASIL., 2007; LIMA *et al.*, 2007).

Embora, o tratamento com antimônios pentavalentes, na maioria das vezes, seja indicado e efetivo, as taxas de cura variam de 60 a 100%, e a quimioterapia apresenta algumas desvantagens: alto custo, alta toxicidade, administração unicamente parenteral, levando a efeitos colaterais como

mialgias, artralgias, cefaléias, distrúbios gastrointestinais, alterações eletrocardiográficas, renais, hepáticas, pancreáticas, erupção cutânea, entre outras. A droga é por isso, muitas vezes contra-indicada no tratamento de cardiopatas, nefropatas, pessoas grávidas, idosas (NOGUEIRA e SAMPAIO, 2001; MAYRINK *et al.*, 2006) e recém nascidos. O uso dos medicamentos disponíveis, apresenta várias limitações para o tratamento, como já citado, além de um aumento continuado de cepas resistentes aos antimoniais e mesmo a outros medicamentos (RATH *et al.*, 2003).

Outros fármacos como a Anfotericina B e a Pentamidina são utilizados como medicamentos de segunda escolha, em casos não responsivos aos antimoniais.

Atualmente, inúmeras formulações quimioterápicas para o tratamento das leishmanioses têm sido estudadas nas fases pré-clínica e clínica, mas devido à falta de investimento da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas drogas eficazes contra doenças negligenciadas, de países subdesenvolvidos, nenhum medicamento realmente novo, eficaz e de uso viável, foi lançado no mercado até então, exceto o miltefosine (1-0-hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvido para o tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários (HILGRARD *et al.*, 1993; DEY, 2004). Posteriormente foi utilizado com sucesso no tratamento de Leishmaniose visceral, por iniciativa da OMS, reunindo um laboratório farmacêutico alemão e o Ministério da Saúde da Índia.

De 1400 medicamentos lançados no mercado internacional, apenas 13 são destinados ao tratamento de doenças chamadas tropicais (OMS, 2007). Isto ocorre, em parte, porque o público-alvo desses fármacos são quase sempre populações de países pobres ou em desenvolvimento, de áreas rurais, com baixo poder aquisitivo, com renda que não permite arcar com os custos do tratamento. Portanto, é notória a importância da busca por novos medicamentos que sejam efetivos contra o parasito e menos tóxicos ao paciente.

No presente trabalho, foi avaliado o potencial anti-*Leishmania* “in vitro” de quatro complexos de antimônio pentavalente, conjugados a ribonucleosídeos. A eficácia e toxicidade dos compostos conjugados ao antimônio, foram avaliadas em comparação com o antimônio livre.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Leishmania*

Parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez por Leishman, Donovan e Wright, no ano de 1903, em biópsias viscerais e cutâneas de doentes na Índia (HERWALDT, 1999).

O gênero é constituído por protozoários que possuem um ciclo de vida heteroxeno, sendo encontrados no trato digestório do hospedeiro invertebrado (insetos hematófagos da família Psychodidae da subfamília Phlebotominae), nas formas flageladas denominadas promastigotas e paramastigotas. Essas formas passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, diferenciando no final do ciclo, pelo menos em parte, em promastigotas metacíclicas infectantes. Os vetores são específicos, bem definidos e variações nas moléculas de superfície dos parasitos facilitam o sucesso da infecção no vetor apropriado (SACKS, 1992). Nos hospedeiros vertebrados são encontradas na forma aflagelada denominada amastigota, no interior de células fagocíticas mononucleares, principalmente macrófagos. Como hospedeiros vertebrados estão incluídos grande variedade de mamíferos: roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), canídeos, marsupiais e primatas incluindo o homem. Quando o flebotomíneo infectado com *Leishmania* sp. alimenta-se por telmatofagia do sangue de um mamífero susceptível, inocula junto com sua saliva as formas infectantes promastigotas metacíclicas presentes na probóscide.

Os parasitos que são então fagocitados, primeiramente, por neutrófilos, perdem o flagelo transformando-se em amastigotas, e horas depois são fagocitados por macrófagos, onde são internalizados no fagossoma, que logo se funde com os lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002). No entanto, *Leishmania* está adaptada para sobreviver neste ambiente, pois é capaz de inibir diversos mecanismos de defesa celular que deveriam causar sua lise, e então se multiplicar por divisão binária, até levar a ruptura da célula infectada e liberar

formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos (PETERS, 2008).

A figura 1, representa o ciclo biológico de *Leishmania* sp. nos seus hospedeiros invertebrados e mamíferos:

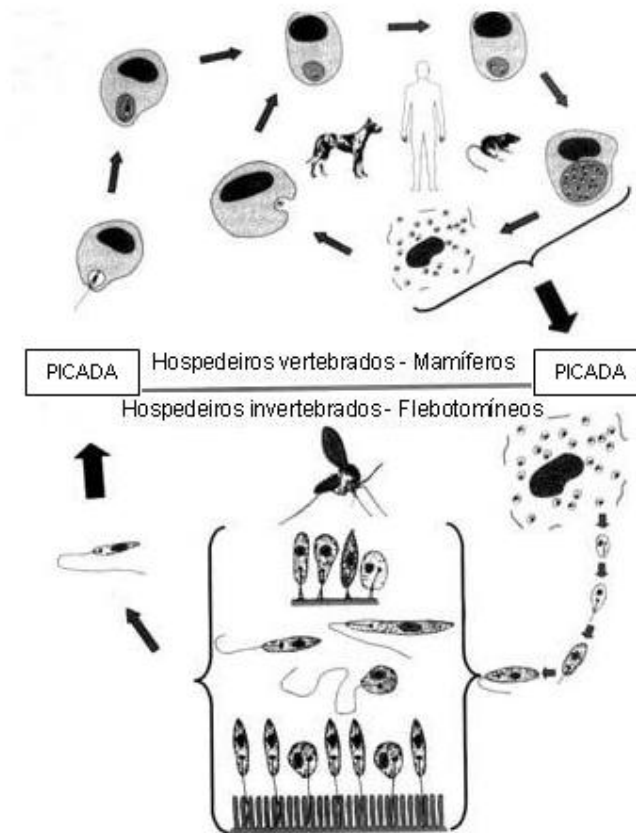


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. – Modificado de: http://www.parasitologia.com/images/protozoarios/4_Leishmaniose__Ciclo_evolutivo.jpg. Acesso em: 01 fev.2009.

2.2. Apresentação clínica e eco-epidemiológica das leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em regiões de climas tropicais e subtropicais do mundo, incluindo países da Europa, Américas, África e Ásia. A doença representa um problema de saúde pública em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 2007).

Anualmente, são reportados 600.000 novos casos de leishmaniose no mundo, no entanto, este valor é provavelmente muito inferior à realidade. Acredita-se que o número real chegue a 2 milhões de novos casos por ano, sendo aproximadamente 1,5 milhões, das formas cutânea e mucocutânea, e

500 mil da forma visceral, com um total de 12 milhões de pessoas infectadas, e uma população de risco de 350 milhões de indivíduos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata a ocorrência de leishmanioses em 88 países (Figura2), com notificação compulsória em apenas 32 países (PISCOPO *et al.*, 2006).

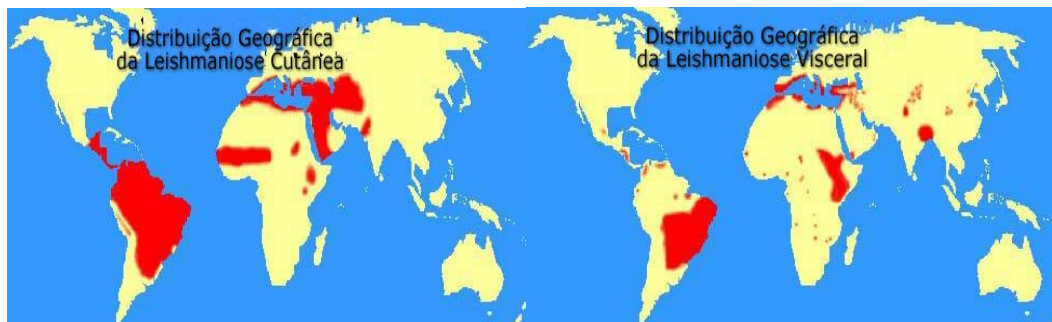


Figura 2. Distribuição das áreas endêmicas para Leishmanioses no mundo (OMS, 2007).

O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR), que tem como foco doenças negligenciadas, que afetam populações pobres e marginalizadas, coloca as leishmanioses como afecções prioritárias entre as endemias abordadas pelo Programa (OMS, 2007).

Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (esse último presente apenas no Novo Mundo), podem infectar o homem, dando lugar a uma ampla variedade de quadros clínicos, de acordo com a espécie e a resposta imune do hospedeiro (*Quadro 1*) (REITHINGER *et al.*, 2007; PISCOPO *et al.*, 2006).

A leishmaniose pode provocar quadros de lesões cutâneas, mucosas, ou viscerais. No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito e pela susceptibilidade e resposta imune do hospedeiro, e pode ser classificada em grupos, de acordo com suas manifestações clínicas (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Forma Clínica	Distribuição geográfica	Subgênero	Espécies
Leishmaniose Tegumentar (LT)	Velho Mundo Novo Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i>
Leishmaniose Tegumentar e Mucocutânea (LT/LMC)	Novo Mundo	<i>Viannia</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis</i> <i>L. (V.) colombiensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) shawi</i> <i>L. (V.) lindenbergi</i>
Leishmaniose Visceral (LV)	Velho Mundo Novo Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (Leishmania) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) chagasi</i>

Quadro 1. Relação simplificada entre *Leishmania* e as principais formas clínicas no homem.

➤ **Leishmaniose tegumentar (LT)**

A Leishmaniose tegumentar (LT), é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de *Leishmania* sp que acometem pele e mucosas. O número de casos no mundo tem aumentado nas últimas décadas, e esse aumento pode ser explicado, em parte, pelas notificações dos casos. São também resultado do controle inadequado de vetores ou reservatórios, o que aumenta a detecção da LT associada a infecções oportunistas. Contudo, pelo fato de algumas infecções serem assintomáticas ou não diagnosticadas, o número global de casos de LT pode estar sendo subestimado.

Os ciclos de transmissão têm se adaptado ao peridomicílio e expandido para áreas não endêmicas, como resultado da urbanização e desflorestamento, sendo os animais domésticos potenciais reservatórios. Adicionalmente, problemas econômicos, desastres naturais, conflitos entre povos e o turismo, causam migrações de populações susceptíveis para áreas endêmicas de LT.

Estas populações tornam-se expostas ao risco de infecção, o que facilmente resulta em epidemias (REITHINGER *et al.*, 2007).

Nas Américas, a Leishmaniose tegumentar, globalmente conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é primariamente, uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2007).

As espécies de *Leishmania* incriminadas como agente etiológico da LTA, são apresentadas no Quadro 1.

A LTA clinicamente, se apresenta sob diferentes formas, que podem ser subdivididas em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada (LCD_s) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Dentre os aspectos clínicos da LTA, destacam-se lesões de pele com úlceras localizadas ou múltiplas, o que representa a forma mais freqüente da doença, tendo como agente etiológico qualquer espécie dos subgêneros que podem causar formas tegumentares no homem, no Novo Mundo. No entanto, a *Leishmania (V.) braziliensis* é considerada como o mais prevalente parasito associado a esta forma de doença. Representa o acometimento primário da pele, sendo a lesão única ou múltipla, geralmente do tipo ulcerado, com tendência à cura espontânea ou apresentando boa resposta ao tratamento.

A LCD é caracterizada por lesões nodulares disseminadas por todo o corpo, ricas em amastigotas (SILVEIRA *et al.*, 2004). Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (BRASIL, 2007).

A LCD_s, também é uma manifestação relativamente rara, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas e até centenas de lesões papulares e de aparência acneiforme, que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com freqüência a face e o tronco.

A LMC, manifesta-se por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (SILVEIRA *et al.*, 2004). Geralmente surge após a cura clínica da LTA e na maioria dos casos, resulta de uma LTA de evolução

crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado, mas pode aparecer concomitantemente à lesão cutânea. (BRASIL, 2007).

Aproximadamente 30 espécies ou subespécies de flebotomíneos são vetores comprovados de leishmanioses, e mais de 40 espécies estão provavelmente envolvidas na transmissão (LAINSON E RANGEL, 2005). No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei* (SHAW, 2003).

➤ **Leishmaniose visceral (LV)**

A Leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave de leishmaniose e apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo. É caracterizada por lesões crônicas de envolvimento sistêmico (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Pode ser causada por três espécies de *Leishmania* agrupadas no complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. (L) infantum* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) e *L. (L) chagasi*, no Novo Mundo (Américas) (GONTIJO e MELO, 2004). Aproximadamente 90% dos casos de Leishmaniose Visceral ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, enquanto 90% dos casos na América ocorrem no Brasil.

Em relação a LV na América, o agente etiológico é a *Leishmania chagasi*, que é uma espécie semelhante a *L. infantum*, que ocorre no Velho Mundo. Técnicas moleculares e bioquímicas atuais têm mostrado que *L. infantum* e a *L. chagasi* constituem uma única espécie (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Entretanto, neste trabalho trataremos o agente etiológico da LV americana como *L. chagasi*.

Nesta forma da doença, os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear de órgãos como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, frequentemente levando ao óbito quando não tratada. A LV acomete principalmente crianças, idosos, e pode ser considerada uma doença oportunista em pacientes portadores de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou sob tratamentos imunossupressores (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A susceptibilidade das crianças pode ser explicada pela relativa imaturidade do sistema imunológico, o que pode ainda ser agravado pela desnutrição e maior exposição ao vetor no peridomicílio.

As manifestações clínicas mais freqüentes, que permitem o diagnóstico clínico da doença são: febre e esplenomegalia associadas ou não a hepatomegalia. Pode ocorrer também linfadenopatia, caquexia, diarreia e broncopneumonia. No entanto, apenas uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolve sintomas da doença (BRASIL, 2006).

Na América, a principal espécie de flebotômíneo envolvida na transmissão da *L. chagasi* é a *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, espécie de hábitos alimentares oportunistas (DIAS *et al.*, 2003). Recentemente, *Lu. evansi* foi incriminada como vetor na Colômbia e Venezuela, e *Lu. cruzi* em foco no Mato Grosso do Sul (SANTOS *et al.*, 1998).

O *Lutzomyia longipalpis*, é considerado o mais adaptado flebotômíneo aos ambientes urbanos modificados pelo homem. A presença desta espécie desde 1936, já era reconhecida por Evandro Chagas nos principais focos de LV. O inseto tem ampla distribuição geográfica e está sempre presente onde há transmissão da LV, e sem dúvida é a espécie mais importante na epidemiologia da doença. Sua distribuição inclui áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas.

A LV zoonótica está limitada a reservatórios pertencentes a um grupo específico de mamíferos da família Canidae, sobretudo cães, raposas e lobos, podendo ainda envolver outros animais como reservatórios secundários, por exemplo, os marsupiais e roedores (GONTIJO e MELO, 2004).

A persistência da doença em uma dada área, depende da susceptibilidade do vetor e da presença de um hospedeiro igualmente susceptível, que funcione como reservatório para o parasito (DIAS *et al.*, 2003). O cão, por ser o mais importante reservatório doméstico da doença, é responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos, sobretudo na área urbana, devido a presença de formas amastigotas na pele. Portanto, é um dos alvos estratégicos de controle da doença (GONTIJO e MELO, 2004). Associado a outras medidas de controle ambiental, que diminuam o risco de transmissão, como por exemplo, o controle dos vetores, a Organização Mundial de Saúde (OMS), preconiza a eutanásia dos cães portadores de leishmaniose visceral canina (LVC), incluindo aqueles assintomáticos, embora reconheça as limitações dessa medida (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Animais susceptíveis podem apresentar lesões cutâneas, mais freqüentemente localizadas nas

orelhas, focinho e cauda, pêlo opaco, alopecia, hepatoesplenomegalia, onicogribose, adenopatias, ceratoconjuntivite, vômito, dentre outros sinais comuns a várias enfermidades. No Brasil, a forma assintomática da doença em cães, é encontrada em índices variáveis, geralmente representa 40 a 60% de uma população soropositiva. A inexistência de sinais e sintomas específicos da doença e a existência de cães assintomáticos, inviabiliza o diagnóstico clínico da LV (BRASIL, 2006).

O controle vetorial e de reservatórios, representam os maiores desafios para o controle da doença, dada a necessidade de melhor conhecer o comportamento do vetor no ambiente urbano, as dificuldades operacionais e o alto custo de execução. Além do controle de vetores e reservatórios, a vigilância da LV, visa reduzir a morbidade da doença e as taxas de mortalidade, através de diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

No Brasil, a LV apresenta diferentes perfis epidemiológicos, de acordo com características climáticas, geográficas, biológicas e sociais, que variam de acordo com a região e interação para transmitir a doença.

A LV no país, antes restrita a áreas rurais, atualmente encontra-se em plena expansão e urbanização, tornando-se uma preocupação para os órgãos de saúde pública. A mudança no padrão de transmissão da LV do campo para as cidades, associada à interiorização da AIDS no Brasil, levou a coinfeção *L. chagasi* / HIV. De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN), o número de casos de coinfeção aumentou de 21 em 2001, para 86 em 2005.

Desde a década de 1980, casos de LV têm sido relatados com transmissão autóctone em cidades de médio e grande porte de vários municípios brasileiros, como Montes Claros, Sabará, Rio de Janeiro e cidades do Nordeste do país (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Nos últimos anos, a incidência dos casos de LV aumentou na região Sudeste do Brasil, sendo a doença registrada em diversas cidades, incluindo Belo Horizonte (CAIAFFA *et al.*, 2005).

A região metropolitana de Belo Horizonte, desde 1992 tem sofrido expansão da LV, introduzida a partir de municípios vizinhos, sendo atualmente o município com alta densidade populacional que mais sofre com a ocorrência

de LV no Brasil. Na cidade, a LV é uma doença de padrão emergente e encontra-se, majoritariamente, concentrada em áreas desprivilegiadas, tendo uma série de fatores que contribuem para a sua ocorrência (CAIAFFA *et al.*, 2005). Dentre os fatores que contribuíram para a rápida expansão da LV no ambiente urbano, podemos incluir as modificações ambientais causadas por ações antrópicas, rápido processo migratório, interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados para áreas sem transmissão, assim como a proximidade entre as habitações, alta densidade populacional, urbanização do vetor e susceptibilidade da população à infecção (GONTIJO e MELO, 2004).

2.3. Tratamento

O tratamento convencional de ambas as formas, tegumentar e visceral de leishmanioses, baseia-se principalmente no uso endovenoso ou intramuscular de sais de antimônio pentavalente – Sb^v: Antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime[®], Rhodia) no Novo Mundo e Estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) no Velho Mundo e países de língua inglesa, como medicamentos de primeira escolha, em virtude de sua comprovada eficácia terapêutica (RATH *et al.*, 2003; HERWALDT, 1999). O Desoxicolato de Anfotericina B, um antibiótico antifúngico, é usado como medicamento de segunda escolha para o tratamento de pacientes em estado grave, gestantes, recidivantes e nos casos de falha terapêutica (BRASIL, 2006).

Os sais de antimônio para o tratamento das leishmanioses foram introduzidos na clínica médica, pela primeira vez em 1912, pelo cientista brasileiro Gaspar Vianna, sob a forma de tártaro emético, um complexo antimonial trivalente, Sb^{III}. Somente a partir da década de 40, o uso clínico do Sb^{III}, foi interrompido por causa dos seus severos efeitos colaterais, e pela descoberta de compostos menos tóxicos, os complexos de antimônio pentavalente Sb^v (BERMAN, 2003). No Brasil o Ministério da Saúde recomenda, protocolo específico de tratamento, dependendo das condições clínicas de cada paciente (BRASIL, 2006).

Embora não seja fatal, a leishmaniose cutânea é tratada para acelerar a cura, reduzir as lesões e prevenir a disseminação do parasito ou as recaídas.

Vale enfatizar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso é freqüente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (MARSDEN, 1986).

Em relação a LV, essa requer diagnóstico e tratamento precoce, muitas vezes ambulatorial ou em certos casos internamento hospitalar do paciente, devido a sua maior gravidade, morbidade e letalidade. Os pacientes transplantados renais, com insuficiência renal instalada previamente ao tratamento, são tratados com Anfotericina B na forma livre ou lipossomal. Este medicamento também é indicado como primeira escolha em pacientes com sinais de maior gravidade da doença, idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, co-morbidades e outras complicações (OSTROSKY-ZEICHMER *et al.*, 2003).

Outros fármacos podem ser também utilizados em situações de intolerância ou resistência aos antimoniais, como o Miltefosine, Paramomicina, Alopurinol, Metronidazol e Cetoconazol (REITHINGER *et al.*, 2007).

2.3.1. Mecanismo de ação dos antimoniais

O mecanismo molecular de ação dos antimoniais pentavalentes não está completamente elucidado, e seu uso é prejudicado pelos efeitos colaterais relacionados à sua toxicidade. A forma final do principio ativo e o seu alvo biológico não foram ainda identificados. O que se supõe, é que os antimoniais pentavalentes passem por uma dissociação para que o antimônio exerça sua atividade (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

Os antimoniais pentavalentes exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas que crescem em culturas axênicas. Este acentuado contraste entre as atividades *in vitro* e *in vivo* desses compostos, sugere que, para exercer a atividade leishmanicida, é necessária a redução de Sb^V para Sb^{III} . Foi proposto que o Sb^V seria uma pró-droga, que se torna ativa e tóxica após redução no organismo a Sb^{III} e que, dessa forma, interferiria no metabolismo dos tióis (WYLLIE *et al.*, 2004). Algumas pesquisas mostram que somente as formas amastigotas são capazes de reduzir Sb^V a Sb^{III} (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001). Por outro lado, alguns grupos têm sugerido que a redução do Sb^V ocorra no macrófago (SERENO *et al.*, 1998). Estas hipóteses não são incompatíveis, sendo possível que a redução ocorra em ambos os locais. De

acordo com a hipótese de que o Sb^V é reduzido a Sb^{III} na célula, recentemente foi mostrado que a glutatona, principal tiol encontrado nas células dos mamíferos, pode estar envolvida nesse processo (FREZARD *et al.*, 2001).

Vale ressaltar ainda que duas enzimas parasitárias, nomeadas redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2), mostraram-se capazes de converter Sb^V a Sb^{III} dentro da célula, sugerindo a possível participação de enzimas do parasito nesse processo (DENTON *et al.*, 2004). A participação do parasito no metabolismo dos antimoniais foi sugerida a partir dos maiores níveis de Sb^{III} encontrados em hamsters experimentalmente infectados, quando comparados àqueles tratados sem infecção (LUGO *et al.*, 1994).

Por outro lado, o grupo de Demicheli *et al.*, (2002) demonstrou, pela primeira vez, que o mecanismo de ação do fármaco pode também estar associado à formação de complexos estáveis entre o Sb^V e os ribonucleosídeos. A formação desses complexos poderia estar relacionada com a interferência dos antimoniais pentavalentes no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito e na depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH *et al.*, 2003). A figura 3, ilustra as hipóteses descritas acima:

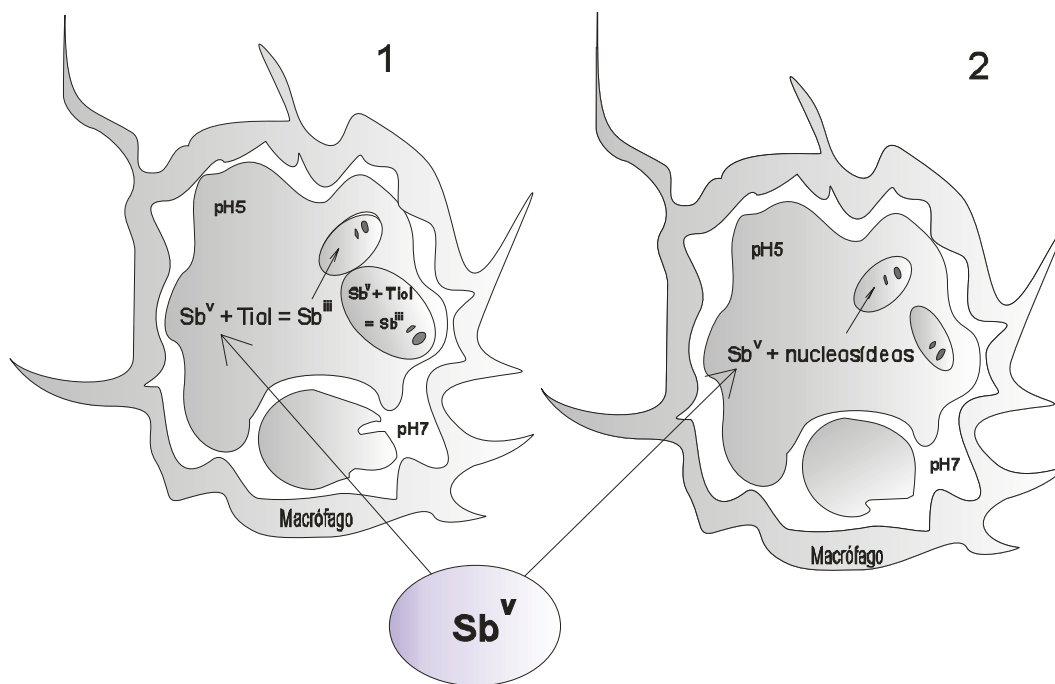


Figura 3. Dois modelos propostos por Demicheli e Frézard, para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. O modelo (1) envolve a redução de Sb^V a Sb^{III} pelos tióis; o modelo (2) envolve a formação de complexo Sb^V -ribonucleosídeo (Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, n.6, jul, 2005). Desenho de autoria de Lara Caixeta Marques da Rocha (não publicado).

2.3.2. Farmacocinética dos antimoniais pentavalentes

Nos compostos antimoniais pentavalentes, o princípio ativo é o metal Sb^V , que ao contrário do Sb^{III} , não se liga aos eritrócitos, atingindo no plasma concentrações mais expressivas do que os compostos trivalentes, sendo conseqüentemente excretado mais rapidamente pelos rins. No caso dos compostos trivalentes, uma quantidade expressiva de antimônio no sangue pode estar relacionada com a grande afinidade do Sb^{III} pelos tecidos, principalmente células vermelhas, apresentando portanto, maior toxicidade quando comparada aos antimoniais pentavalentes. Por este motivo, o Sb^V vem sendo usado em altas doses, desde o início da sua utilização no tratamento das leishmanioses (FELICETTI *et al.*, 1974).

Quando os antimoniais pentavalentes são dados com injeções repetidas, observa-se que, após os cinco primeiros dias de uso, os níveis de retenção do antimônio nos tecidos vão aumentando, e são encontrados principalmente no fígado e baço, grandes concentrações do metal. Parte desse antimônio será reduzido a Sb^{III} (BRASIL, 2007).

A excreção de Sb^{III} e Sb^V em humanos é preferencialmente por via renal. Mais de 80% do Sb^V administrado intravenosamente, é excretado na urina após 6-8h, como por exemplo, o estibogluconato. A farmacocinética dos antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), após injeção intramuscular, pode ser descrita por três fases distintas: uma fase inicial de absorção com tempo de meia vida de 0,85 h; uma fase de eliminação rápida com tempo de meia vida de 2,02 h e uma fase de eliminação lenta com tempo de meia vida de 76h (CHULAY *et al.*, 1988).

Do ponto de vista funcional, o Sb^V tem sido bem tolerado pelos rins, embora existam casos descritos de pacientes com disfunção tubular renal, caracterizada por falha na capacidade de concentração da urina pelos rins (BRASIL, 2007).

2.3.3. Limitações no tratamento das leishmanioses

Embora os antimoniais pentavalentes continuem sendo os fármacos de primeira escolha para a maioria dos casos de leishmaniose, após administração parenteral, estes são excretados rapidamente do organismo,

pois possuem meia vida curta, cerca de 2 horas, de forma que é necessário um tratamento prolongado por via intramuscular ou endovenosa durante 21 a 28 dias para que o medicamento possa acumular nos tecidos (CHULAY *et al.*, 1988).

Embora o medicamento antimonial esteja geralmente disponível nas unidades de saúde, o seu potencial hepato, cardio e nefrotóxico, aliado a outros efeitos colaterais, como dores musculares e o seu uso parenteral exclusivo, representa um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos, levando à redução, interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes do seu término (DEMICHELI *et al.*, 2005), além da eficácia variável, por exemplo, contra a forma mucosa da leishmaniose (FRANKE *et al.*, 1990).

As drogas e os cuidados médicos necessários devido aos efeitos colaterais, elevam o custo do tratamento. Os relatos de pacientes não responsivos às drogas, têm aumentado, seja devido ao surgimento de cepas resistentes de parasitos (CROFT *et al.*, 2006), embora recentes estudos questionem a existência de resistência (YARDLEY *et al.*, 2006), ou à imunossupressão causada principalmente pela co-infecção com o HIV (OMS, 2007).

Deve-se também levar em conta que a maioria dos casos ocorre em áreas de difícil acesso, o que dificulta tanto a aplicação parenteral da droga, como o monitoramento de seus efeitos colaterais (BERMAN, 1997).

Portanto, a quimioterapia das leishmanioses apresenta várias limitações, devido tanto a toxidez dos antimoniais, quanto a baixa eficácia dos outros fármacos atualmente disponíveis, sendo que com exceção da Miltefosina e do Ambisome (formulação da anfoterina B em lipossomas) nenhum produto realmente novo, foi lançado no mercado nos últimos 20 anos, para tratar esta doença.

Vale ressaltar que a localização intracelular do parasito dentro do fagolisossomo, dificulta o acesso de moléculas potencialmente ativas que precisam atravessar várias barreiras membranares para atingí-lo. Para alcançar o efeito terapêutico, altas doses do medicamento são necessárias, levando em geral ao seu acúmulo em vários tecidos e, conseqüentemente, a efeitos tóxicos. A toxicidade é um problema comum a praticamente todos os antileishmaniais mais potentes, devido à necessidade do uso de doses altas

para atingir o ambiente intracelular da célula infectada e provocar a morte do parasito.

Neste contexto, esforços devem ser efetivados no sentido de ampliar os testes clínicos com novas drogas promissoras por via oral (fluconazol e miltefosine) para o tratamento da LV, além das drogas de uso tópico para LTA (paromomicina e imiquimod), e de pesquisar drogas alternativas que facilitem o tratamento de ambas as formas da doença (BASANO *et al.*, 2004).

2.3.4. Novas expectativas no tratamento das leishmanioses

Historicamente, a descoberta de fármacos passou por várias etapas, sendo inicialmente ao acaso, como a descoberta da penicilina e benzodiazepínicos, por exemplo. Posteriormente, utilizou-se a busca aleatória (*screening*) de substâncias previamente sintetizadas na procura de compostos que apresentassem atividade biológica. Com o avanço da bioquímica e da biologia molecular, foi possível planejar moléculas bioativas com base no mecanismo de ação farmacológico das mesmas (SILVERMAN, 1992).

O processo de planejamento racional de substâncias bioativas com propriedades antiparasitárias baseia-se na investigação bioquímica comparativa entre parasito e hospedeiro, no intuito de se descobrir atividades metabólicas potencialmente diferentes, que possam vir a ser alvo para uma inibição seletiva, e na elucidação do modo de interação do composto com seu alvo terapêutico (DEMICHELI *et al.*, 2005).

Atualmente, tem-se investido em pesquisas com novas drogas e formulações, devido às limitações da quimioterapia empregada contra as leishmanioses. Afora os métodos tradicionais de *screening* aleatório, essencialmente, duas estratégias diferentes podem ser utilizadas de forma racional para o desenvolvimento de novos medicamentos (FREZARD *et al.*, 2005):

- Síntese com modificações químicas de substâncias ativas novas ou já utilizadas, de forma a inibir seletivamente a(s) biomolécula(s) alvo(s) e alcançá-la(s) com maior especificidade.

- Associação reversível de fármaco já em uso, a um nanossistema carreador, visando direcioná-lo melhor para a célula-alvo e evitar os locais indesejáveis, onde o princípio ativo exerce toxicidade, diminuindo assim sua toxicidade e/ou promovendo sua absorção por vias mais aceitáveis, como a oral e tópica.

O uso de lipossomas como veículo de fármaco tem sido uma tendência da indústria farmacêutica e abre perspectivas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses. Os lipossomas, por serem rapidamente capturados da circulação sanguínea pelos macrófagos do fígado, baço e medula óssea, conduzem a droga ao seu sítio de infecção, no caso da LV, o que disponibiliza uma maior quantidade do princípio ativo para interagir com o parasito. Essa propriedade foi explorada no medicamento Ambisome®, formulação da anfoterina B em lipossomas, usada com sucesso no tratamento de pacientes não responsivos às drogas antimoniais, sem relato de efeitos colaterais. A eficácia na faixa de 100% em pacientes imunocompetentes rendeu-lhe a aprovação pela Food and Drugs Administration (FDA-USA) como a primeira apresentação a base de lipossomas a ser reconhecida para tratamento da LV (MEYERHOFF, 1999). Entretanto, o elevado custo dessa formulação tornou inviável o seu uso em larga escala no Brasil.

Como o desenvolvimento dos nanossistemas é recente, pouco ainda se sabe sobre estes, em termos de biodistribuição nos vários tecidos, dos efeitos intracelular e extracelular dos produtos de sua degradação e dos mecanismos responsáveis por efeitos colaterais específicos. Apesar das suas vantagens não só em termos de redução da toxicidade do fármaco, mas também na duração do tratamento, permitindo aumentar a adesão dos pacientes, o custo elevado dos componentes desses nanossistemas, permanece como uma barreira importante ao uso dessas formulações em larga escala. Portanto, a pesquisa de novos componentes biodegradáveis e biocompatíveis mais baratos deve ser incentivada, de forma que sua relação custo/benefício seja compatível com a produção de um medicamento para as leishmanioses (FREZARD *et al.*, 2005; FUSAI *et al.*, 1995).

Princípios ativos de caráter lipofílico como a Miltefosine, apresentam possibilidade de serem administrados oralmente, o que minimiza de forma significativa os transtornos de longas e repetitivas hospitalizações. Estudos

recentes têm demonstrado a eficácia deste medicamento como tratamento alternativo para a doença. Utilizado por via oral, obteve índices de cura em torno de 89 a 100% em pacientes com LV na Índia (JHA *et al.*, 1999).

2.4. Metabolismo de purinas em *Leishmania* e mamíferos

Como no presente trabalho nos propomos testar “in vitro” compostos contra leishmanioses derivados de nucleosídeos complexados ao antimônio, abordaremos rapidamente o metabolismo de purinas em *Leishmania* e em mamíferos.

Os nucleosídeos são compostos que possuem como componente característico uma base nitrogenada purínica (adenina ou guanina) ou pirimidínica (citosina, timina ou uracila), ligada de forma covalente ao carbono 1' da pentose. Quando o nucleosídeo se liga a um fosfato através do carbono 5', a molécula é denominada nucleotídeo (figs. 4 e 5). Os nucleosídeos possuem várias funções no metabolismo celular. Participam de reações metabólicas e da resposta das células aos hormônios e a outros estímulos extracelulares. São componentes estruturais de uma série de co-fatores enzimáticos e intermediários metabólicos, e são constituintes do DNA e RNA, que são responsáveis pela transmissão da informação genética (MARR e BERENS, 1983).

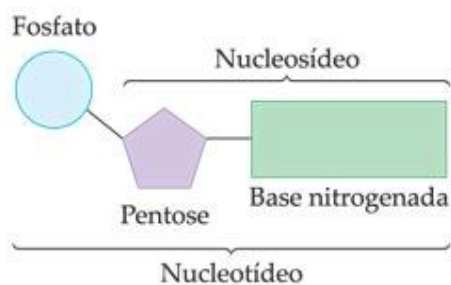


Figura 4. Estrutura dos nucleosídeos (pentose, base nitrogenada) e nucleotídeos (pentose, base nitrogenada e fosfato) Disponível em: < <http://profs.ccems.pt/OlgaFranco/10ano/biomoleculas.htm> > Acesso em: 02 dec. 2009.

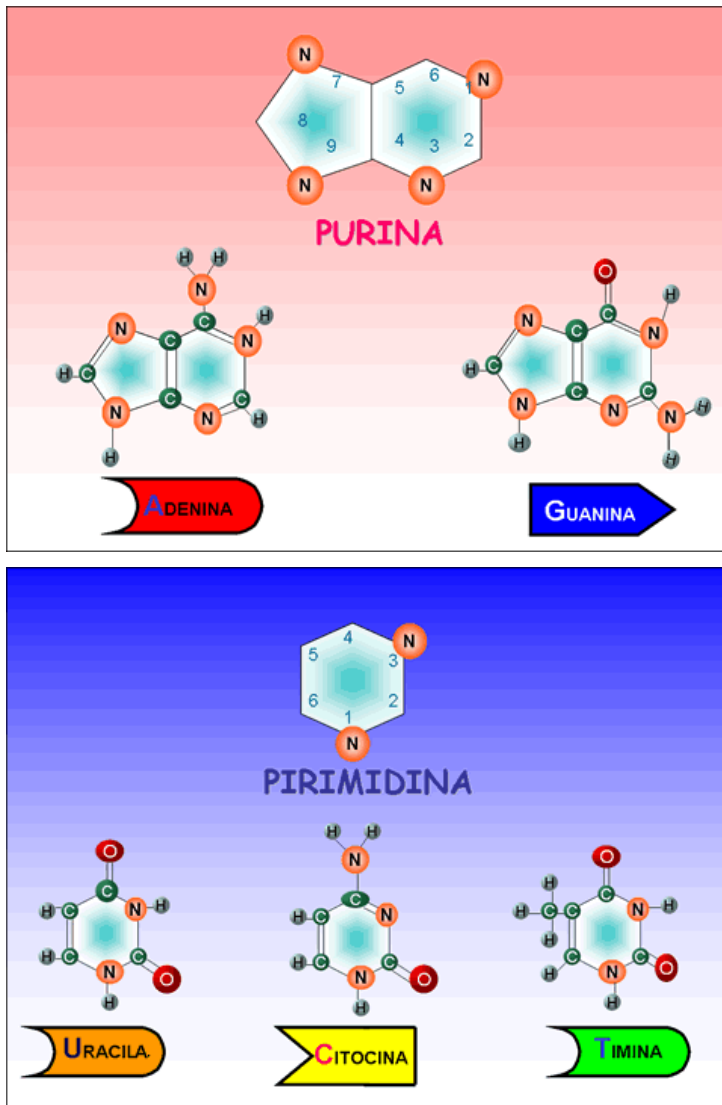


Figura 5. Bases purínicas e pirimidínicas dos nucleotídeos e nucleosídeos. Disponível em: <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/imagenes/biomoleculas/purinas.gif>. Acesso em 30 de Nov. 2009.

➤ **Enzimas envolvidas na síntese de purinas nos mamíferos e em *Leishmania sp***

Os mamíferos podem sintetizar os purino-nucleotídeos a partir de duas vias: a primeira envolve dez reações enzimáticas seqüenciais (síntese de novo) e a segunda utiliza purino-nucleotídeos pré-formados (via de recuperação).

Os protozoários parasitos, por sua vez, são auxotróficos para purino-nucleotídeos, ou seja, eles não produzem os purino-nucleotídeos necessários a sua sobrevivência. Como consequência disso, cada gênero de parasito desenvolveu um conjunto específico de enzimas da via de recuperação que lhe

permite utilizar as purinas pré-formadas pelo hospedeiro (MARR e BERENS, 1983).

Antes de serem captados, os nucleotídeos em *Leishmania*, devem ser convertidos em nucleosídeos por 3´nucleotidasas/nucleases da superfície da célula. As enzimas envolvidas nesse processo são: adenina deaminase e guanina deaminase, que convertem adenina e guanina a hipoxantina e xantina, respectivamente. A atividade de fosforilases não é bem descrita em *Leishmania*, no entanto, a atividade das fosforribosiltransferases (PRTase) exerce uma importância central na via de salvação das bases purínicas. Até hoje, foram descritas três enzimas PRTase que participam da via de salvação em *Leishmania*: Adenina fosforribosiltransferase (APRTase) hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRTase) e xantina fosforribosiltransferase (XPRTase). As PRTases dos parasitos convertem as purinas (hipoxantina e xantina) a inosina monofosfato (IMP) e xantina monofosfato, respectivamente (MARR e BERENS, 1983; CARTER *et al.*, 2008).

É importante mencionar, que as enzimas HGPRTase e XPRTase de *Leishmania* e *Trypanosoma* diferem das do hospedeiro em sua especificidade pelo substrato, já que as enzimas do parasito usam eficientemente como substrato vários análogos, que são incorporados ao ácido nucléico e levam a morte seletiva do parasito (MARR e BERENS, 1983). A enzima XPRTase de *L. donovani* há longa data é foco de atenção como alvo para o desenvolvimento de fármacos, já que esta não está presente nos sistemas de mamíferos (figura 6) (KOUNI, 2003; CARTER *et al.*, 2008)

Dentre as várias rotas de aquisição de purinas por parasitos, a via envolvida na captação de adenosina é única e difere significativamente nas formas extracelulares do parasito (promastigotas) quando comparada a sua forma intracelular (amastigotas). A adenosina Cinase (AdK) é a enzima envolvida nesta via, fosforilando adenosina a adenosina monofosfato (AMP). A Adk está presente em promastigotas e amastigotas, mas mostra um padrão de atividade estágio específico. Durante o processo de transformação do parasito, é alterada atividade de um grande número de proteínas e/ou enzimas, que podem ser alvos prospectivos para o desenvolvimento de quimioterápicos. Quanto à atividade enzimática, as promastigotas expressam adenina deaminase, que é conhecida pela deaminação da adenina a hipoxantina,

enquanto as amastigotas, assim como as células de mamíferos, expressam adenosina deaminase, que deamina adenosina a inosina. Embora a adenina deaminase, das promastigotas, não esteja presente em amastigotas, as vias de utilização de guanina, xantina, hipoxantina e seus respectivos nucleosídeos são similares tanto em promastigotas quanto em amastigotas (CARTER *et al.*, 2008).

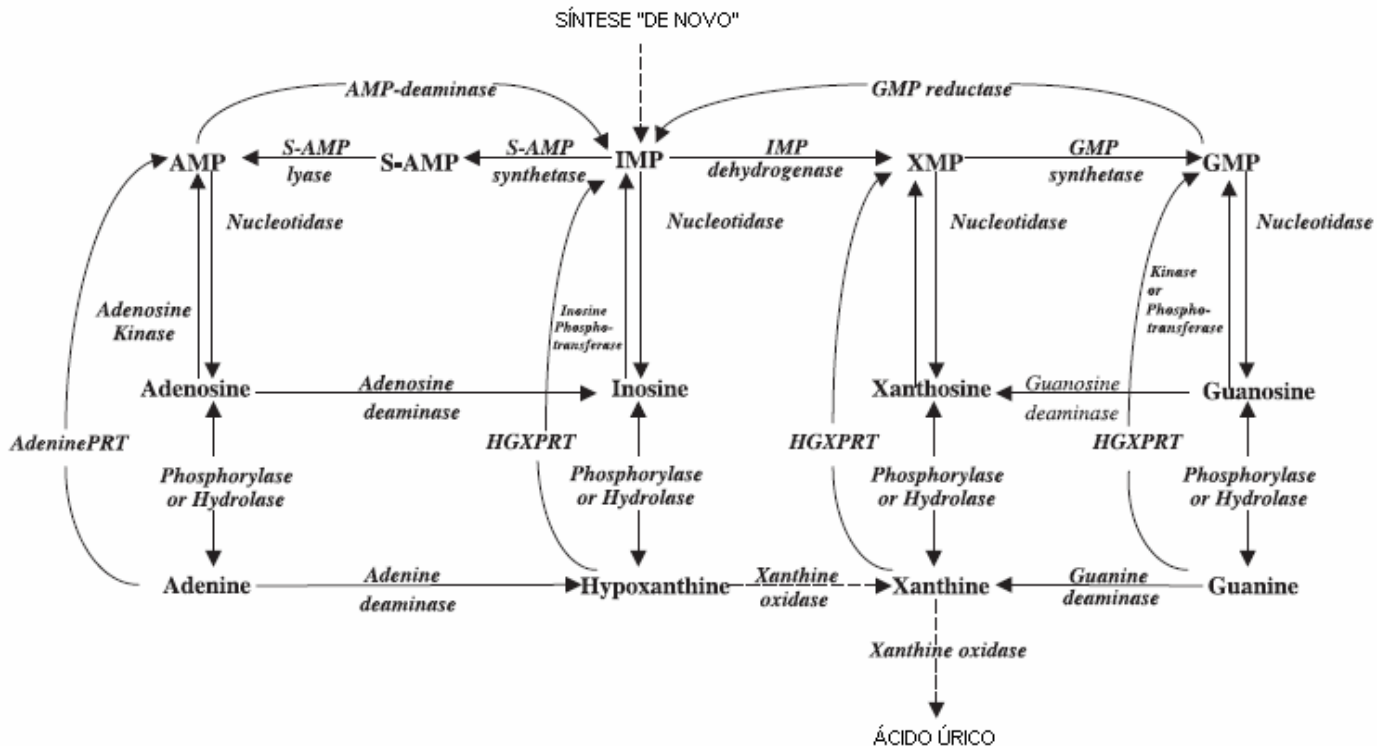


Figura 6. Representação das reações enzimáticas da via de salvação em *Leishmania*. As linhas pontilhadas indicam reações ausentes ou não estabelecidas (Modificado de KOUNI, 2003).

➤ **Transportadores envolvidos na via de salvação das purinas exógenas por *Leishmania* e na síntese de purinas por mamíferos**

O transporte através da membrana celular é o primeiro passo na via de salvação de purinas exógenas pelo parasito. No entanto, os mecanismos de transporte de membrana em parasitos, diferem em suas propriedades quando comparados aos seus hospedeiros mamíferos.

Os nucleosídeos são hidrofílicos e podem passar pela membrana das células de mamíferos por difusão passiva. Para facilitar a via de salvação desses precursores da síntese de nucleotídeos, existe nas células, um complexo sistema de transporte, que consiste em múltiplas proteínas

carreadoras conhecidas como transportadores de nucleosídeos. Estes transportadores estão divididos em duas grandes categorias: A primeira é constituída pela família dos transportadores de nucleosídeos bidirecionais equilibrativos independentes de sódio (ENT's). A segunda é constituída pela família dos transportadores de nucleosídeos concentrativos unidirecionais dependentes da concentração de sódio (CNT's). Estes transportadores utilizam o gradiente de Na^+ no interior da célula estabelecido pela bomba de $\text{Na}^+/\text{K} - \text{ATPase}$, para mover para o interior das células substratos contra seu gradiente de concentração (KONG *et al.*, 2004).

Os ENT's em mamíferos têm seletividade ampla e variam em sua capacidade de reconhecer nucleosídeos e nucleobases purínicas e pirimidínicas (KOUNI, 2003; CABRITA *et al.*, 2002). É descrito que células de mamíferos possuem inibidores do transporte de nucleosídeos, tal como o nitrobenzilmercaptapurina (NBMPR). Algumas isoformas dos ENT's foram caracterizadas e é sabido que existe diferença quanto à sensibilidade aos derivados de purinas, pois algumas isoformas necessitam de concentrações micromolares desses derivados para inibir o transporte de purinas, enquanto outras necessitam de concentrações nanomolares para exercer esta função (CARTER *et al.*; 2001). Quanto à sensibilidade a NBMPR, os ENT's, podem ser subdivididos em duas classes: i) ENT's que são inibidos por concentrações nanomolares de NBMPR, denominados ENT's sensíveis (*es*). ii) ENT's que não são inibidos por NBMPR, denominados transportadores equilibrativos insensíveis (*ei*) (KOUNI, 2003; CABRITA *et al.*, 2002).

Os transportadores ENT's em células humanas (hENT's), podem ainda ser subdivididos em hENT1 e hENT2, ambos com seletividade ampla aos substratos purínicos e pirimidínicos (KOUNI, 2003; CABRITA *et al.*, 2002; CARTER *et al.*, 2001). O subtipo hENT2, também pode estar presente em outros mamíferos, parasitos e plantas exibindo nestes, uma incomum atividade concentrativa próton dependente. Em *L. donovani* e *L. major* os transportadores de nucleosídeos da família ENT, são denominados LdNT1, LdNT2, LdNT3 e LdNT4. Os ENT's em *Leishmania*, exibem uma especificidade sobreposta ao substrato: Os LdNT1 reconhecem adenosina e nucleosídeos pirimidínicos, os LdNT2, mediam o transporte de inosina e guanosina, os LdNT3 transportam hipoxantina, xantina, adenina e guanina (LANDFEAR, S.M *et al.*, 2004;

CABRITA *et al.*, 2002; CARTER *et al.*, 2001), enquanto os LdNT4 media o transporte apenas de adenina (ORTIZ *et al.*, 2009) (Figura 7). O LdNT4, é requerido para a viabilidade das amastigotas, que vivem dentro do fagolisossoma dos macrófagos de mamíferos, onde o pH é ácido. No pH ácido LdNT4, pelo menos o de *L. major*, adquire a habilidade para transportar adenina, hipoxantina, guanina e xantina. Assim, LdNT4 é um transportador de purino nucleobase, ativado em pH ácido, que funciona otimamente nas condições fisiológicas nas quais o parasito é exposto no fagolisossoma, ao contrário do LdNT3 que tem sua ação em pH neutro (ORTIZ *et al.*, 2009). Estes ENT's em *Leishmania*, transportam também análogos de nucleosídeos purínicos com diferente especificidade. Estes transportadores também são documentados em outras espécies de *Leishmania* (CARTER *et al.*, 2008).

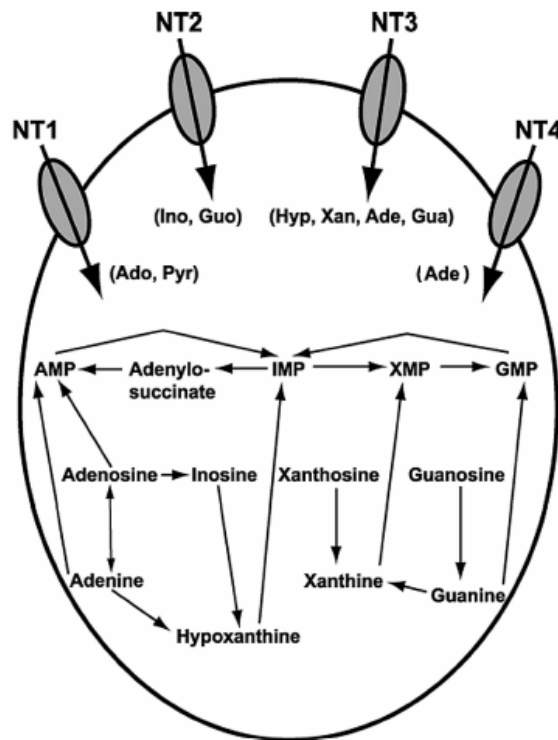


Figura 7. Captação de purinas por transportadores e esquema simplificado da via de salvação de purinas em promastigotas de *Leishmania*. A estrutura oval representa a superfície da membrana celular do parasito. Os quatro transportadores identificados em *Leishmania donovani* e *Leishmania major* estão indicados como NT1, NT2, NT3 e NT4, com seus respectivos substratos indicados entre parênteses (Ado: adenosina, Pyr: pirimidinas, Ino: inosina, Guo: guanosiina; Hyp: hipoxantina; Xan: xantina; Ade: adenina; Gua: guanina) (Modificado de Landfear, 2004).

Ao contrário dos ENT's, os transportadores sódio dependentes em células de mamíferos, exibem uma seletividade quanto aos substratos purínicos e pirimidínicos. Cinco subtipos de CNT's foram identificados (N1-N5),

mas apenas três subtipos são identificados ao nível molecular (N1-N3). O subtipo N1 (ou *cif* - CNT insensível a NBMPR seletivo para formicina B) é seletivo para purinas, mas também transporta uridina. O N2 (ou *cit* - CNT insensível a NBMPR seletivo para timidina) é seletivo para pirimidinas, mas também transporta adenosina. O N3 (ou *cib* - CNT insensível a NBMPR com seletividade ampla) tem seletividade ampla, transportando tanto purinas quanto pirimidinas. O N4 transporta pirimidinas, adenosina e guanosina e foi isolado do rim de humanos. O N5 transporta formicina B, é sensível a NBMPR e foi descrito apenas em linhagens de células de humanos com leucemia (Quadro 2) (KONG *et al.*, 2004; SOLER *et al.*, 2001)

Como visto, os parasitos assim como os mamíferos, podem carrear nucleosídeos a partir de transportadores de nucleosídeos e nucleobases, ou por difusão passiva. Assim como no caso dos estudos de transportadores de purinas em células de mamíferos, investiga-se a especificidade, número e natureza dos transportadores de nucleosídeos em parasitos, através de estudos de competição, inibição e genéticos. Nestes estudos, foi demonstrado que a especificidade, inibição e afinidade pelos ligantes dos transportadores de nucleosídeos de parasitos e humanos são completamente diferentes. Além disso, nenhum dos transportadores nos parasitos é sódio dependente (KOUNI, 2003; CABRITA *et al.*, 2002; CARTER *et al.*, 2001). Como os transportadores de nucleosídeos nos parasitos, possuem maior afinidade para nucleosídeos e nucleobases que os de mamíferos, este fenômeno talvez reflita em baixos níveis de nucleosídeos no fagolisossoma, onde reside o parasito (CARTER *et al.*, 2001).

Como é mostrado no Quadro 2, os transportadores de purino nucleosídeos em mamíferos e em *Leishmania*, variam em sua habilidade de reconhecer nucleosídeos e nucleobases purínicas e pirimidínicas:

Sistema de Transporte	Especificidade ao substrato	Na⁺ dependente	Sensibilidade ao NBMPR
(ENT's)			
(es)	Nucleosídeos purínicos e pirimidínicos	Não	Sim
(ei)	Nucleosídeos purínicos e pirimidínicos e nucleobases	Não	Não
LdNT1	Adenosina e pirimidinas	Não	Não definido
LdNT2	Inosina e Guanosina	Não	Não definido
LdNT3	Hypoxantina, Xantina, Adenina e Guanina	Não	Não definido
LdNT4	Adenina	Não	Não definido
(CNT's)			
N1 (cif)	Nucleosídeos purínicos e uridina	Sim	Não
N2 (cit)	Nucleosídeos pirimidínicos e adenosina	Sim	Não
N3 (cib)	Nucleosídeos purínicos e pirimidínicos	Sim	Não
N4	Nucleosídeos pirimidínicos, guanosina e adenosina	Sim	Não

Quadro 2. Comparação da especificidade de substrato entre humanos e *Leishmania donovani*

Parasitas intracelulares como *Leishmania*, multiplicam-se rapidamente dentro do vacúolo fagolisossomal e obtêm de seu hospedeiro, seu requerimento nutricional através da membrana do vacúolo fagolisossomal, que atua como uma peneira molecular, permitindo a difusão bidirecional de pequenas moléculas (<1300Da), incluindo nucleosídeos e nucleotídeos, entre o espaço vacuolar e o citoplasma da célula hospedeira. Em contraste, a

permeabilidade da membrana da célula hospedeira é restrita e através dela não acontece o transporte de nucleotídeos, pois são moléculas grandes e precisam ser desfosforiladas a nucleosídeos para que possam ser transportados para dentro da célula (KOUNI, 2003). Como mencionado, os nucleosídeos são transportados para o interior das células por transportadores, dos quais alguns são inibidos por NBMPR. Contudo, a infecção altera a permeabilidade e o metabolismo de purinas na célula parasitada. Todavia, a infecção não altera o transporte de todos os nutrientes, indicando que a alteração no transporte de nucleosídeos em células infectadas possui um grau de seletividade.

Atualmente existe uma discussão sobre como os nucleosídeos entram em células parasitadas. Em células infectadas, o NBMPR não inibe a captação de nucleosídeos como acontece em células não parasitadas. Análises do transporte de nucleosídeos em eritrócitos de humanos infectados com *Plasmodium falciparum* demonstraram que a infecção induz nas células parasitadas um transportador insensível a NBMPR. Sem a inibição dos transportadores, os análogos de nucleosídeos como por exemplo, o alopurinol e a formicina B, também podem continuar sendo transportados e atingirem o parasito levando-o a morte sem prejudicar a célula hospedeira, uma vez que a toxicidade destes análogos é seletiva para o parasito (KOUNI, 2003).

➤ **Regulação do transporte de nucleosídeos**

Em geral, a atividade dos transportadores de membrana pode ser regulada ao nível transcricional ou pós transcricional. Na primeira instancia a síntese de mRNA pode ser modificada pela indução ou supressão da transcrição, o que modifica a produção das proteínas transportadoras. Em segunda instancia, o transporte pode ser regulado ao nível protéico, por meio múltiplos mecanismos. Em um dos mecanismos, a proteína transportadora é diretamente modificada por fosforilação, resultando na alteração de sua atividade e cinética. Outro mecanismo é o pré-armazenamento de uma porção da proteína transportadora em compartimentos celulares, modulação da produção de proteínas e/ou índices de degradação (KONG *et al.*, 2003; CABRITA *et al.*, 2002). O número de proteínas transportadoras funcionais pode

ser regulado por hormônios, nutrientes, adenina e ativação de vias de sinalização intracelulares. No entanto, a regulação do transporte de nucleosídeos depende do tipo celular e envolve múltiplos mecanismos (KONG *et al.*, 2003).

O transporte em macrófagos da medula óssea, por exemplo, é mediado pelos sistemas concentrativos N1 e N2 (CNT1 e CNT2) e pelos sistemas equilibrativos *es* e *ei* (ENT1, ENT2). Estudos demonstraram que $INF\gamma$, leva a ativação, bloqueia a proliferação de macrófagos, aumenta a expressão de CNT1 e CNT2 e regula negativamente o mRNA ENT's (*es*), o que sugere que a regulação seletiva de transportadores de nucleosídeos é crítica para a proliferação e ativação de macrófagos (KONG *et al.*, 2003; SOLER *et al.*, 2001).

A estimulação da proteína C Cinase causa aumento no transporte de nucleosídeos e o oposto é observado no caso da diminuição da expressão da mesma. Não se sabe se as Cinases conseguem seu efeito por fosforilação direta das proteínas transportadoras ou indiretamente, por fosforilação das proteínas acessórias. Em estudos realizados em células da musculatura lisa e endoteliais de ratos, a insulina, D-glucose, cAMP, cGMP e óxido nítrico demonstraram modular a atividade de transporte de adenosina (CABRITA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, sabe-se que a adenosina quando no espaço extracelular, atua por meio de quatro receptores diferentes: A1 (presentes no sistema nervoso central), A2A (em todas as células sanguíneas), A2B (no cérebro e tecidos), A3 (em diversos tecidos), da família dos receptores P1, associados a proteína G. Os receptores A1 e A2 são associados a proteínas G inibitórias e os A2A e A2B estão associados a proteínas G estimulatórias. Níveis elevados de ATP e adenosina são encontrados em locais de inflamação, mas ATP possui efeito pró-inflamatório, enquanto adenosina possui efeito anti-inflamatório. Em infecções por bactérias, os receptores A2 modulam a produção de $TNF\alpha$ em macrófagos expostos a diferentes ligantes de "Toll-like receptors". Além disso, a adenosina extracelular aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em monócitos (LINK *et al.*; 2000). A ativação desses receptores de adenosina também produz efeitos anti-oxidantes, além

da adenosina inibir a produção de superóxido em macrófagos ativados (SI *et al.*; 1997)

Embora existam estudos, os dados disponíveis sobre o transporte de nucleosídeos em macrófagos não são claros. Na linhagem de macrófagos S1, foi descrito um sistema equilibrativo, e o sistema concentrativo não é bem elucidado em macrófagos peritoneais. O padrão de expressão de transportadores pode variar de acordo com a linhagem celular ou sua origem (SOLER *et al.*, 2001).

2.5. Complexos Sb^V-ribonucleosídeos

O fato do metabolismo das purinas, em *Leishmania* e *Trypanosoma*, diferir daquele encontrado nos seres humanos, fornece bases para o desenvolvimento racional de fármacos anti-parasitários, como os análogos de purinas e também os complexos Sb^V-ribonucleosídeos, como os que estão sendo avaliados no presente trabalho. Os análogos inibem as enzimas responsáveis pelo metabolismo de purinas e, conseqüentemente, impedem a síntese de nucleosídeos purínicos no parasito. Alguns análogos sintéticos possuem valor farmacêutico por exibirem atividade antiviral, anticâncer e leishmanicida (MARR, 1991). Quanto aos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, o mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, embora exista a hipótese de que esse mecanismo possa ser semelhante ao do alopurinol.

Embora a *Leishmania* seja prótrófica para pirimidinas, expressa ainda enzimas da via de salvação de pirimidinas. Devido ao fato das vias de biossíntese de pirimidino nucleotídeos entre *Leishmania* e os seres humanos serem semelhantes, o metabolismo de pirimidinas em *Leishmania* é considerado menos propício à manipulação terapêutica quando comparado a via de salvação de purinas. Entretanto, evidências obtidas a partir de uma variedade de protozoários parasitos, sugerem que a inibição seletiva de enzimas da via de biossíntese de pirimidinas, também oferece um paradigma terapêutico racional (CARTER *et al.*; 2008)

Os carboidratos na composição de compostos químicos como o AM e os complexos Sb^V-ribonucleosídeos, são responsáveis pelo aumento da solubilidade do Sb^V e, possivelmente, por sua entrega ao interior dos

macrófagos, onde a *Leishmania* se multiplica. Além disso, os ribonucleosídeos purínicos e pirimidínicos contêm, em sua estrutura química, sítios de coordenação de íons metálicos. Alguns metais como o antimônio, bismuto e molibdênio formam complexos com a unidade ribose (DEMICHELI *et al.*, 2002). Com base nesse estudo, o grupo de Demicheli, demonstrou pela primeira vez, que o KSb(OH)_6 reage, em solução aquosa neutra, com ribonucleosídeos adenosina, citidina e uridina formando complexos de estequiometria Sb:Rb 1:1. As reações do Sb^{V} com guanósina, adenosina, citidina e uridina, foram caracterizadas termodinamicamente e cineticamente em condições de temperatura e pH próximos às fisiológicas. A caracterização desses complexos por espectrometria de massas, eletrodispersão (ESI-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) conforme descrito por Demicheli, (2006), permitiu propor as fórmulas estruturais mostradas na figura 8, para os complexos Sb^{V} -adenosina [Sb^{V} -A], Sb^{V} -citidina [Sb^{V} -C] e Sb^{V} -uridina [Sb^{V} -U], sugerindo uma estrutura octaédrica com o Sb^{V} coordenado aos dois oxigênios das posições 2' e 3' da ribose e a quatro hidroxilas completando a esfera de coordenação.

O estudo da reação do Sb^{V} com a guanósina, levou a formação de um hidrogel translúcido constituído de complexos Sb^{V} -guanósina de estequiometria (1:1) e (1:2) formados através da ligação do antimônio à ribose. Dados obtidos na técnica de dicroísmo circular, conforme descrito por Demicheli *et al.*, (2006), indicam que a formação do hidrogel Sb^{V} -guanósina resulta de dois tipos de interações: 1) ligações covalentes formando os complexos Sb^{V} -guanósina e 2) interações intermoleculares entre os diferentes complexos Sb^{V} -guanósina via emparelhamento de base (“back stacking”). A formação do hidrogel, sugere um grande potencial para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Assim, o desenvolvimento racional de fármacos, inclui o grupo dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Devido às limitações referentes aos medicamentos existentes no mercado, ao avanço das leishmanioses em várias regiões do mundo, aliados ao surgimento de parasitos não responsivos aos medicamentos e ao caráter oportunista da leishmaniose em pacientes HIV+, a OMS caracteriza a leishmaniose como importante doença emergente, reconhecendo a necessidade de se priorizar a pesquisa em novas estratégias de tratamento (BERMAN, 1997). A assembléia da OMS em 2007 (World Health Assembly), adotou a resolução WHA60.13 no controle das leishmanioses. Esta resolução incentiva pesquisas que busquem encontrar alternativas seguras, efetivas e acessíveis à medicina, para o tratamento oral, parenteral ou tópico das leishmanioses, envolvendo ciclos mais curtos de quimioterapia, menor toxicidade e novas combinações de fármacos.

A falta de opções terapêuticas ou tratamentos mais adequados para a leishmaniose, doença de Chagas, malária, tuberculose e doença do sono, classificadas como doenças negligenciadas, é o resultado da ausência de políticas públicas e do mercado internacional, no investimento para o desenvolvimento de novas drogas eficazes contra essas doenças, de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. É necessário buscar estratégias para solucionar esta questão, pois apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares e celulares das patologias, o desenvolvimento de novas drogas para tratar estas doenças avança a passos lentos (NWAKA e RIDLEY, 2003). O Brasil perde a oportunidade de participar do mercado farmacêutico mundial globalizado de bilhões de dólares anuais por não investir no desenvolvimento de novos produtos.

A diferença marcante entre os parasitos do gênero *Leishmania*, e os seus hospedeiros mamíferos, no que se refere à via de síntese de purino nucleotídeos, cria oportunidades para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo os complexos Sb^V-ribonucleosídeos, candidatos muito promissores.

Desde o ano 2000, existe uma interação entre grupos de pesquisa do Instituto de Ciências Exatas / ICEX (Departamento de Química) e do Instituto de Ciências Biológicas / ICB (Departamentos de Parasitologia e Fisiologia e

Biofísica), com o objetivo de investigar e desenvolver estudos pré-clínicos de drogas com atividade anti-*Leishmania*.

Os complexos Sb^V-ribonucleosídeos foram sintetizados e caracterizados físico-quimicamente pelo grupo de Demicheli, no Departamento de Química – ICEX. O presente trabalho, realizado nos Departamentos de Parasitologia e Fisiologia e Biofísica – ICB, complementa os estudos com testes pré-clínicos para avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* desses complexos.

Inicialmente neste estudo, a atividade dos complexos Sb^V-ribonucleosídeo foi testada *in vitro*, com a cepa MCAN/BR/2002/BH400 de *L. chagasi*, devido a maior gravidade da forma clínica de leishmaniose causada por esta espécie. Futuramente, serão realizados os mesmos testes *in vitro* com a cepa IFLA/BR/1967/PH8 de *L. amazonensis*, visto o potencial do Sb^V-G para o tratamento tópico da LTA. Para complementação destes estudos, os compostos serão testados *in vivo* em animais experimentalmente infectados com ambas as cepas.

Estes estudos são de grande relevância, pois auxiliarão no esclarecimento do papel destes complexos no mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, e por outro lado, estes medicamentos poderiam apresentar possível relevância farmacológica e funcionar como potentes agentes leishmanicidas.

4. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia terapêutica *in vitro* contra *Leishmania (Leishmania) chagasi*, de quatro complexos contendo ribonucleosídeos conjugados ao antimônio pentavalente, em comparação ao antimônio pentavalente não complexado.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a citotoxicidade *in vitro* dos complexos Sb^V-ribonucleosídeo com a do antimônio pentavalente não complexado, em macrófagos murinos (BALB/c) e promastigotas de *L. chagasi*.
- Avaliar a interferência da complexação do antimônio a ribonucleosídeos, na incorporação do antimônio em macrófagos murinos.
- Avaliar a capacidade *in vitro* dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, em modular a infecção por promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* em macrófagos murinos, em comparação com antimônio pentavalente não complexado e o antimoniato de meglumina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Parasitos

Foram utilizadas promastigotas, e amastigotas obtidas de animais experimentalmente infectados, com a cepa MCAN/BR/2002/BH400 de *L. chagasi*. As amostras encontram-se mantidas em animais experimentalmente infectados e criopreservadas no criobanco de cepas de *Leishmania* do Laboratório de Biologia de *Leishmania* - Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de idade e Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, de 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG).

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, sob condições adequadas de manejo técnico, de acordo com o Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) – protocolo 13/2009.

5.3. Compostos químicos

No presente estudo, foram realizados os testes pré-clínicos *in vitro* dos quatro complexos Sb^V-ribonucleosídeos e seus respectivos ligantes (ribonucleosídeos sem conjugação prévia ao Sb^V). A atividade dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e seus ligantes, foi estudada em comparação com o hexahidróxido antimoniato de potássio ou antimoniato (KSb(OH)₆) (Fluka Chemie GmbH[®]), antimoniato de meglumina comercial (Glucantime[®]) e com o antimoniato de meglumina (AM) sintetizado no Departamento de Química do ICEx/UFMG, por Demicheli *et al*, (2003) (Figura 8).

O Glucantime[®] é comercializado no Brasil pela Aventis. De acordo com a patente francesa, surgida na década de 40, o produto (AM), pode ser preparado a partir de pentacloreto de antimônio (SbCl₅) e da N-metil-D-glucamina, antimoniato de meglumina. Recentemente, pesquisadores da UFMG obtiveram o antimoniato de meglumina (AM), a partir da N-metil-D-glucamina e do SbCl₅, usando uma nova rota de síntese, como descrito previamente por Demicheli *et al*, (2003). Este composto contém aproximadamente, 30% de antimônio (p/p).

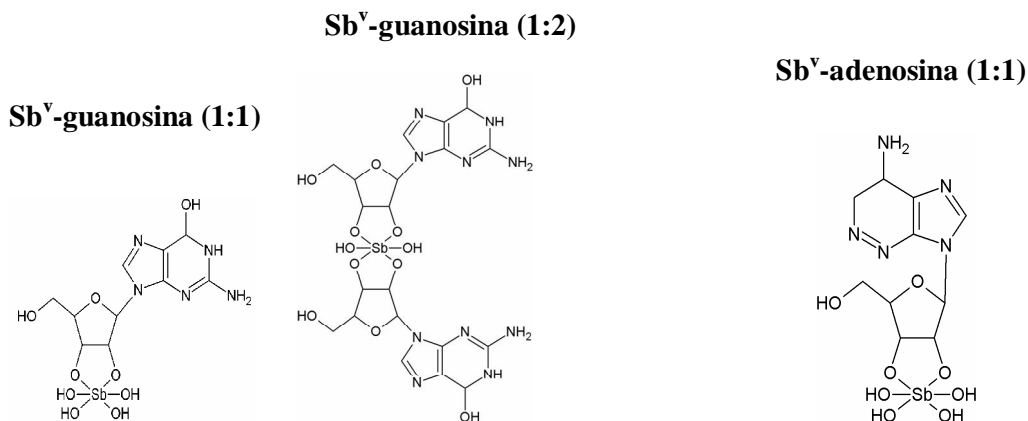
Os complexos Sb^V-Ad, Sb^V-C, Sb^V-U e Sb^V-G foram sintetizados pela reação dos ribonucleosídeos com o hexahidróxido antimoniato de potássio (KSb(OH)₆), como descrito previamente por Demicheli *et al* (2006). Os compostos Sb^V-Ad, Sb^V-C, Sb^V-U e Sb^V-G contêm 23,6%, 23,5%, 23,9% e 19% de antimônio por massa, respectivamente. Os complexos apresentam entre si, diferentes estequiometrias (proporção entre o número de átomos de antimônio e o número de moléculas de ribonucleosídeo, respectivamente), sendo que, Sb^V-C, Sb^V-Ad, Sb^V-U, apresentam estequiometria 1:1, o que indica a proporção de um átomo de antimônio por molécula de ribonucleosídeo. Os complexos Sb^V-purínicos formam nanopartículas em solução aquosa. O complexo Sb^V-G, se diferencia por formar nanopartículas em solução aquosa que se associam na forma de um hidrogel termossensível. Devido à formação do hidrogel, o composto Sb^V-G, apresenta uma mistura de complexos de estequiometrias 1:1 e 1:2, não sendo possível separar os diferentes complexos. A estrutura química dos compostos estudados, seus respectivos ligantes e drogas de referência, está apresentada na figura 8.

Pelo fato de cada complexo apresentar diferentes proporções de Sb^V em sua composição química, para o cálculo em µg/mL das concentrações dos ligantes na solução de cada um desses complexos, correspondente as concentrações de Sb^V utilizadas em cada experimento, foi usada para os complexos de estequiometria 1:1, a seguinte fórmula: Concentração do ligante na solução de complexo (µg/mL) = [Concentração de Sb^V na solução de complexo (µg/mL) X MM do ligante] / MM do Sb^V.

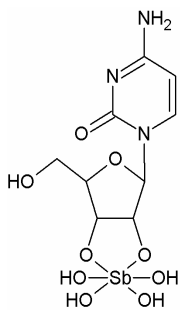
O Sb^V-G é uma mistura de complexos de estequiometria 1:1 e 1:2, e apresenta a relação molar Sb^V/G de 1: 0,75. Nesse caso, para o mesmo cálculo, a fórmula deve ser corrigida para: Concentração do ligante na solução

de complexo ($\mu\text{g/mL}$) = [Concentração de Sb^{V} na solução de complexo ($\mu\text{g/mL}$) X MM do ligante] / [MM do Sb^{V} X 0,75]. Os quadros 3 e 4 demonstram as concentrações de Sb^{V} em $\mu\text{g/mL}$ e as concentrações correspondentes dos ligantes para cada complexo.

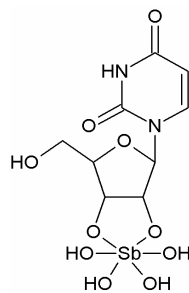
➤ **Estrutura química dos complexos**



Sb^{V} -citidina (1:1)

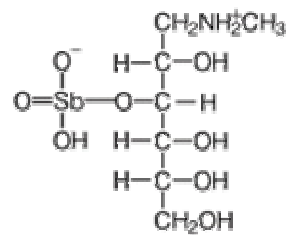
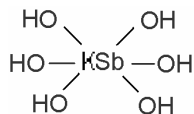


Sb^{V} -uridina (1:1)



Glucantime® e AM – ICEX/UFMG
(Antimoniato de Meglumina)

SbK ou antimoniato - ($\text{KSb}(\text{OH})_6$)
(Hexahidróxido de Antimoniato de Potássio)



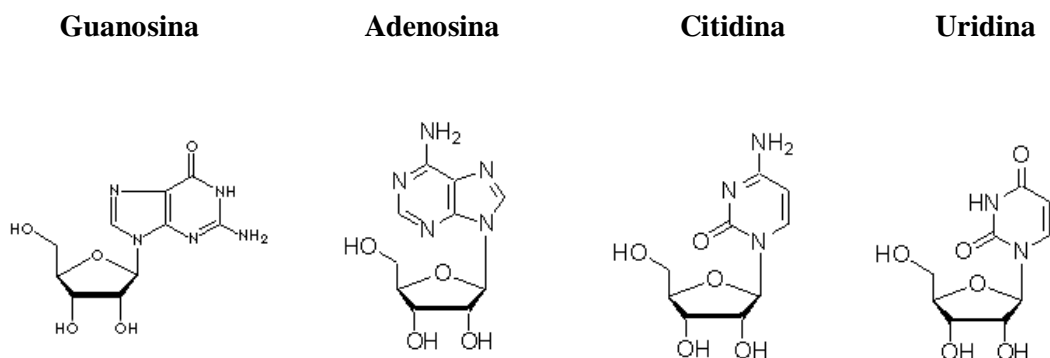


Figura 8. Estrutura química dos complexos Sb^v-ribonucleosídeo caracterizados pelo grupo de Demicheli *et al* (2006) (Sb^v-G, Sb^v-A, Sb^v-C e Sb^v-U) drogas de referência (SbK, glucontime e AM) e ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeo (guanosina, adenosina, citidina e uridina) e utilizadas no presente trabalho.

5.4. Ensaios *in vitro*

5.4.1. Cultivo e manutenção das formas promastigotas de *Leishmania*

As formas promastigotas foram obtidas *in vitro* em Minimum Essential Medium (α -MEM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (CUTILAB, Campinas, Brasil), estreptomicina e penicilina (USB Corporation, Cleveland - OH, USA), nas concentrações de 50 μ g/mL e 50 U/mL, respectivamente. O meio de cultura suplementado com SFB e antibióticos é denominado α -MEM completo. O cultivo dos parasitos em α -MEM completo foi feito a 25°C \pm 1°C, em estufa FANEM[®] – modelo 347 F.

5.4.2. Curva de crescimento dos parasitos

Para avaliar o perfil de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, 1x10⁶ promastigotas/mL foram inoculadas em meio de cultura α -MEM completo, e incubadas em estufa a 25°C \pm 1°C por 7 dias. A cada 24 horas de cultivo foram retiradas alíquotas das culturas, diluídas em solução fixadora de ISOTON (ácido cítrico 0,05M, NaCl 0,12M, formaldeído 0,5%, pH 7,2) e quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio ótico em aumento 40X. A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitos contidos em 1mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula: Número de parasitos = média dos

quatro quadrantes maiores x inverso da diluição da amostra x 10^4 . A curva foi construída graficamente utilizando o software SigmaPlot® 10.0 (USA).

5.4.3 Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos murinos (MTT)

O ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) é empregado na avaliação da proliferação e toxicidade celular. Baseia-se na capacidade das células viáveis intactas reduzirem o sal de tetrazólio por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas, succinato desidrogenase. Uma vez reduzido a cristais de formazan, o MTT torna-se insolúvel e com coloração púrpura no meio de cultura, sendo possível sua mensuração por meio de espectrofotometria com leitura a 570nm, após os cristais serem solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) (DUTTA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 1997).

- **Coleta e preparo dos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Os macrófagos foram elicitados com injeção intraperitoneal de 2mL de tioglicolato 3% (Gibco® - Grand Island, NY,USA) para indução de uma resposta inflamatória. Após três dias, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi obtido o lavado da cavidade peritoneal com injeção de 10mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) gelado e posterior recuperação. O lavado foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos (Centrifuga HERMLE, modelo 2323 K), o sobrenadante descartado e o "pellet" ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado 10% SFB + estreptomicina (50µg/mL) e penicilina (1000U/mL) (RPMI 1640 completo). As células foram quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer com o auxílio do corante vital azul de Trypan (CASCADE BIOLOGICAL™-USA) a 0,4%. Apenas as células viáveis foram consideradas. O número de células/mL da amostra foi estimado como a média aritmética de duas contagens dos quatro quadrantes X o inverso da diluição da amostra X 10^4 (fator de correção da câmara). Após quantificação, as culturas foram então, incubadas em placa de 96 poços (TPP®, SWITZERLAND), com o

volume de células ajustado para 5×10^5 macrófagos por poço em um volume final de 100µL de meio RPMI 1640 completo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa (Forma Scientific, Inc. modelo 3154 S/N 31433) com atmosfera de 5% de CO₂ por 4 horas, para aderência dos macrófagos aos poços. Após o período de incubação, as culturas foram visualizadas em microscópio invertido (OLYMPUS OPTICAL CO – contraste de fase) para observação dos macrófagos aderidos e os poços foram então lavados 3 vezes com meio RPMI 1640 previamente aquecido a 37°C para remover possíveis células não aderentes (TEMPONE *et al.*, 2004).

- **Ensaio de citotoxicidade**

Foram realizados ensaios da citotoxicidade *in vitro* dos complexos contendo antimônio, em macrófagos murinos elicitados, por meio da técnica de Mosmann (1983) modificada (MTT - macrófagos aderidos), para a avaliação da toxicidade celular.

Após as lavagens para retirada das células não aderidas e o esgotamento dos poços, os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença dos quatro complexos, antimoniato de meglumina comercial (Glucantime[®]), antimoniato de meglumina (AM) e antimoniato (KSb(OH)₆), todos em concentrações de 10, 30, 60 e 100µg/mL de Sb^V, diluídos em um volume final de 100µL de meio RPMI 1640 completo. Como controle positivo do experimento, macrófagos aderidos foram incubados na presença apenas de RPMI 1640 completo e como controle negativo, macrófagos foram expostos à solução fixadora ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5%, pH 7,2).

As culturas permaneceram expostas aos compostos durante 24, 48 e 72 horas, incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, foram adicionados aos poços 10µL da solução MTT (Sigma[®] Co - USA) a 5mg/mL (50µg/poço). As placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Co - USA.), para solubilizar os cristais de formazan gerados, e posteriormente as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, onde a densidade óptica é lida em comprimento de onda de 570nm (TEMPONE *et al.*, 2004).

O valor final da densidade ótica de cada poço foi subtraído do valor da densidade ótica dos poços contendo macrófagos em ISOTON. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes em triplicatas. Os resultados foram expressos em gráficos em porcentagem, sendo os valores do eixo y relativos ao controle, que foi considerado como 100% de infecção.

5.4.4. Concentração citotóxica *in vitro* (MTT)

A concentração citotóxica foi definida como àquela que gerou redução de 50% na absorbância nos ensaios de MTT (CC₅₀). Foi calculada por análise de regressão “Dynamic Fit Wizard”, utilizando o programa Sigma Plot 10.0[®] a partir dos dados obtidos em cada experimento.

5.4.5. Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre formas promastigotas (MTT)

O ensaio colorimétrico MTT, citado anteriormente para avaliar a viabilidade de macrófagos, é um método que também pode ser aplicado para testar a viabilidade em formas promastigotas de *Leishmania sp.* Com o mesmo princípio do ensaio MTT - macrófagos aderidos, esse ensaio é baseado na habilidade dos parasitos viáveis em reduzir o sal tetrazólio, MTT, em cristais formazan, os quais podem ser solubilizados com DMSO, gerando uma coloração púrpura, que pode ser mensurada por espectrofotometria no comprimento de onda 492nm (DUTTA, A *et al.*, 2005). No presente estudo a técnica de Mosmann (1983) modificada, foi utilizada em promastigotas de *L.chagasi*.

Como controle negativo foram utilizados parasitos na ausência dos compostos. Para a avaliação da citotoxicidade por MTT, os compostos e as drogas de referência, foram diluídos em α -MEM completo, nas concentrações de duas X 10, 30, 60 e 100 μ g/mL de Sb^V. As diluições das drogas foram então adicionadas em placas de 96 poços em um volume final de 50 μ L por poço.

A cultura de promastigotas foi centrifugada, ressuspensa em α -MEM completo, quantificada em câmara de Neubauer, sendo o volume de células ajustado para 5x10⁵ promastigotas por poço, também em um volume final de 50 μ L. Esta concentração de promastigotas foi posteriormente adicionada aos

poços contendo as drogas diluídas, totalizando um volume final de 100µL por poço.

As placas com as promastigotas foram incubadas, em estufa a 25°C ± 1°C, durante 48 e 72 horas, na presença dos compostos, das drogas de referência e na ausência de qualquer composto, como controle.

Após o período de incubação de promastigotas com as drogas, foram adicionados 10µL de MTT em cada poço, e as placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C para que o MTT agisse e, conseqüentemente, fossem formados os cristais de formazan. Como os parasitos não são células aderentes, após incubação com o MTT, as placas foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos (Centrifuga JOUAN modelo CR3 i) para que os parasitos formassem um “pellet” no fundo dos poços e assim o sobrenadante pudesse ser completamente removido sem que houvesse também a remoção de parasitos em suspensão. Após desprezado o sobrenadante, foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Co.), para solubilizar os cristais de formazan gerados, e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, onde a densidade ótica foi lida em comprimento de onda de 492nm (TEMPONE *et al.*, 2004). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes em triplicatas. Os resultados foram expressos em gráficos em termos de porcentagem, sendo os valores do eixo y relativos ao controle, que foi considerado como 100% de infecção.

5.4.6. Determinação de Sb^V intracelular em macrófagos murinos

A incorporação de Sb^V intracelular em macrófagos, foi determinada pela técnica de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (ROBERTS *et al.*, 1993). Esta técnica baseia-se na absorção de energia por átomos neutros em estado gasoso, de um elemento presente em uma amostra, quando estes são submetidos a um feixe de radiação específica gerada por uma lâmpada que irradia elétrons de Sb^V em um comprimento de onda de 217.6nm

Para este ensaio, macrófagos murinos elicitados como descrito anteriormente (item 5.4.4), foram centrifugados e lavados 3X em meio RPMI 1640, utilizando 2500rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo, quantificadas em câmara de Neubauer e o volume

foi ajustado para 1×10^6 células/mL. As células em um volume final de 1mL, foram mantidas em tubos de polipropileno, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂, durante 72 horas, na presença de 10µg/mL de Sb^v, calculado para cada composto testado. Após a exposição, as suspensões de células foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 2500rpm por 10 min e lavadas 2X em tampão HEPES (NaCl 0,15 M, HEPES 20 mM, pH 7,2) suplementado com glicose (40mM). Os “pellets” resultantes foram digeridos em 100µL ácido nítrico (HNO₃) 65% (Merk®- GERMANY) “overnight” em temperatura ambiente.

A quantidade de antimônio incorporada nos macrófagos foi determinada por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite, como descrito previamente (ROBERTS *et al.*, 1993). Os “pellets” digeridos foram diluídos 100 vezes em HNO₃ 0,2% e as amostras foram submetidas a espectroscopia de absorção atômica, usando um espectrômetro equipado com forno de grafite e auto amostrador (AAAnalyst 600, Perkin Elmer® - Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG). As dosagens de antimônio foram realizadas utilizando uma curva de calibração, com Antimony 1000 PPM A/S Standard II (PerkinElmer Pure – Atomic Spectroscopy Standard) estabelecida com um padrão de antimônio (ROBERTS *et al.*, 1993). Em espectroscopia de absorção atômica (AAS), a curva de calibração é utilizada para determinar a concentração do anilato em uma amostra desconhecida, a partir de soluções padrão de concentração conhecida.

Os resultados foram obtidos utilizando os valores da leitura dos compostos subtraídos dos valores dos controles sem Sb^v. Nesse trabalho foi realizado apenas um experimento que confirmou os resultados já obtidos anteriormente pelo nosso grupo (dados não mostrados).

5.4.7. Ensaios de toxicidade dos compostos sobre formas amastigotas

Foram realizados ensaios da toxicidade *in vitro* dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos sobre as formas amastigotas de *L. chagasi*, internalizadas em macrófagos do peritônio de camundongos.

Para a realização deste ensaio, os macrófagos murinos obtidos conforme descrito no item 5.4.3, foram incubados em placas de 24 poços (TPP®, SWITZERLAND), contendo previamente em cada poço, uma lamínula estéril, em formato circular, com 13mm de diâmetro, na qual os macrófagos

aderem. A população de células incubadas, foi ajustada para 5×10^5 macrófagos por poço, em um volume final de 1 mL.

As células foram incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ durante 4 horas, para que ocorresse a aderência dos macrófagos às lamínulas. Após o período de incubação, com os macrófagos já aderidos, foi feita a infecção destes com *L. chagasi*.

Foram realizados dois diferentes experimentos de infecção de macrófagos com *L. chagasi*, com promastigotas de cultura e amastigotas obtidas do baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados.

- **Infecção de macrófagos com promastigotas**

Culturas de promastigotas de *L. chagasi* em fase estacionária de crescimento (cultura rica em formas metacíclicas – infectantes), foram centrifugadas 3 vezes em meio RPMI sem soro a 3000rpm por 10 minutos. O “pellet” foi ressuspendido em meio RPMI 1640 completo, as promastigotas quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 5×10^6 células em 100µL, a serem incubadas por poço, o que corresponde a uma proporção de 10 promastigotas por macrófago. Os parasitos foram então, adicionados nesta concentração, ao volume de cada poço com macrófagos aderidos às lamínulas.

A placa foi incubada durante 4 horas, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, para que houvesse a infecção dos macrófagos. Após este período foram feitas 3 lavagens dos poços com meio RPMI 1640 completo, aquecido a 37°C, para remover promastigotas não fagocitadas e células não aderidas (ESLAMI e TANNER, 1994).

- **Infecção de macrófagos com amastigotas de tecidos de animais experimentalmente infectados**

Hamsters com 60 dias de infecção por *L.chagasi* foram eutanasiados com sobredose de Tiopental sódico (THIOPENTAX[®], Cristália), de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária. O baço dos animais foi seccionado, removido e posteriormente triturado em “tissue grinder” com PBS de maneira asséptica. A suspensão obtida foi filtrada para um tubo falcon

com o auxílio de uma tela de nylon fina. A solução foi centrifugada a 1200rpm a 4°C, durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e após homogeneizar o “pellet”, adicionou-se 10mL de solução de lise de hemácias (Tris/HCL 17mM e cloreto de amônia 144mM – pH 7.2) e o tubo foi mantido por 10 minutos em banho maria a 37°C. Posteriormente o tubo foi novamente centrifugado a 1200rpm, 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspendido em 10mL de meio RPMI 1640 completo gelado. As amastigotas foram quantificadas por microscopia óptica em câmara de Neubauer e tiveram seu volume ajustado para uma população de 5×10^6 amastigotas em 100 μ L, a serem incubadas por poço, o que corresponde a uma proporção de 10 amastigotas por macrófago.

A placa foi incubada durante 2 horas, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, para que houvesse infecção. Após este período foram feitas 3 lavagens dos poços com meio RPMI 1640 completo, previamente aquecido a 37°C, para remover células não aderidas e amastigotas não fagocitadas (TEMPONE *et al.*, 2004).

- **Exposição dos macrófagos infectados com promastigotas e amastigotas aos complexos contendo antimônio pentavalente**

Os complexos foram previamente diluídos em meio de cultura RPMI 1640 completo, em concentrações de 5, 10, 20, 30, 50, 60 e 100 μ g/mL de Sb^V respeitando os valores de citotoxicidade de cada droga, obtidos no ensaio de MTT em macrófagos. Após a terceira lavagem e o esgotamento completo dos poços que continham as lamínulas, os compostos nas diferentes concentrações, foram adicionados sobre as lamínulas com macrófagos infectados com promastigotas e amastigotas, em um volume final de 1mL por poço. Macrófagos não infectados também foram expostos as mesmas concentrações das drogas.

Os macrófagos infectados com amastigotas ou com promastigotas, foram incubados em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas na presença dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, Glucantime[®], antimoniato de meglumina (AM), antimoniato de potássio (KSb(OH)₆) e na presença apenas de RPMI 1640 completo como parâmetro de controle. Após os respectivos períodos de incubação, as lamínulas retiradas dos poços em

cada tempo, foram coradas por Panótico rápido (Laborclin®) e montadas em lâminas permanentes com o auxílio do Bálsamo do Canadá (Vetec® - USA). As lâminas foram analisadas em microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X).

Foi feita a contagem de 300 macrófagos por lamínula da triplicata, especificando-se o número de macrófagos infectados e número de macrófagos não infectados. Desta forma, foram estabelecidas as taxas de infecção dos macrófagos em cada lamínula da triplicata e, por fim, obteve-se a média da taxa de infecção entre as triplicatas. As médias dos percentuais de infecção de macrófagos, estabelecidas na presença de cada um dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência, foram comparadas com a taxa de infecção média dos controles sem droga. Os resultados foram expressos em gráficos, em porcentagem, sendo os valores do eixo y relativos ao controle, que foi considerado como 100% de infecção.

5.4.8. Índice citotóxico *in vitro*

O índice citotóxico foi definido como àquele que gerou redução de 50% na taxa de infecção dos macrófagos “in vitro” (IC₅₀). Foi calculado por análise de regressão “Dynamic Fit Wizard”, utilizando o programa Sigma Plot 10.0® a partir dos dados obtidos em cada experimento.

5.4.9. Índice terapêutico *in vitro*

O índice terapêutico (IT) foi calculado pela razão CC₅₀ / IC₅₀, nos casos em que a droga apresentou IC₅₀.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos ensaios utilizando os complexos Sb^V-ribonucleosídeos, foram estatisticamente comparados àqueles obtidos com o grupo controle sem tratamento, e foram analisados em comparação com o grupo tratado com as drogas de referência (antimoniato de potássio, Glucantime[®] e antimoniato de meglumina - AM). Os resultados foram expressos como média de pelo menos 2 experimentos independentes em triplicata, acompanhada de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. No caso dos experimentos piloto para padronização, os resultados foram expressos em gráficos com um experimento em triplicata, representativo de três. Todos os dados foram considerados paramétricos pelo método de “Kolmogorov and Smirnov”. As análises estatísticas dos resultados obtidos em cada experimento foram realizadas utilizando o programa estatístico Instat[®], por meio da análise de variância “One Way Anova”, seguida pelo pós teste de Tukey-Kramer. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados indicativos de significância para a análise.

A CC₅₀ e a IC₅₀ foram obtidas por análise de regressão “Dynamic Fit Wizard” utilizando o programa Sigma Plot[®] 10.0.

7. RESULTADOS

7.1. Curva de Crescimento das promastigotas de *L.chagasi* (BH400)

A curva de crescimento das culturas de promastigotas de *L.chagasi*, está representada no gráfico 1. Os parasitos permaneceram em fase logarítmica de crescimento até o sexto dia de incubação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ e em fase estacionária de crescimento do sétimo ao décimo dia de incubação.

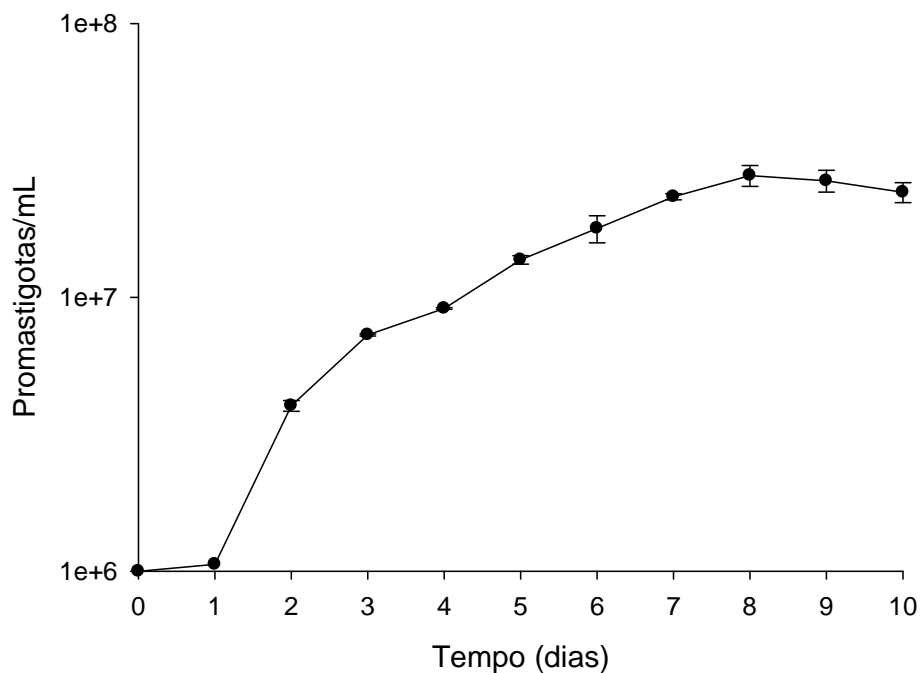


Gráfico 1. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L.chagasi* a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$, em α -MEM completo com 10% SFB. Símbolos em barras representam a média \pm DP de dois experimentos separados feitos em duplicata.

Em meio de cultura “in vitro”, as formas promastigotas diferenciam em formas metacíclicas infectantes, repetindo o processo de metaciclogênese que acontece no hospedeiro invertebrado. Para o experimento de MTT com promastigotas, utilizamos parasitos em fase logarítmica de crescimento (terceiro ao quarto dia de incubação). As culturas em fase estacionária foram utilizadas nos experimentos de infecção de macrófagos com promastigotas (sétimo ao oitavo dia de incubação).

7.2. Ensaio de citotoxicidade (MTT) dos compostos antimoniais em promastigotas

Os gráficos 2 A e B mostram que o Glucantime, o antimoniato de meglumina (AM), o antimoniato livre (SbK) e os complexos Sb^V-ribonucleosídeos não são tóxicos para formas promastigotas de *Leishmania*.

Na concentração de 10µg de Sb^V/mL nos tempos de exposição de 48 e 72 horas, o Sb^V-Ad estimula o crescimento das formas promastigotas ($p < 0,01$). O Sb^V-G promove o crescimento das promastigotas nas concentrações de 30 e 60µg de Sb/mL, nos tempos de 48 horas ($p < 0,01$) e 72 horas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente). Os complexos Sb^V-pirimidínicos não estimulam de forma significativa o crescimento das promastigotas ($p > 0,05$).

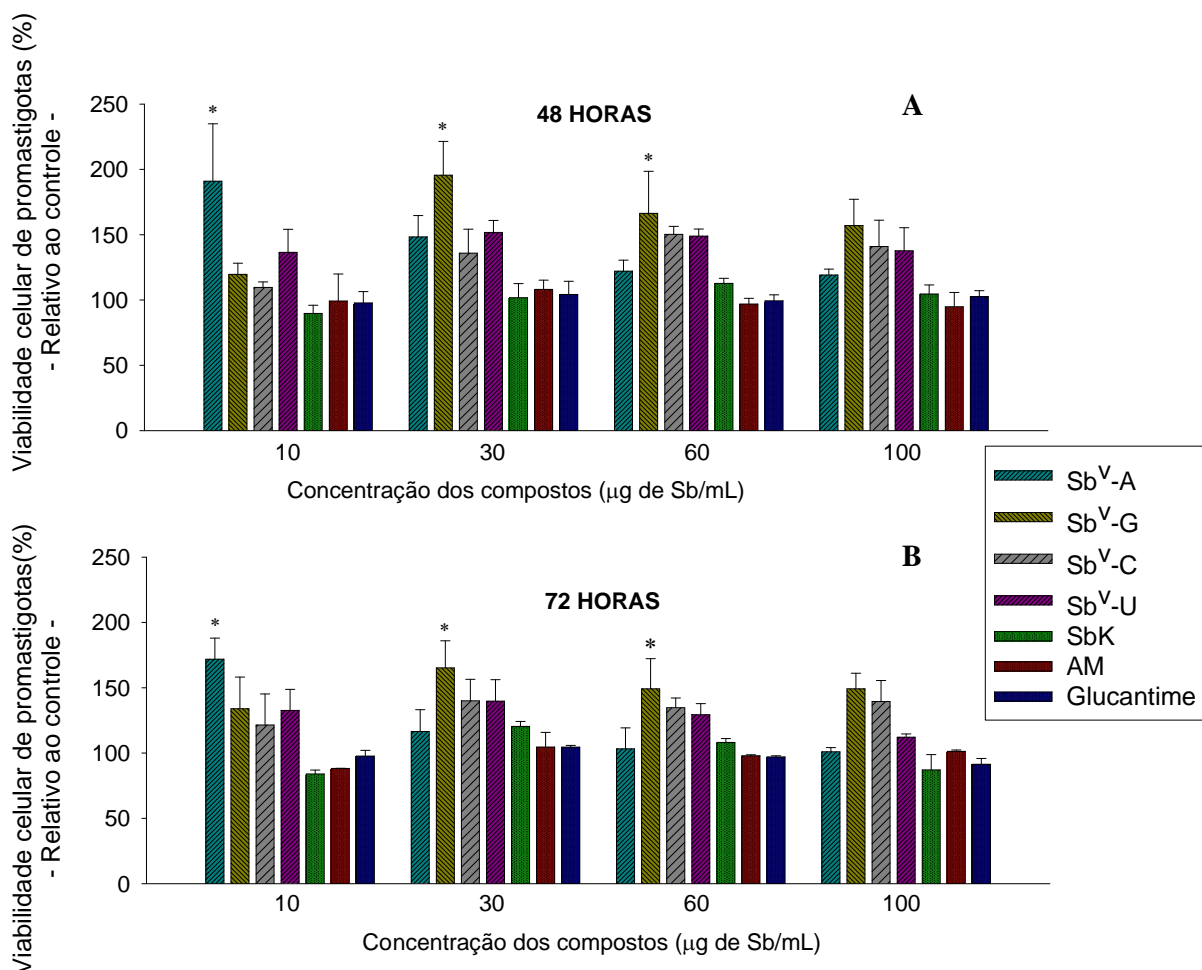


Gráfico.2-A. Ação dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência sobre formas promastigotas de *L. chagasi* nas concentrações de 10, 30, 60 e 100µg de Sb/mL, no tempo de exposição de 48 horas. B- no tempo de exposição de 72 horas. As barras representam a média ± DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Astériscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os compostos em relação ao controle, que é considerado como 100% de promastigotas vivas ($p < 0,05$).

7.2.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT) dos compostos antimoniais e ligantes em macrófagos

Os gráficos 3 A, B e C mostram a citotoxicidade dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos avaliada através do ensaio colorimétrico MTT, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, em relação ao controle. O Sb^V-G é o único a mostrar citotoxicidade no tempo de exposição de 24 horas nas concentrações de 60 e 100µg/mL ($p < 0,01$) e nos tempos de 48 e 72 horas mostra citotoxicidade nas concentração de 30, 60 e 100µg/mL ($p < 0,001$). Nessas concentrações, o Sb^V-G também apresentou maior citotoxicidade quando comparada aos demais compostos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência ($p < 0,001$).

Nas concentrações de 60µg/mL e 100µg/mL, em 48 e 72 horas, o antimoniato livre (SbK) foi tóxico para macrófagos ($p < 0,001$). Em 72 horas os complexos Sb^V-Ad e Sb^V-C mostraram citotoxicidade nas concentrações de 60µg/mL ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) e 100µg/mL ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) Nestas concentrações, a citotoxicidade de Sb^V-C foi estatisticamente menor que a de SbK livre ($p < 0,01$) e a citotoxicidade de Sb^V-A e Sb^V-G não foi estatisticamente diferente do SbK livre ($p > 0,05$). O complexo Sb^V-U, o Glucantime e o AM não foram citotóxicos para os macrófagos em nenhuma das concentrações e tempos analisados ($p > 0,05$). Na concentração de 100µg/mL em 72 horas de exposição, a citotoxicidade aparece de acordo com a seguinte ordem: Sb^V-G > SbK > Sb^V-A > Sb^V-C > Sb^V-U.

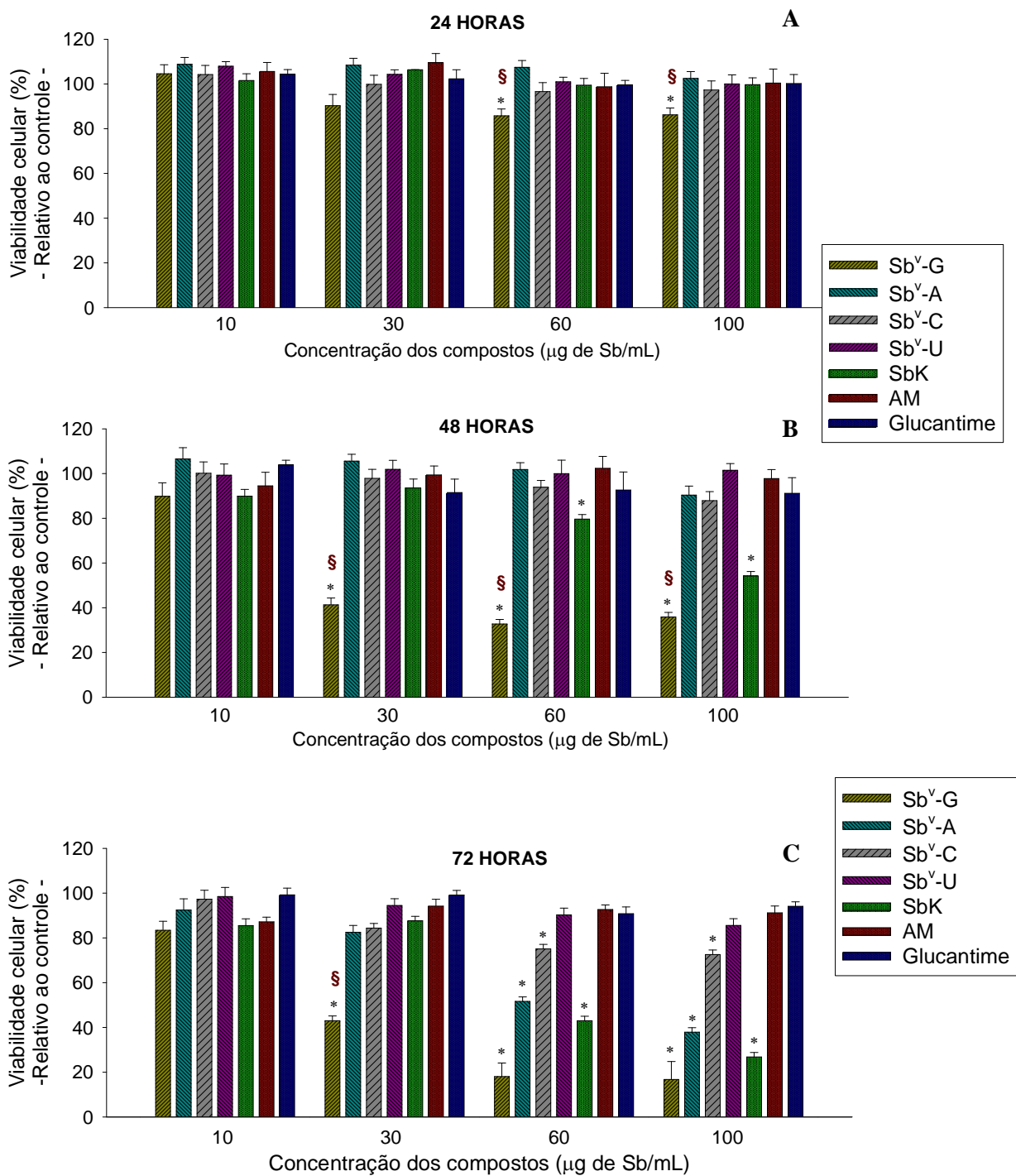


Gráfico.3-A. Ensaios de citotoxicidade (MTT) dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos sobre macrófagos murinos, nas concentrações de 10, 30, 60 e 100µg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 24 horas. **B-** no tempo de exposição de 48 horas e **C-** no tempo de exposição e 72 horas. As barras representam a média ± DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas da citotoxicidade entre os compostos em relação ao controle, que é considerado como 100% de macrófagos viáveis. Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G é mais tóxico que todos os demais compostos do grupo (p<0,05).

Os gráficos 3.1 A, B e C mostram a citotoxicidade dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos (guanosina, adenosina, citidina e uridina)

comparada a citotoxicidade do SbK livre nos tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Para o cálculo em $\mu\text{g/mL}$ das concentrações dos ligantes na solução de cada complexo, correspondente as concentrações de 10, 30, 60 e $100\mu\text{g}$ de $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{mL}$, foi usada a fórmula descrita no item 5.3 de Material e Métodos. O quadro 3, mostra a concentração dos ligantes na solução de cada complexo, correspondente a cada concentração em μg de $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{mL}$, que utilizamos para os experimentos de citotoxicidade (MTT) em macrófagos:

	% de Sb^{V}	$[\text{Sb}^{\text{V}}] \mu\text{g/mL}$	[ligantes] $\mu\text{g/mL}$
$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$	19%	10	17,41
		30	52,28
		60	104,47
		100	174,12
$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-A}$	23,6%	10	21,9
		30	65,71
		60	131,43
		100	219,05
$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$	23,5%	10	19,94
		30	59,81
		60	119,62
		100	199,36
$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$	23,9%	10	20,2
		30	60,05
		60	120,1
		100	200,16

Quadro 3. Porcentagem de Sb^{V} na estrutura de cada um dos compostos Sb^{V} -ribonucleosídeo, concentração dos compostos em μg de $\text{Sb}^{\text{V}}/\text{mL}$ utilizada nos ensaios de citotoxicidade e concentração correspondente dos ligantes de cada composto.

Devido às diferenças entre os percentuais de Sb^{V} e ligantes em cada composto, para facilitar o entendimento dos gráficos, por ser um valor fixo plotamos no eixo y a concentração de Sb^{V} em $\mu\text{g/mL}$, que é referente àquela de ligante na solução do complexo, como mostrado no quadro 3.

Em 24 horas, apenas a guanosina, ligante de Sb^V-G apresentou citotoxicidade para macrófagos nas concentrações de 60µg/mL e 100µg/mL ($p < 0,001$), enquanto SbK e os demais ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos não foram citotóxicos ($p > 0,05$). A citotoxicidade da guanosina foi estatisticamente maior com relação ao Sbk livre e aos demais ligantes nas concentrações de 60µg/mL e 100µg/mL ($p < 0,001$).

Em 48 horas de exposição, a citotoxicidade da guanosina se iguala a do Sbk livre na concentração de 60µg/mL ($p > 0,05$), no entanto, em 100µg/mL a citotoxicidade do Sbk livre é maior quando comparada a guanosina e aos demais ligantes ($p < 0,01$).

Em 72 horas de exposição, o Sbk livre é mais tóxico que todos os ligantes ($p < 0,001$). Os ligantes adenosina, citidina e uridina não foram citotóxicas em nenhuma das concentrações e tempos testados ($p > 0,05$) e não houve diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Em todos os tempos de exposição, nas concentrações de 60µg/mL e 100µg/mL, a guanosina é mais tóxica que adenosina, citidina e uridina. Na concentração de 100µg/mL em 72 horas de exposição, a citotoxicidade aparece de acordo com a seguinte ordem: Sbk > Guanosina > Citidina > Uridina > Adenosina.

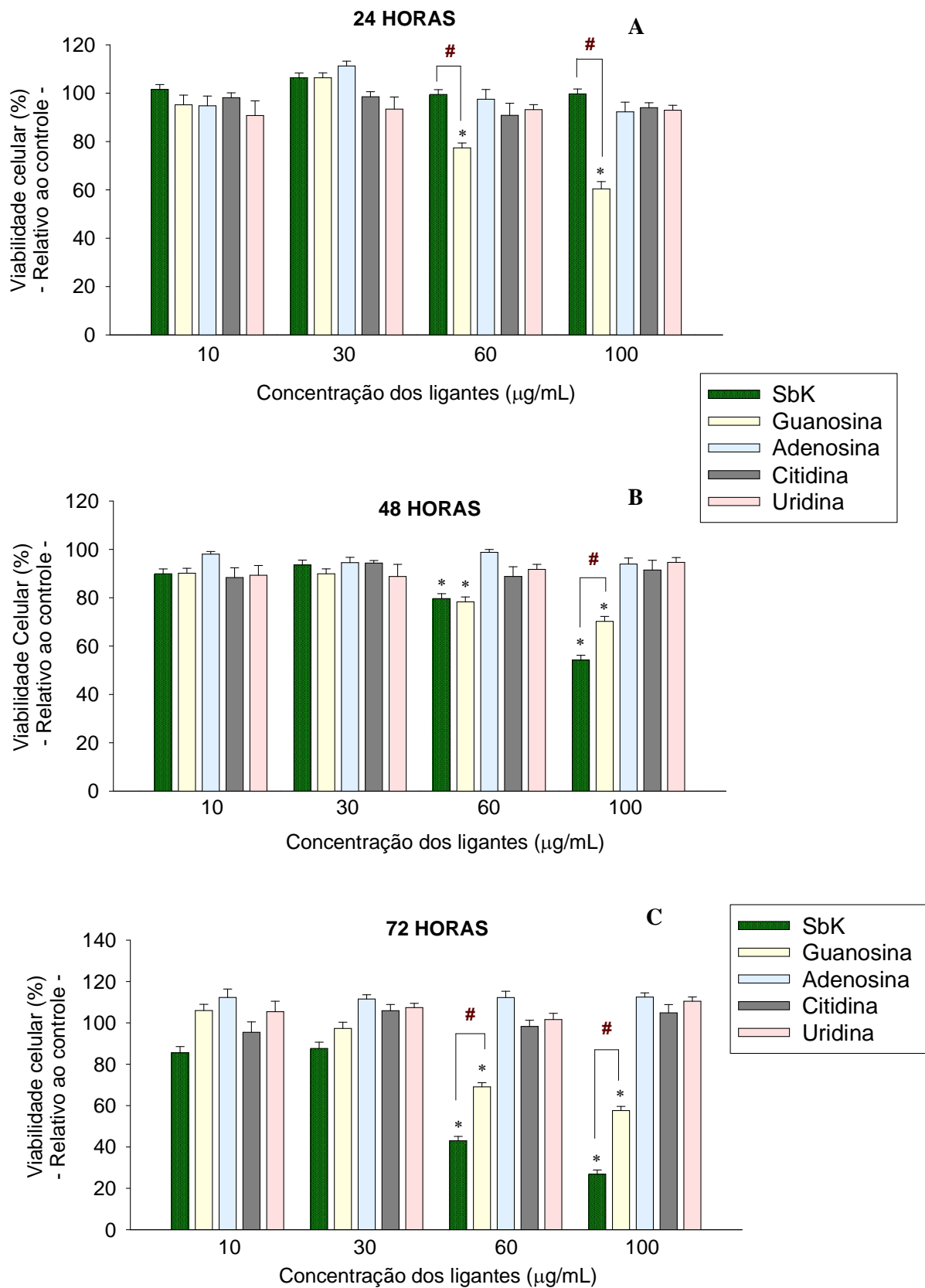


Gráfico.3.1- **A.**Citotoxicidade (MTT) dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos sobre macrófagos murinos, nas concentrações referentes a 10, 30, 60 e 100µg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 24 horas. **B.** No tempo de

exposição de 48 horas. **C-** No tempo de exposição de 72 horas. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas da citotoxicidade dos ligantes com relação ao controle, que é considerado como 100% de macrófagos viáveis / Símbolos em vermelho # indicam que a citotoxicidade de SbK é estatisticamente diferente que a da Guanosina ($p < 0,05$).

7.3. Incorporação de Sb^V em macrófagos

O gráfico 4 mostra a incorporação de Sb^V em macrófagos expostos aos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, antimoniato livre (SbK) e Glucantime, por 72 horas na concentração de 10 μ g/mL de Sb^V calculado para cada um dos compostos. O Sb^V-G foi o único dos compostos que aumentou a incorporação de Sb^V por macrófagos em níveis significativos em comparação ao controle (macrófagos na ausência de Sb) ($p < 0,001$). Macrófagos expostos ao Sb^V-G, também apresentam maior incorporação de Sb^V quando comparados a macrófagos expostos aos demais complexos Sb^V-ribonucleosídeos, SbK e Glucantime ($p < 0,001$).

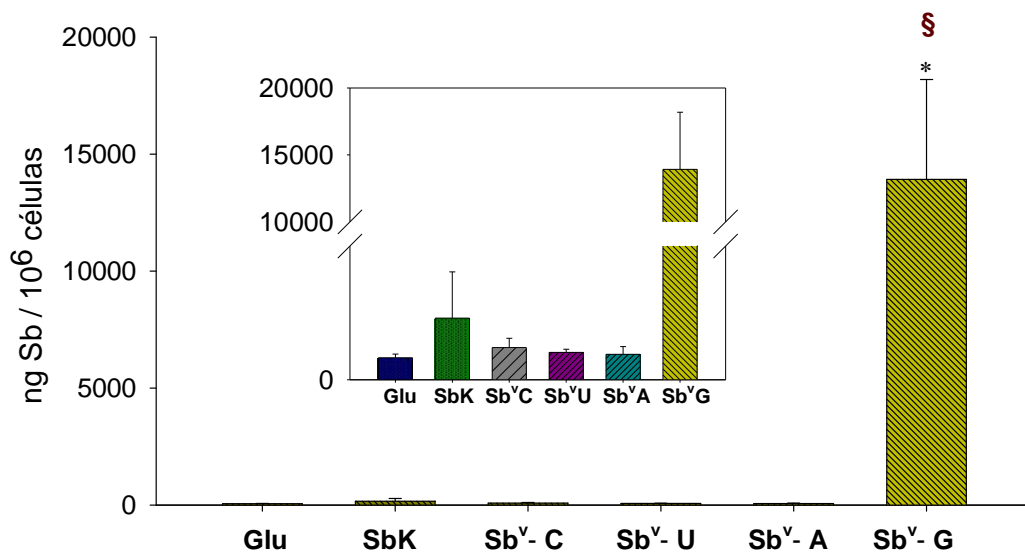


Gráfico 4. Ensaio representativo da incorporação de Sb^V em macrófagos expostos por 72 horas a 10 μ g/mL de Sb^V calculado para cada um dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos, em comparação com o controle sem Sb^V, antimoniato livre (SbK) e Glucantime. As barras representam a média \pm DP de um experimento feito em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na incorporação de Sb^V entre o composto o Sb^VG e o controle. Símbolo em vermelho § indica diferenças estatisticamente significativas entre a incorporação do Sb^V G e a dos demais complexos Sb^V-ribonucleosídeos, SbK e Glucantime ($p < 0,001$).

7.4. Padronização dos experimentos de atividade anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos em macrófagos infectados com promastigotas e amastigotas de *L.chagasi*

Para avaliar a ação anti-amastigota dos compostos Sb^V-ribonucleosídeos sobre *L.chagasi*, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram experimentalmente infectados com promastigotas e com amastigotas, em um projeto piloto, para se estabelecer condições experimentais ótimas para a realização do estudo. Foram realizados ensaios para se definir: o número de macrófagos por poço, a razão amastigota / macrófago, o melhor tempo de infecção (dados não mostrados), o tempo ideal para a ação anti-amastigota dos compostos e as concentrações dos mesmos em µg/mL de Sb^V, respeitando os limites de citotoxicidade de cada droga, segundo os resultados dos ensaios de MTT.

Foram utilizadas as concentrações de 2×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 macrófagos por poço, sendo a concentração de 5×10^5 , aquela em que as células apresentaram melhor distribuição nas lamínulas circulares (dados não mostrados). Quanto ao número de parasitos por macrófago, foi utilizado como teste as proporções de 5, 10 e 20 parasitos por macrófago para a infecção com amastigotas e com promastigotas. Foi determinado que o número de parasitos por macrófagos deveria ser o mesmo para a infecção com ambas as formas evolutivas, para se obtivesse um parâmetro de comparação da ação dos fármacos entre os diferentes experimentos de infecção. A proporção de 10 parasitos por macrófago representou tanto para promastigotas quanto para amastigotas, uma infecção considerada ideal para a avaliação da ação dos fármacos (dados não mostrados).

O tempo de infecção para promastigotas e amastigotas foi padronizado expondo-se os macrófagos aos parasitos de 2, 4 e 6 horas. Em duas horas de exposição, as amastigotas foram internalizadas atingindo uma taxa média de infecção de $80 \pm 5\%$ dos macrófagos, enquanto promastigotas necessitaram de quatro horas para infectar $70 \pm 3\%$ dos macrófagos, no entanto, entre quatro e seis horas de exposição às promastigotas, não houve diferença na taxa de infecção (dados não mostrados). Portanto, o tempo escolhido para a infecção de macrófagos com amastigotas foi de 2 horas e de 4 horas para promastigotas.

Macrófagos infectados com promastigotas e com amastigotas foram expostos as concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 100µg/mL de Sb^v calculado para cada um dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos, para estabelecermos as concentrações ideais para evidenciar a ação anti-amastigota dos compostos. Avaliamos ainda, o efeito destes compostos sobre macrófagos infectados em comparação aos macrófagos não infectados, expondo-os as mesmas concentrações de Sb^v calculada para cada um dos compostos. Observamos que na presença de todos os complexos, a morfologia celular foi alterada na concentração de 40µg/mL de Sb^v e houve ruptura de macrófagos nas concentrações de 60 e 100µg/mL de Sb^v tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas (dados não mostrados). Desta forma, foram determinadas as concentrações de 5, 10, 20 e 30µg/mL de Sb^v para todos experimentos de infecção de macrófagos.

Para o cálculo em µg/mL das concentrações dos ligantes na solução de cada complexo, correspondente as concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^v/mL, foram usadas as mesmas fórmulas anteriormente descritas no item 5.3 de Material e Métodos, para os complexos Sb^v-nucleosídeo de estequiometria 1:1, e para o Sb^v-G de estequiometria 1: 0,75

O quadro 4, mostra a concentração em µg/mL dos ligantes na solução de cada complexo, correspondente a cada concentração em µg de Sb^v /mL que utilizamos para os experimentos de atividade anti-amastigota:

	% de Sb ^v	[Sb ^v] µg/mL	[ligantes] µg/mL
Sb^v-G	19%	5	8,71
		10	17,41
		20	34,82
		30	52,28
Sb^v-A	23,6%	5	10,95
		10	21,9
		20	43,81
		30	65,71
Sb^v-C	23,5%	5	9,97
		10	19,94
		20	39,87
		30	59,81
Sb^v-U	23,9%	5	10
		10	20,02
		20	40,03
		30	60,05

Quadro 4. Porcentagem de Sb^v na estrutura de cada um dos compostos Sb^v-ribonucleosídeo, concentração dos compostos em µg de Sb^v/mL utilizada nos ensaios de atividade anti-amastigota e concentração correspondente dos ligantes de cada composto.

Devido às diferenças entre os percentuais de Sb^v e ligantes em cada composto, para facilitar o entendimento dos gráficos, por ser um valor fixo plotamos no eixo X a concentração de Sb^v em µg/mL, que é referente àquela de ligante na solução do complexo, como mostrado no quadro 4.

Para determinarmos o tempo ideal de exposição aos compostos, macrófagos infectados com ambas as formas do parasito, foram expostos aos complexos Sb^v-ribonucleosídeos durante 24, 48 e 72 horas, nas concentrações de 5, 10 20 e 30µg/mL de Sb^v, e nas concentrações equivalentes dos ligantes de cada complexo (Quadro 4), respeitando os limites de citotoxicidade dos fármacos para este ensaio conforme definido anteriormente. Os ensaios para padronização do tempo de exposição ideal aos compostos, foram mostrados nos gráficos desse item como um experimento em triplicata, representativo de três.

Os resultados em relação ao tempo ideal de exposição dos macrófagos infectados com promastigotas aos complexos de Sb^V e aos ligantes, são mostrados nos gráficos 5 A, B e C e 5.1 A, B e C, respectivamente. Os resultados em relação ao tempo ideal de exposição dos macrófagos infectados com amastigotas aos complexos de Sb^V e aos ligantes, são mostrados nos gráficos 6 A, B e C e 6.1 A, B e C, respectivamente.

Em macrófagos infectados com promastigotas, o complexo Sb^V-G no tempo de 24 horas, na concentração de 30µg/mL de Sb^V, é o único capaz de reduzir significativamente a taxa de infecção de macrófagos, em comparação ao controle ($p < 0,001$) (Gráfico 5A). Em 48 horas, o Sb^V-G inibe a taxa de infecção de macrófagos nas concentrações de 10µg/mL ($p < 0,01$), 20µg/mL e 30µg/mL ($p < 0,001$) e os demais complexos Sb^V-ribonucleosídeos permanecem sem ação anti-amastigota significativa ($p > 0,05$) (Gráfico 5B). Em 72 horas, o Sb^V-G mostra inibição significativa da taxa de infecção de macrófagos em comparação com o controle, em todas as concentrações do fármaco ($p < 0,001$) (Gráfico 5C).

Em todos os tempos e concentrações testadas, em que o complexo Sb^V-G mostrou atividade anti-amastigota, sua ação é estatisticamente significativa quando comparada a dos demais complexos e drogas de referência ($p < 0,001$) – símbolo em vermelho mostrado em destaque em todos os gráficos.

Em 72 horas de exposição, o SbK mostrou atividade anti-amastigota nas concentrações de 20 e 30µg/mL ($p < 0,05$), e o AM e Glucantime na concentração de 30µg/mL ($p < 0,05$). Em 72 horas, nas concentrações de 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL, o complexo Sb^V-Ad inibe a taxa de infecção em comparação ao controle ($p < 0,05$), mas não apresenta diferença estatisticamente significativa comparada aos demais complexos [Sb^V-C, Sb^V-U] e drogas de referência nas mesmas concentrações ($p > 0,05$).

Os complexos Sb^V-C, Sb^V-U mostram atividade anti-amastigota em 72 horas, na concentração de 30µg de Sb^V/mL ($p < 0,05$), mas não há diferença significativa entre a ação de Sb^V-A, Sb^V-C e Sb^V-U e as drogas de referência ($p > 0,05$). A ação anti-amastigota dos complexos no geral, segue a seguinte ordem: Sb^V-G > SbK > Sb^V-A > Sb^V-C > Sb^V-U.

Os gráficos 5.1 A, B e C, mostram a ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos em macrófagos infectados com

promastigotas, comparado ao controle e ao SbK livre. Todos os ligantes são inativos contra o parasito, em todas as concentrações testadas. Observa-se no gráfico 5.1C, que o SbK livre, nas concentrações de 20µg/mL e 30 µg/mL no tempo de 72 horas, tem ação anti-amastigota significativa com relação ao controle ($p<0,05$) e em comparação a todos os ligantes ($p<0,001$ - símbolo em vermelho mostrado em destaque em todos os gráficos).

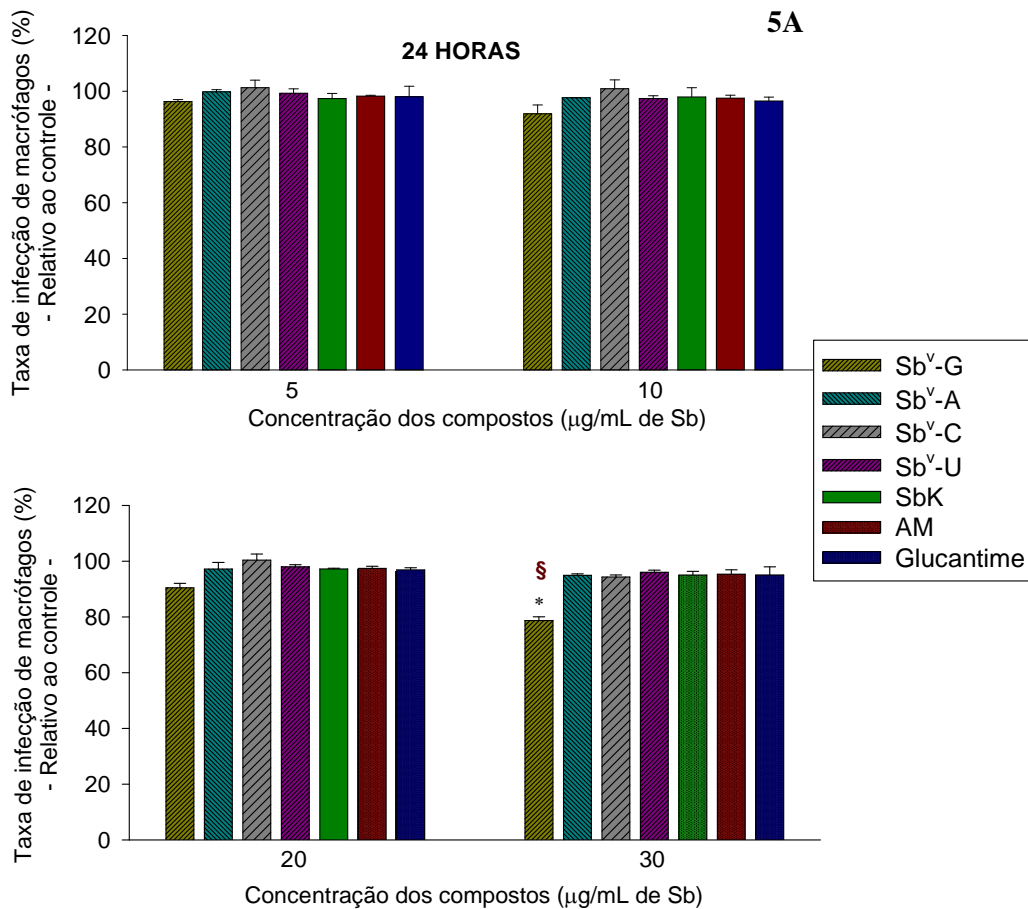


Gráfico 5-A. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolo em vermelho § indica que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo ($p<0,05$).

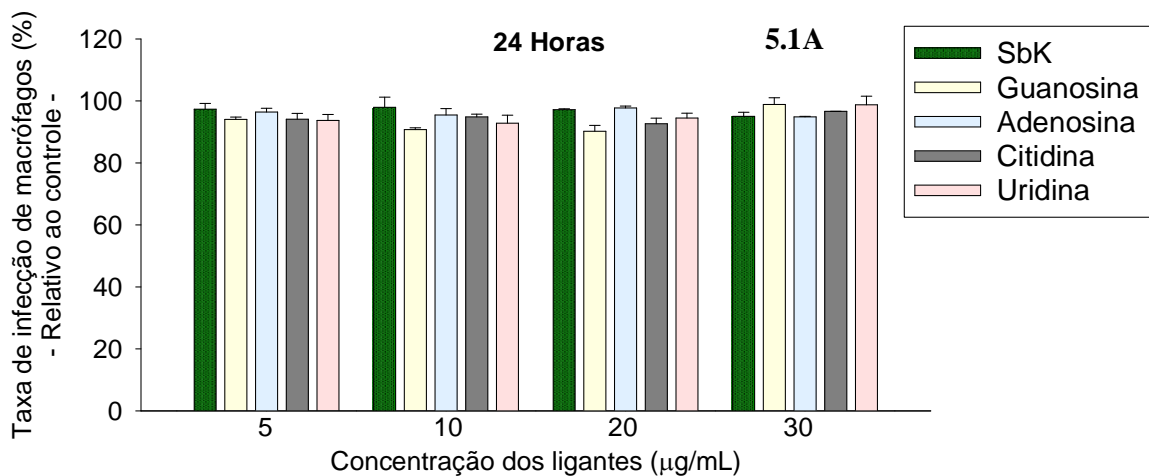


Gráfico 5.1-A. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30 Sb^v/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção.

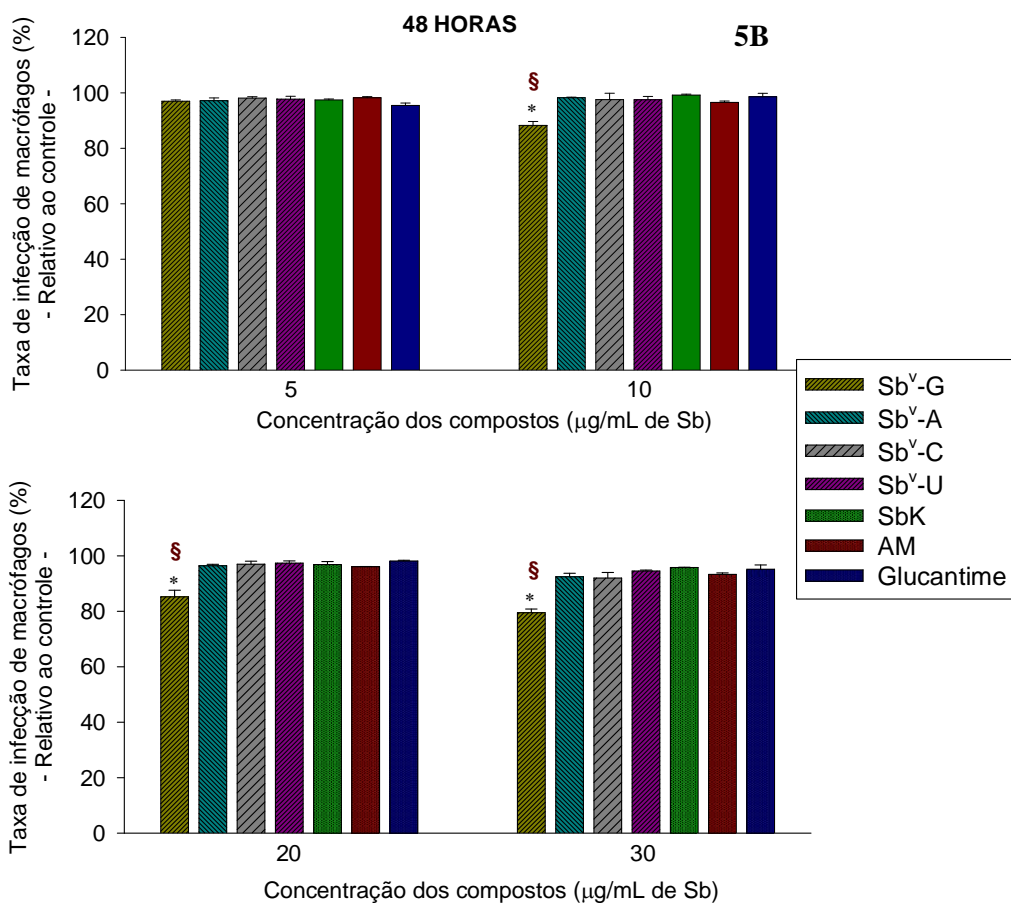


Gráfico 5-B. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 µg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolo em vermelho § indica que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,05).

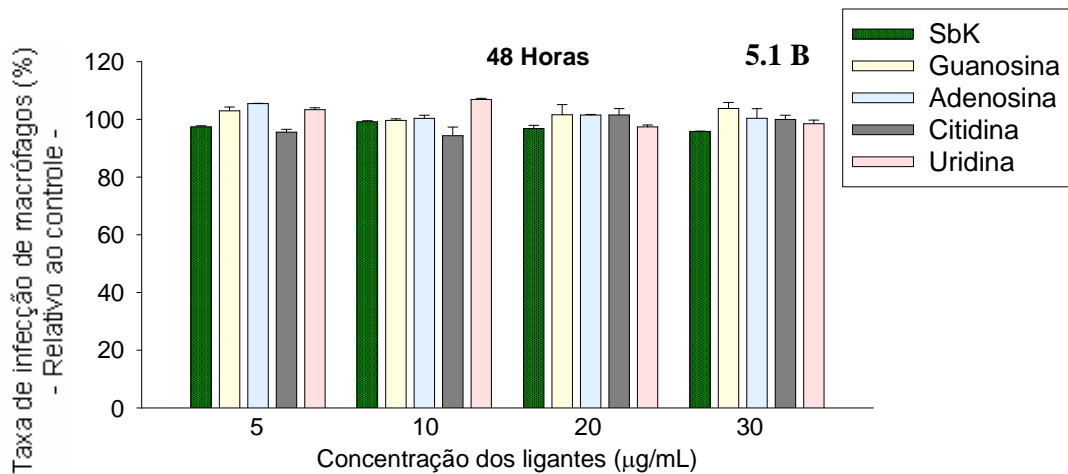


Gráfico 5.1-B. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30µg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção.

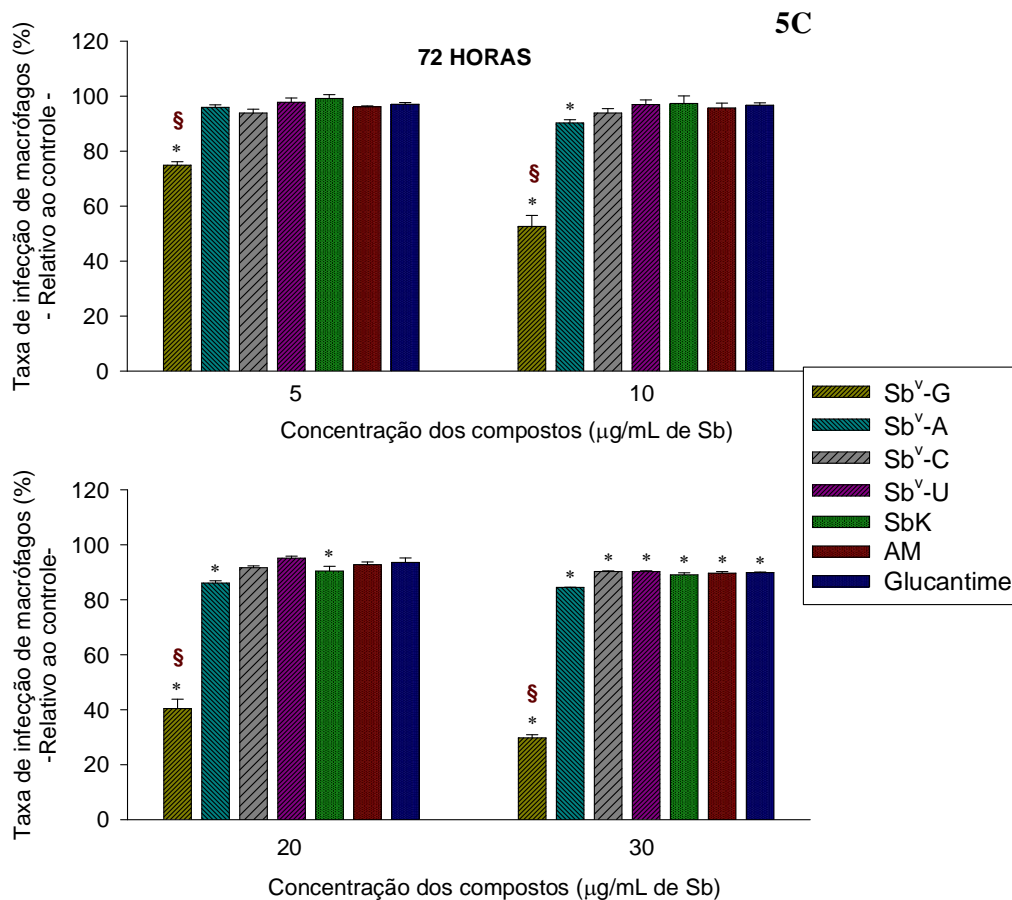


Gráfico 5-C. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo (p<0,001).

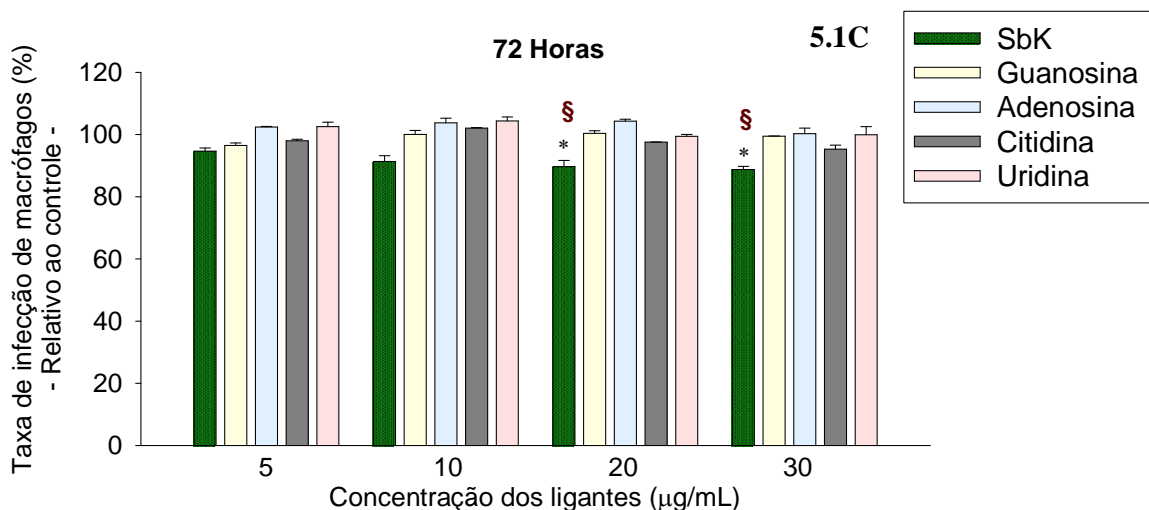


Gráfico 5.1-C. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30 μg/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com promastigotas). As barras representam a média ± DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade de SbK com relação ao controle. Símbolos em vermelho § indicam que SbK possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os ligantes do grupo.

Na infecção de macrófagos com amastigotas, o Sb^v-G é também o único com atividade significativa em comparação com o controle, com 24 horas de exposição nas concentrações de 20 μg/mL e 30 μg/mL (p<0,001) (Gráfico 6A).

Em todos os tempos de exposição nas concentrações em que a droga mostrou atividade anti-amastigota significativa, o Sb^v-G apresentou maior inibição da taxa de infecção de macrófagos quando comparado aos demais complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência. Houve diferenças estatisticamente significativas entre a ação de Sb^v-G em relação aos demais complexos e drogas de referência em 24 horas nas concentrações de 20 μg/mL (p<0,01) e 30 μg/mL (p<0,05), em 48 horas nas concentrações de 10 μg/mL (p<0,05), 20 μg/mL (p<0,01) e 30 μg/mL (p<0,001) e em 72 horas nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg/mL (p<0,001). Esses resultados são apresentados nos gráficos 6A, B e C.

Em 72 horas de exposição, o SbK mostrou atividade anti-amastigota nas concentrações de 20 e 30 μg/mL (p<0,01), e o AM e Glucantime na concentração de 30 μg/mL (p<0,05). Em 72 horas, nas concentrações em que Sb^v-Ad, Sb^v-C, Sb^v-U, mostraram atividade anti-amastigota significativa com relação ao controle, essa atividade não foi estatisticamente diferente quando comparada a do antimoniato livre SbK, do AM e do Glucantime (p>0,05) (Gráfico 6C).

Os gráficos 6 A, B e C mostram em destaque, marcado com símbolos em vermelho, a diferença estatística entre a ação anti-amastigota do Sb^V-G comparada a dos demais compostos. Não há diferença estatisticamente significativa entre a ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-A, Sb^V-C, Sb^V-U e as drogas de referência ($p>0,05$). Observa-se que a ação anti-amastigota dos complexos no geral, segue a seguinte ordem: Sb^V-G> SbK> Sb^V-A> Sb^V-C> Sb^V-U, alternando em algumas concentrações para Sb^V-C< Sb^V-U.

Os gráficos 6.1 A, B e C, mostram a ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos em macrófagos infectados com amastigotas, comparado ao controle e ao SbK livre. Todos os ligantes são inativos contra o parasito, em todas as concentrações testadas ($p>0,05$). Observa-se no gráfico 6.1C, que o SbK livre, nas concentrações de 20 µg/mL e 30µg/mL no tempo de exposição de 72 horas, tem ação anti-amastigota significativa com relação ao controle ($p<0,01$). O SbK possui ação anti-amastigota estatisticamente significativa quando comparada a de todos os ligantes dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos. A diferença estatística entre SbK e os ligantes é mostrada no gráfico 6.1C em destaque com símbolo em vermelho, na concentração de 20 µg/mL para guanósina ($p<0,01$), adenosina ($p<0,001$), citidina ($p<0,05$) e uridina ($p<0,01$) e na concentração de 30µg/mL ($p<0,01$) para todos os ligantes.

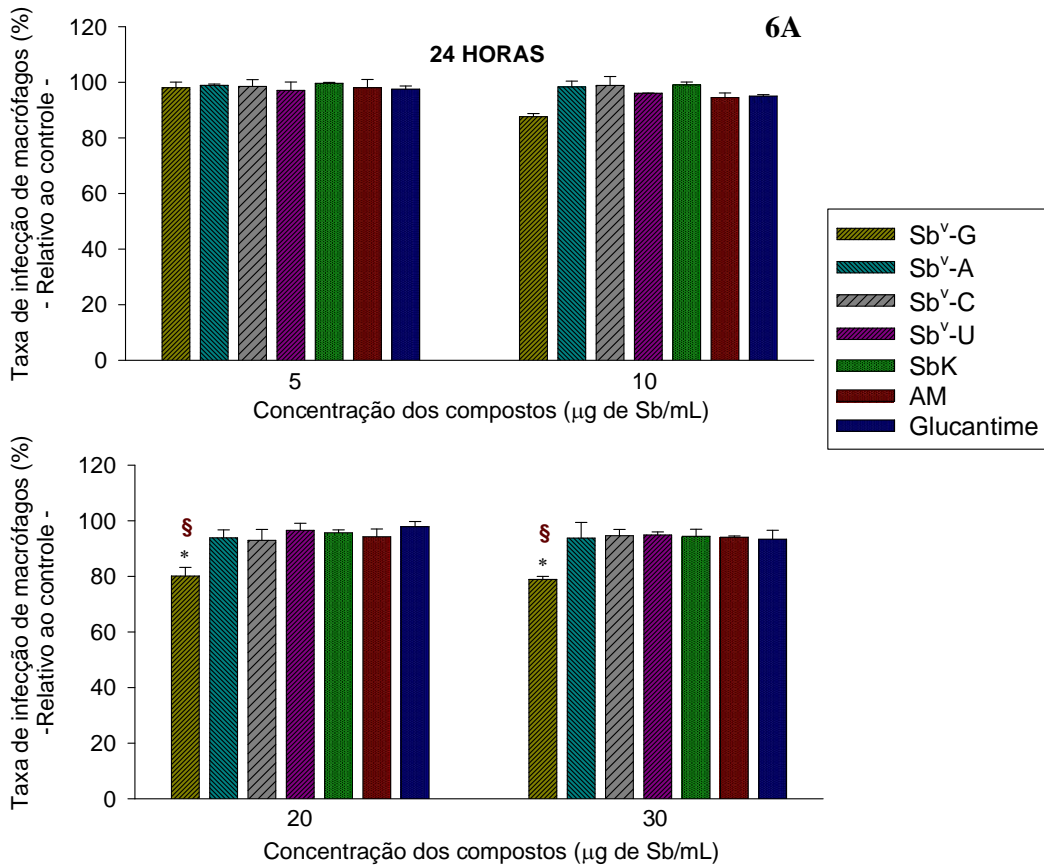


Gráfico 6-A. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg de Sb/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo ($p < 0,05$).

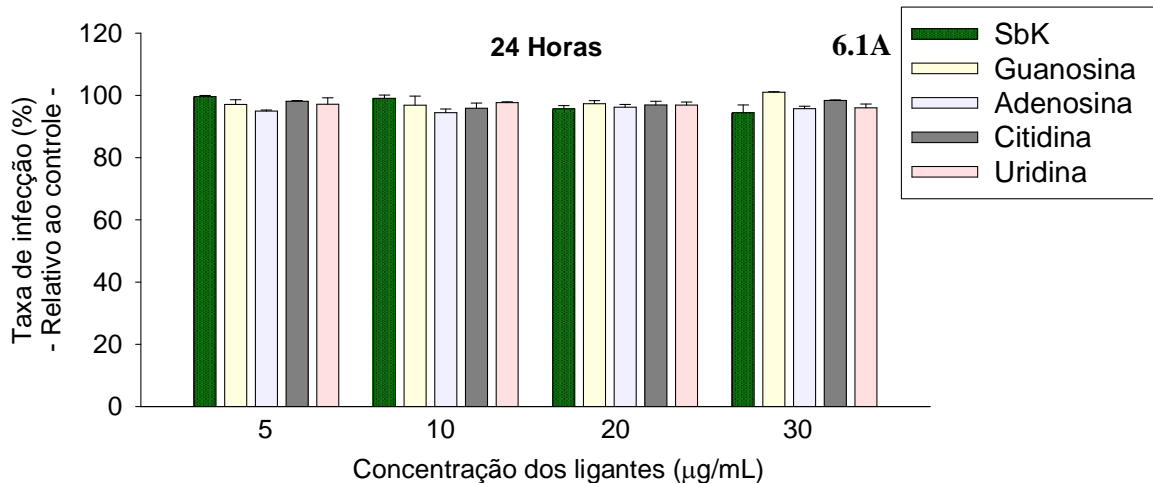


Gráfico 6.1-A. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30 μg de Sb/mL, no tempo de exposição de 24 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção.

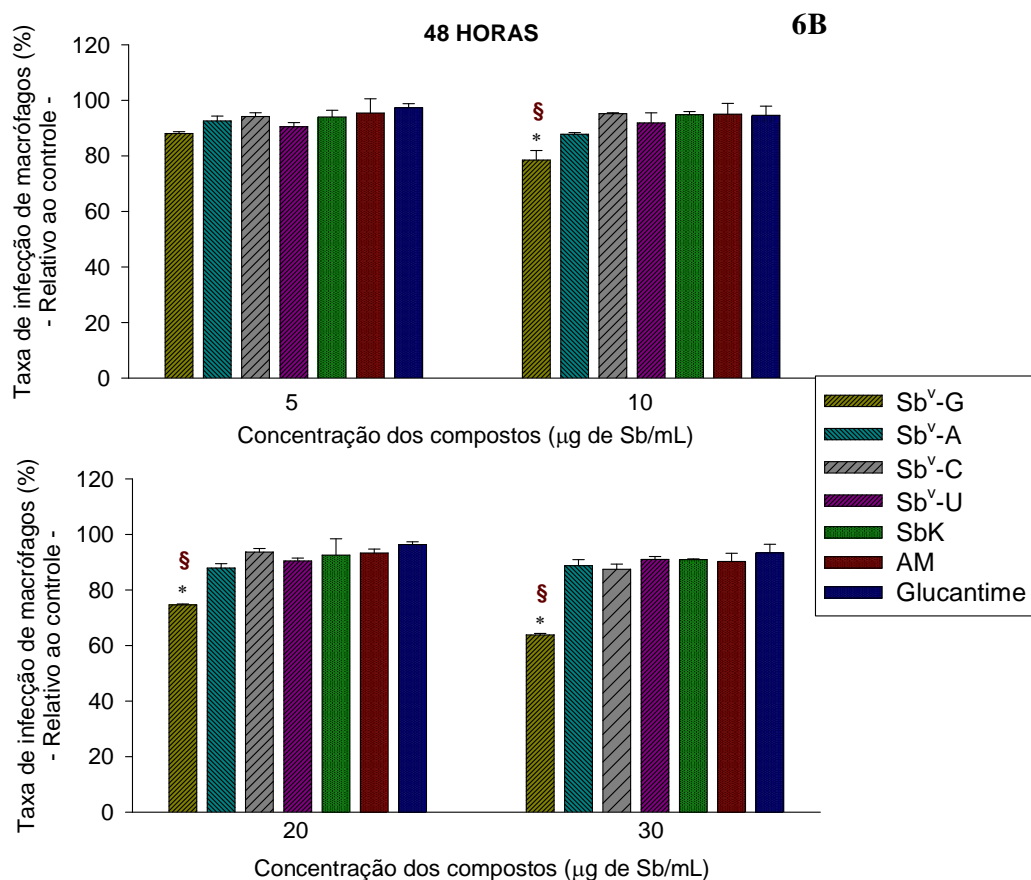


Gráfico 6-B. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo ($p < 0,05$).

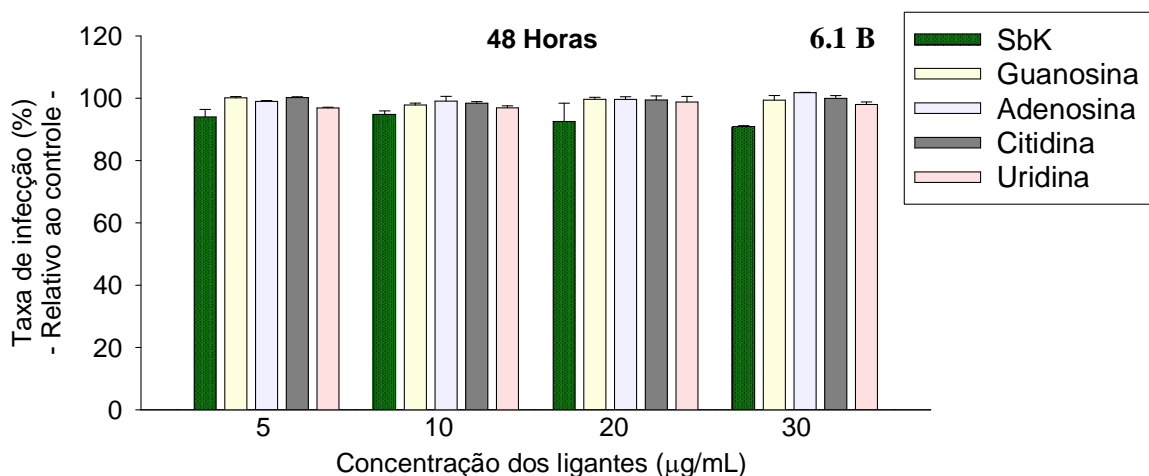


Gráfico 6.1-B. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5 a 30 μg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 48 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção.

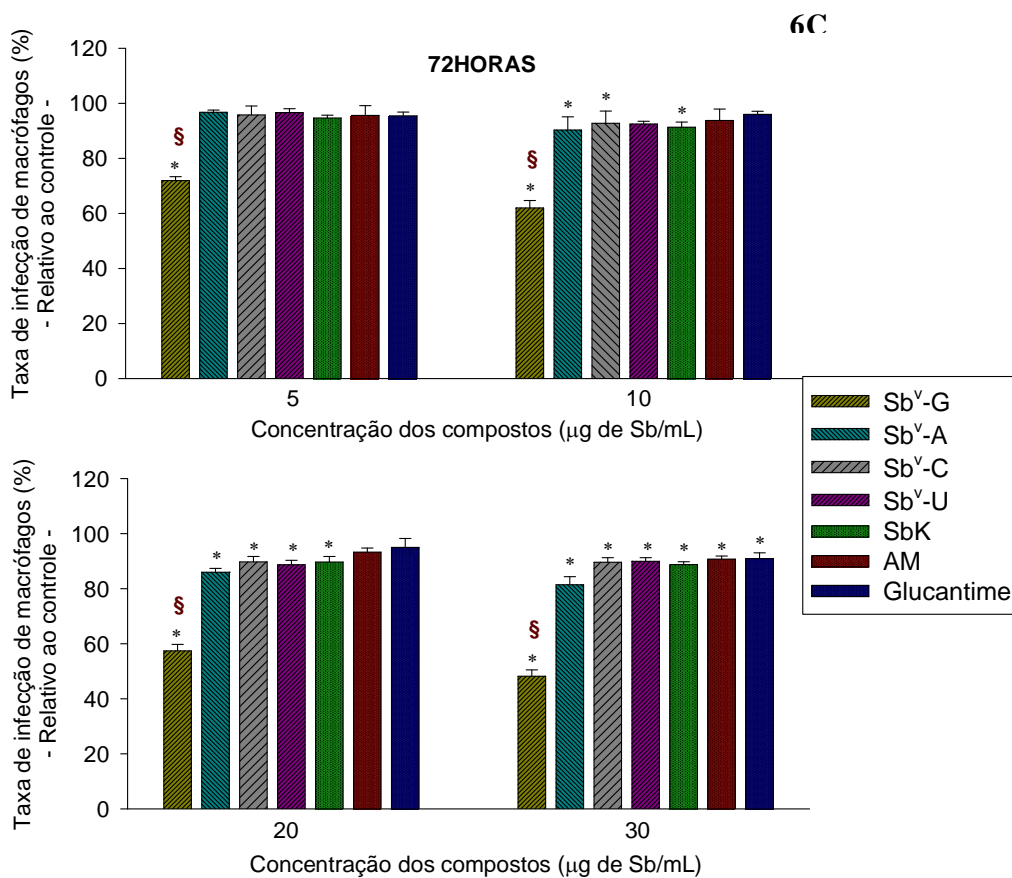


Gráfico 6-C. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos e drogas de referência nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os demais compostos do grupo ($p < 0,05$).

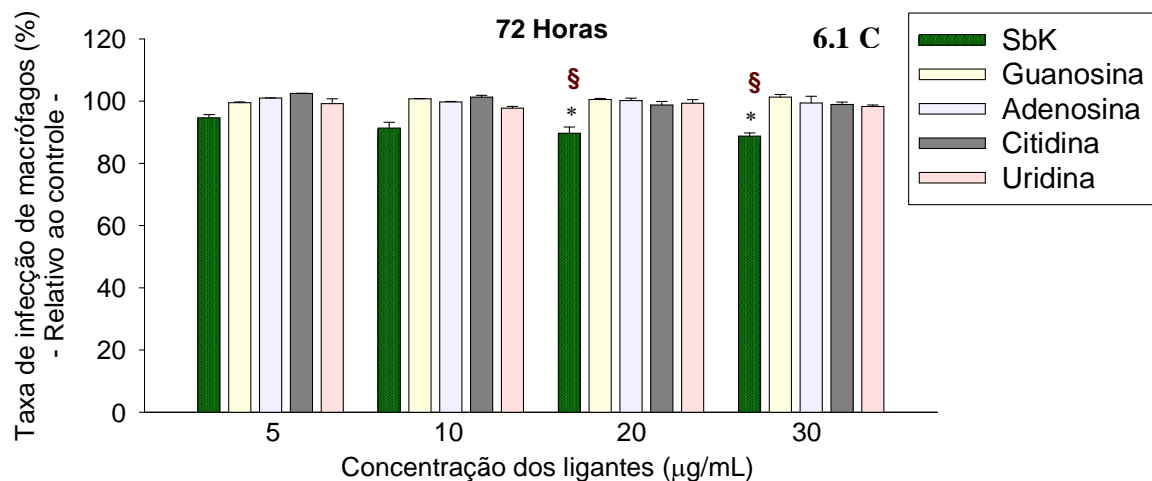


Gráfico 6.1-C. Ação anti-amastigota dos ligantes dos complexos Sb^v-ribonucleosídeos nas concentrações referentes a 5, 10, 20 e 30 μg de Sb^v/mL, no tempo de exposição de 72 horas (macrófagos infectados com amastigotas). As barras representam a média \pm DP de um experimento representativo de três feitos em triplicata. Gráfico com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na atividade de SbK com relação ao controle. Símbolos em vermelho § indicam que SbK possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todos os ligantes do grupo.

Nos tempos de 24 e 48 horas, não foi possível determinar a IC₅₀ para os compostos estudados, dentro das concentrações tidas como limite de citotoxicidade para este ensaio. Além da ação anti-amastigota dos fármacos ter sido mais pronunciada no tempo de 72 horas, neste tempo de exposição, foi possível determinar a IC₅₀ para o Sb^V-G. Por este motivo, o tempo de 72 horas foi estabelecido como o ideal para o estudo da ação anti-amastigota dos compostos Sb^V-ribonucleosídeos.

7.4.1. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos em macrófagos infectados com promastigotas de *L.chagasi*

Uma vez padronizado o tempo de 72 horas como o ideal para os ensaios de ação anti-amastigota dos complexos, os resultados dos itens 7.4.1 e 7.4.2 foram representados em gráficos com a média e análise estatística de 3 experimentos em triplicata.

O gráfico 7 mostra a taxa de infecção de macrófagos infectados com promastigotas e com amastigotas. Amastigotas infectam macrófagos de forma mais eficiente que promastigotas ($p < 0,05$ – marcado em destaque com símbolo em vermelho).

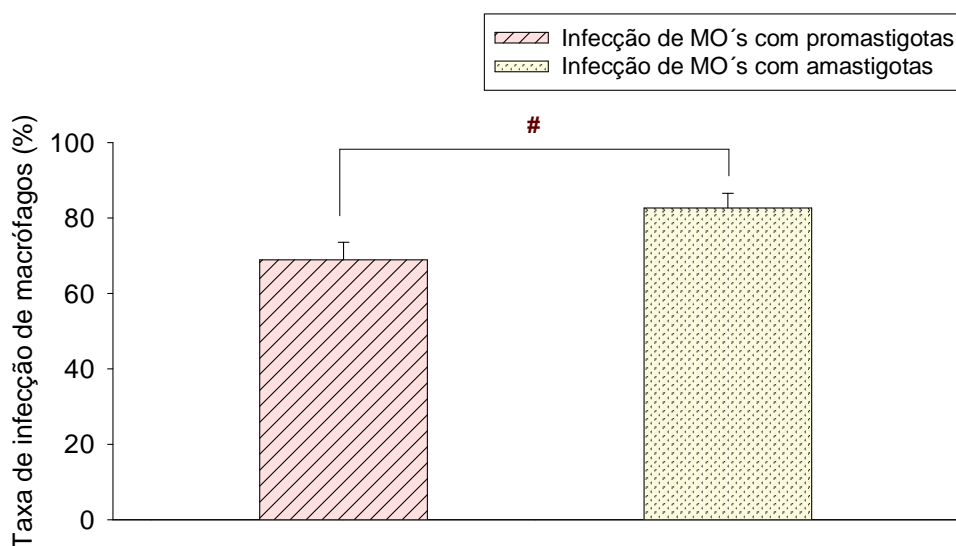


Gráfico 7. Porcentagem de macrófagos infectados nos ensaios de infecção com promastigotas e com amastigotas. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. O símbolo vermelho # indica que amastigotas são estatisticamente mais internalizadas por macrófagos que promastigotas ($p < 0,05$).

Os gráficos 8A e B, mostram a ação dos complexos Sb^V-pirimidínicos e Sb^V-purínicos, respectivamente, no tempo de 72 horas, destacando-se a dose

resposta dos compostos em comparação ao SbK livre, nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μ g/mL de Sb^V.

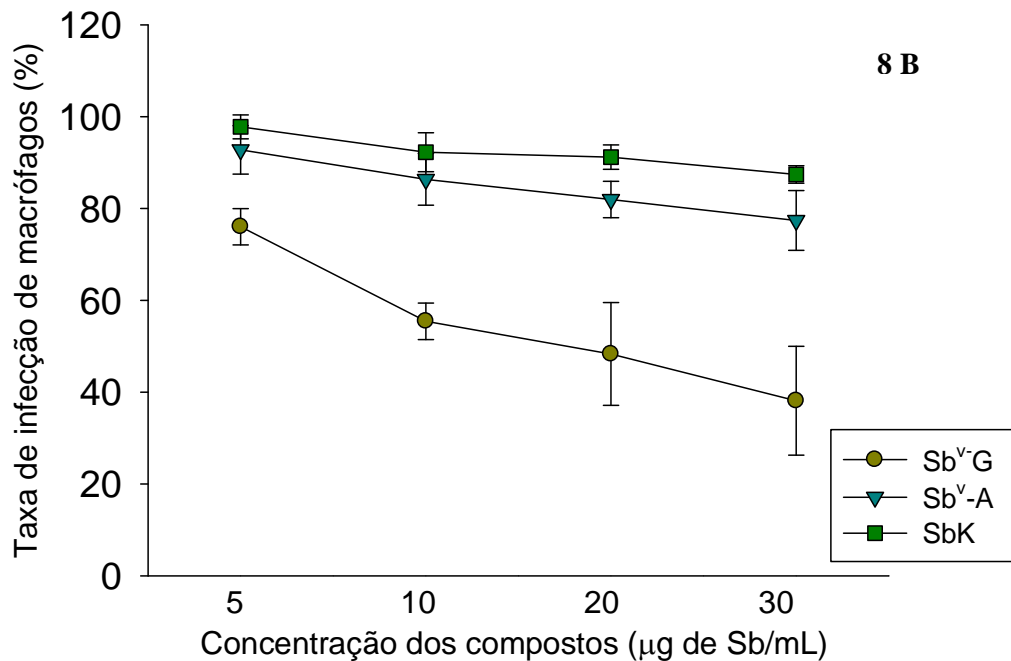
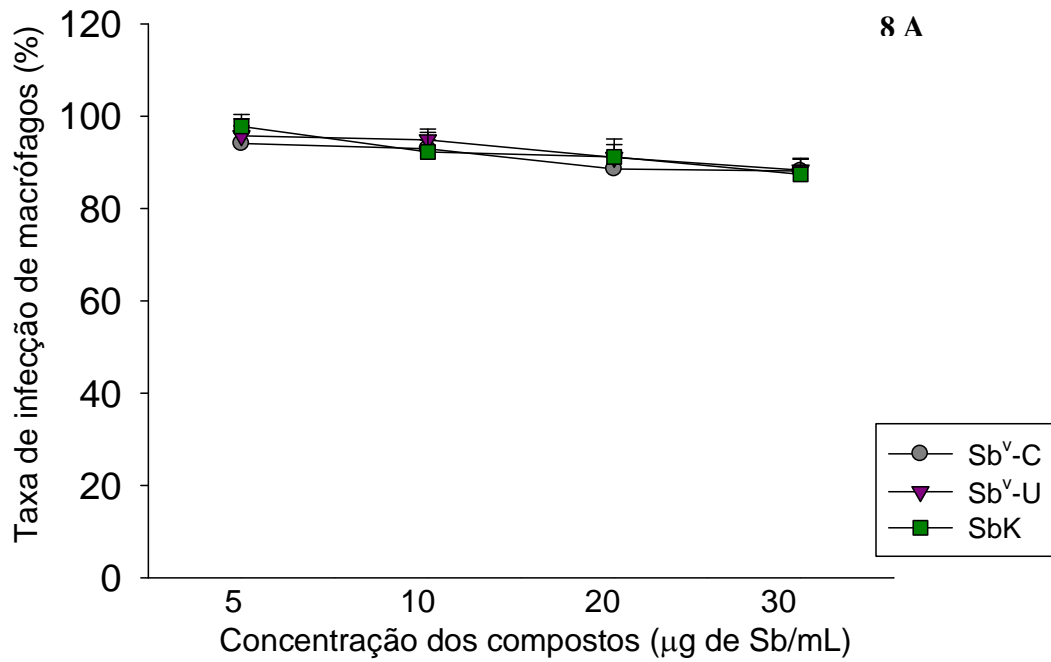


Gráfico 8-A. Ação anti-amastigota dos compostos Sb^v-pirimidínicos. **B.** Ação anti-amastigota dos compostos Sb^v-purínicos nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 μ g/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Observar a curva dose resposta dos compostos Sb^v-pirimidínicos no gráfico 7A e Sb^v-purínicos no gráfico 7B em comparação com o SbK livre.

O gráfico 9 mostra a ação de Sb^v-G em comparação as drogas de referência, em 72 horas nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg/mL de Sb^v. As drogas de referência mostram ação anti-amastigota nas concentrações de 20 e 30µg de Sb^v/mL (p<0,05). Em todas as concentrações a ação anti-amastigota do Sb^v-G é estatisticamente diferente do controle (p<0,001 – marcado com asteriscos), e das drogas de referência (5µg de Sb^v/mL p<0,05 e 10, 20 e 30µg de Sb^v/mL p<0,001 – marcado em destaque com símbolo vermelho).

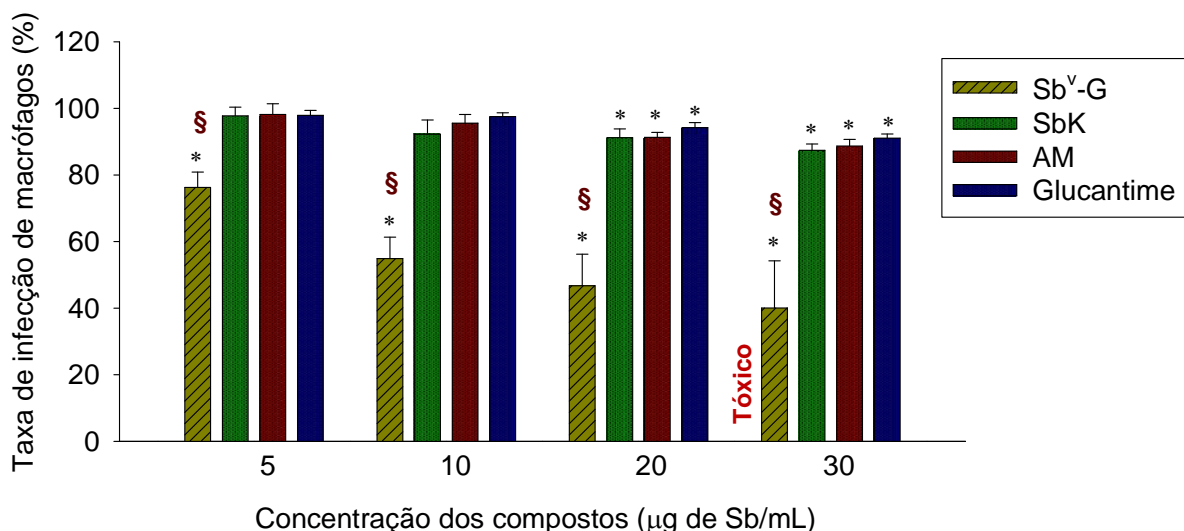


Gráfico 9. Ação anti-amastigota de Sb^v-G nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^v/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatísticas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^v-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todas as drogas de referência do grupo (p<0,05). **Tóxico**: indica que o Sb^v-G é tóxico para macrófagos na concentração de 30µg de Sb^v/mL de acordo com o ensaio de citotoxicidade MTT.

O Quadro 5 mostra a CC₅₀ para macrófagos, o IC₅₀ para amastigotas e o IT:

	Atividade anti-amastigota		
	MTT MØ's CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IT
Sb^v-G	20	9,5	2,1
Sb^v-A	41,8	>30	<1,4
SbK	50,4	>30	<1,7

Quadro 5. Índice Citotóxico para 50% dos macrófagos (CC₅₀ obtido no ensaio MTT), Índice Citotóxico para 50% das amastigotas (IC₅₀ obtido no ensaio de atividade anti-amastigota em macrófagos infectados com promastigotas) e Índice Terapêutico (obtido pela razão CC₅₀ / IC₅₀), para os compostos Sb^v-purínicos em comparação com o SbK

livre. Os valores de CC_{50} e IC_{50} foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o Software Sigma Plot® 10.0.

O gráfico 10 compara a ação anti-amastigota de Sb^V -G com os demais complexos Sb^V -ribonucleosídeos e com as drogas de referência, no tempo de 72 horas, na concentração de $10\mu\text{g}$ de Sb^V/mL (concentração mais próxima da IC_{50} de Sb^V -G para macrófagos infectados com promastigotas). O Sb^V -G tem ação anti-amastigota estatisticamente diferente do controle ($p < 0,001$) e maior que a dos demais complexos Sb^V -ribonucleosídeos e drogas de referência ($p < 0,001$ – marcado em destaque com símbolo em vermelho). O Sb^V -A mostra ação anti-amastigota com relação ao controle ($p < 0,05$), mas esta ação é estatisticamente igual a ação de Sb^V livre ($p > 0,05$)

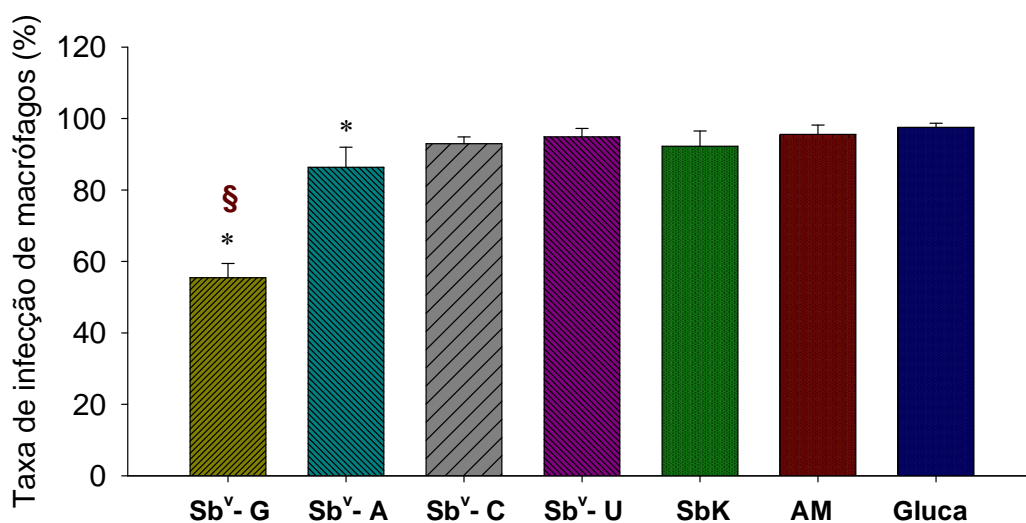


Gráfico 10. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos na concentração de $10\mu\text{g}$ de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V -G possui ação anti-amastigota maior que a de todos os demais compostos ($p < 0,05$).

7.4.2. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos em macrófagos infectados com amastigotas de *L.chagasi*

Os gráficos 11 A e B, mostram a ação dos complexos Sb^V -pirimidínicos e Sb^V -purínicos, respectivamente, no tempo de 72 horas, destacando-se a dose resposta dos compostos em comparação ao Sb^V livre, nas concentrações de 5, 10, 20 e $30\mu\text{g}/\text{mL}$ de Sb^V .

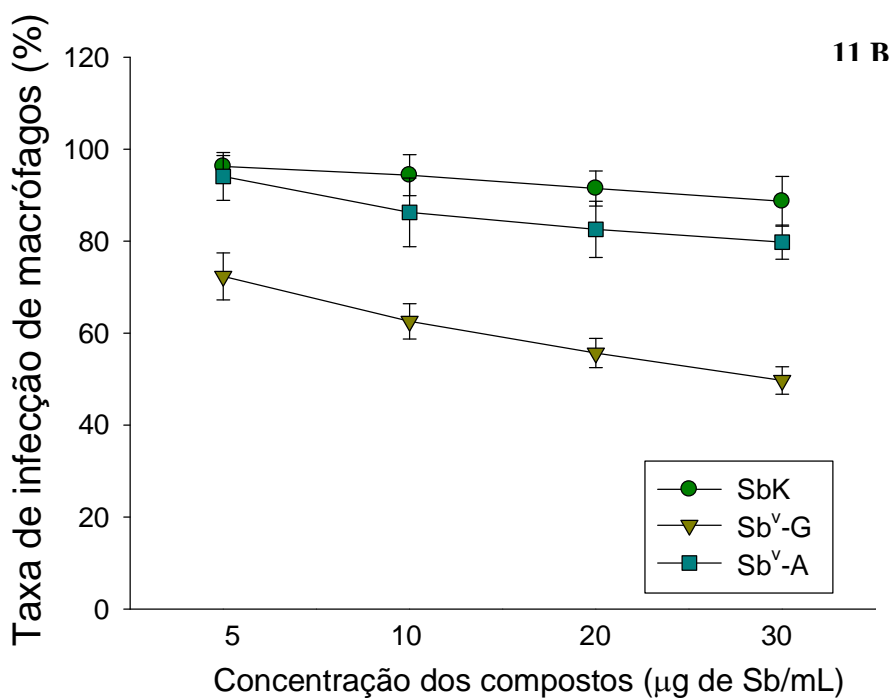
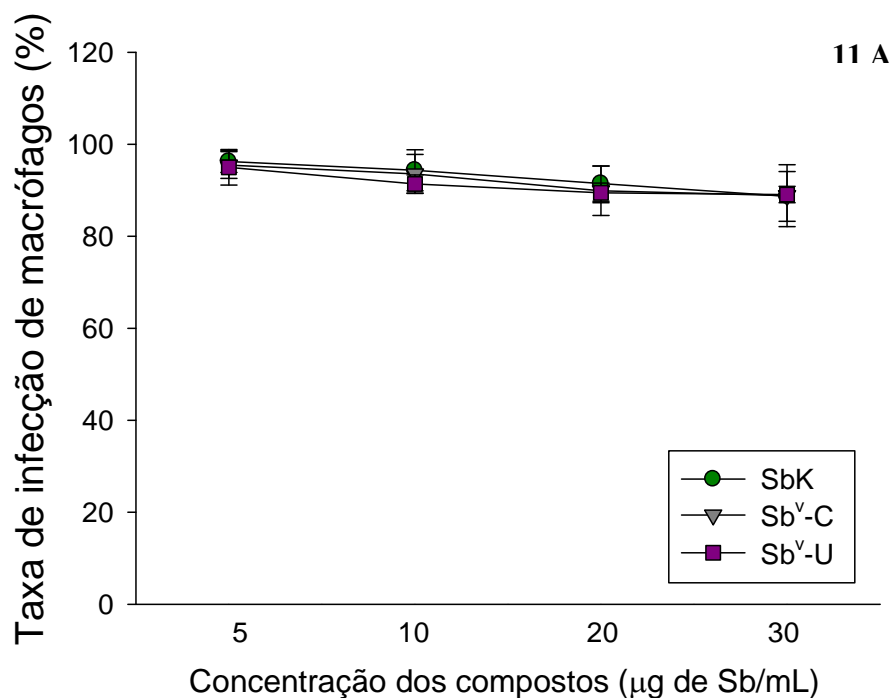


Gráfico 11-A. Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V-pirimidínicos. **B.** Ação anti-amastigota dos compostos Sb^V-purínicos nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 µg/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Observar a curva dose resposta dos compostos Sb^V-pirimidínicos no gráfico 10A e Sb^V-purínicos no gráfico 10B, em comparação com o SbK livre.

O gráfico 12 mostra a ação de Sb^V-G em comparação com as drogas de referência, em 72 horas nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 µg de Sb^V/mL de

Sb^V. As drogas de referência mostram ação anti-amastigota na concentração de 30 µg de Sb^V/mL (p<0,05). Em todas as concentrações a ação anti-amastigota Sb^V-G é estatisticamente diferente do controle (p<0,001 – marcado com asteriscos), e maior que a das drogas de referência (p<0,001 – marcado em destaque com símbolo vermelho).

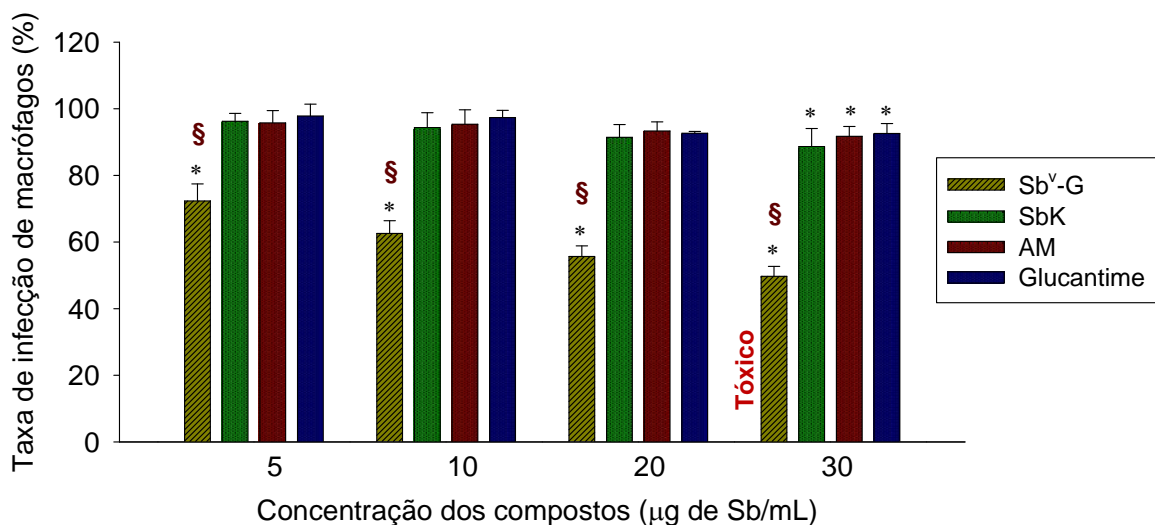


Gráfico 12. Ação anti-amastigota de Sb^V-G nas concentrações de 5, 10, 20 e 30µg de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolos em vermelho § indicam que Sb^V-G possui ação anti-amastigota estatisticamente maior que a de todas as drogas de referência do grupo (p<0,05). Tóxico: indica que o Sb^V-G é tóxico para macrófagos na concentração de 30µg de Sb^V/mL de acordo com o ensaio de citotoxicidade MTT.

O Quadro 6 mostra a CC₅₀ para macrófagos, o IC₅₀ para amastigotas e o IT:

	Atividade anti-amastigota		
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IT
Sb^V-G	20	12,2	1,6
Sb^V-A	41,8	>30	<1,4
Sb^V-K	50,4	>30	<1,7

Quadro 6. Índice Citotóxico para 50% dos macrófagos (CC₅₀ obtido no ensaio MTT), Índice Citotóxico para 50% das amastigotas (IC₅₀ obtido no ensaio de atividade anti-amastigota em macrófagos infectados com amastigotas) e Índice Terapêutico (obtido pela razão CC₅₀ / IC₅₀), para os compostos Sb^V-purínicos em comparação com o SbK livre. Os valores de CC₅₀ e IC₅₀ foram estimados a partir dos valores médios de 3 experimentos por interpolação gráfica utilizando o Software Sigma Plot® 10.0.

O gráfico 13 compara a ação anti-amastigota de Sb^V-G com os demais complexos Sb^V-ribonucleosídeos e com as drogas de referência, no tempo de 72 horas, na concentração de 10µg de Sb^V/mL (concentração mais próxima da IC₅₀ de Sb^V-G para macrófagos infectados com amastigotas). O Sb^V-G tem ação anti-amastigota com relação ao controle (p<0,001), maior que a dos demais complexos Sb^V-ribonucleosídeos e drogas de referência (p<0,001 – marcado com símbolo em vermelho). O Sb^V-A mostra ação anti-amastigota com relação ao controle (p<0,05), mas esta ação é estatisticamente igual a ação de SbK livre (p>0,05)

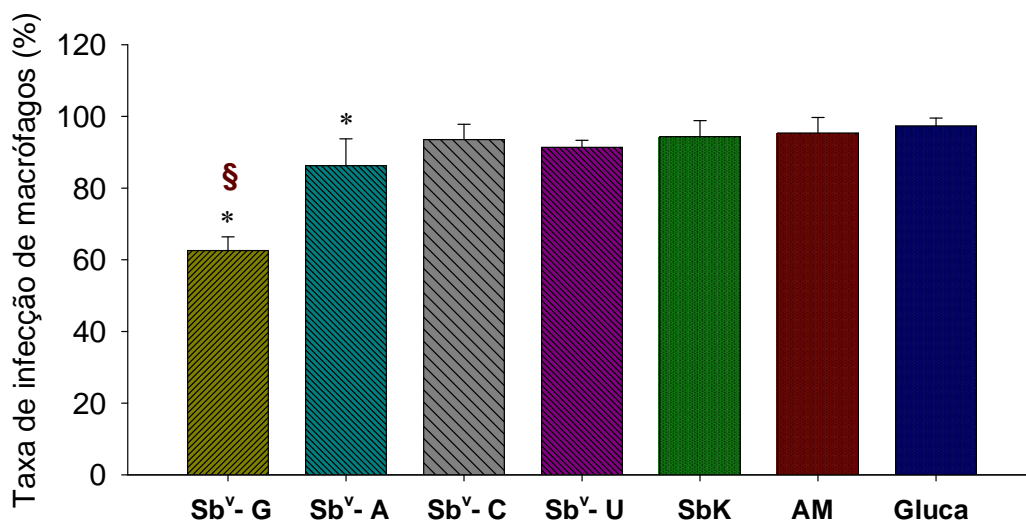


Gráfico 13. Ação anti-amastigota dos complexos Sb^V-ribonucleosídeos na concentração de 10µg de Sb^V/mL no tempo de exposição de 72 horas. A ação anti-amastigota é representada como taxa de infecção com relação ao controle, que é considerado como 100% de infecção. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na atividade dos compostos com relação ao controle / Símbolo em vermelho § indica que Sb^V-G possui ação anti-amastigota maior que a de todos os demais compostos (p<0,05).

O gráfico 14 compara a ação anti-amastigota de Sb^V-G e SbK em macrófagos infectados com promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas, nas concentrações de 10 e 20µg de Sb^V/mL no tempo de 72 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a ação anti-amastigota destes compostos nos ensaios de macrófagos infectados com promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas (p>0,05).

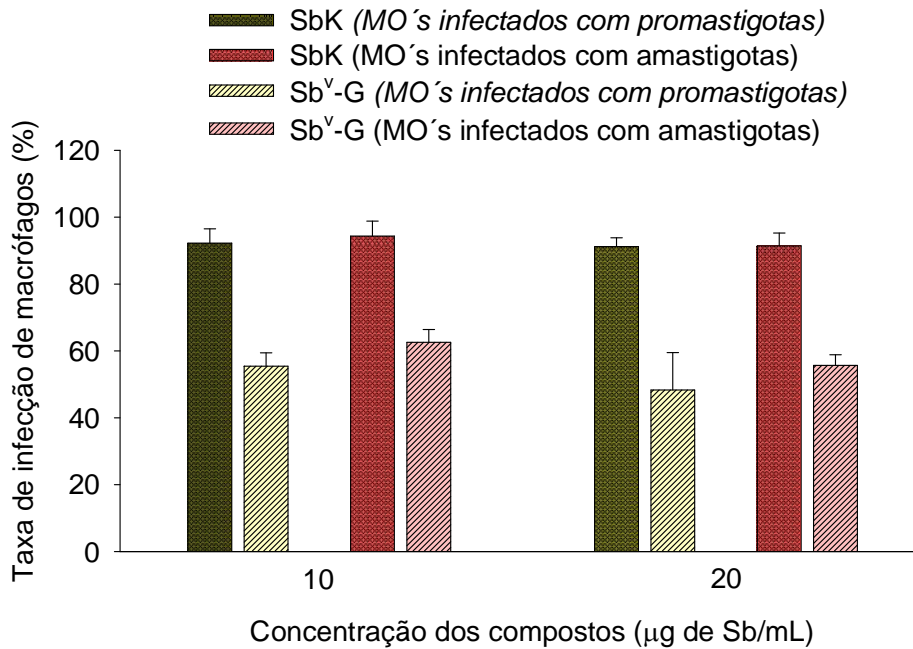


Gráfico 14. Ação anti-amastigota de Sb^v-G em comparação a SbK livre, na infecção de macrófagos com promastigotas e na infecção de macrófagos com amastigotas, nas concentrações de 10 e 20 µg de Sb/mL no tempo de 72 horas de exposição. As barras representam a média ± DP de três experimentos independentes feitos em triplicata.

A figura 9 mostra macrófagos infectados com promastigotas em imagens de microscopia ótica. As figuras 9 A e B são os controles de macrófagos infectados na ausência de droga, nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente. As figuras 9 C e D são macrófagos infectados, expostos ao antimoniato livre (SbK) nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente. As figuras 9 D e E são macrófagos infectados expostos ao Sb^v-G, nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente.

A figura 10 mostra macrófagos infectados com amastigotas em imagens de microscopia ótica. As figuras 10 A e B são os controles de macrófagos infectados na ausência de droga, nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente. As figuras 10 C e D são macrófagos infectados, expostos ao antimoniato livre (SbK) nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente. As figuras 10 D e E são macrófagos infectados expostos ao Sb^v-G, nos aumentos de 40X e 100X, respectivamente.

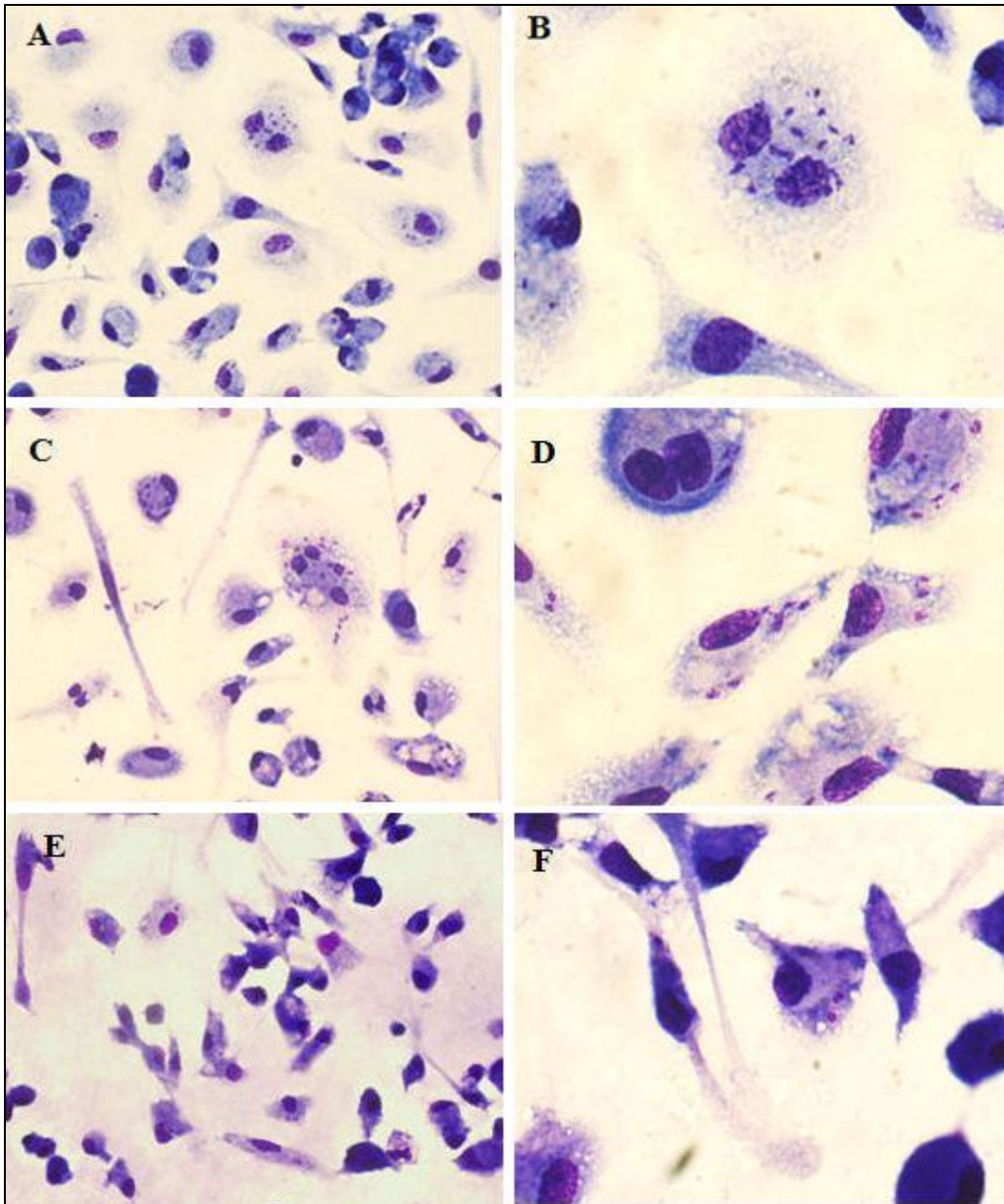


Figura 9 – **A.** Controle de macrófagos infectados com promastigotas de *L. chagasi* (aumento de 40X). **B-** (aumento de 100X). **C-** Ação anti-amastigota de SbK na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **D-** (aumento de 100X). **E-** Ação anti-amastigota de Sb^v-G na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **F-** (aumento de 100X).

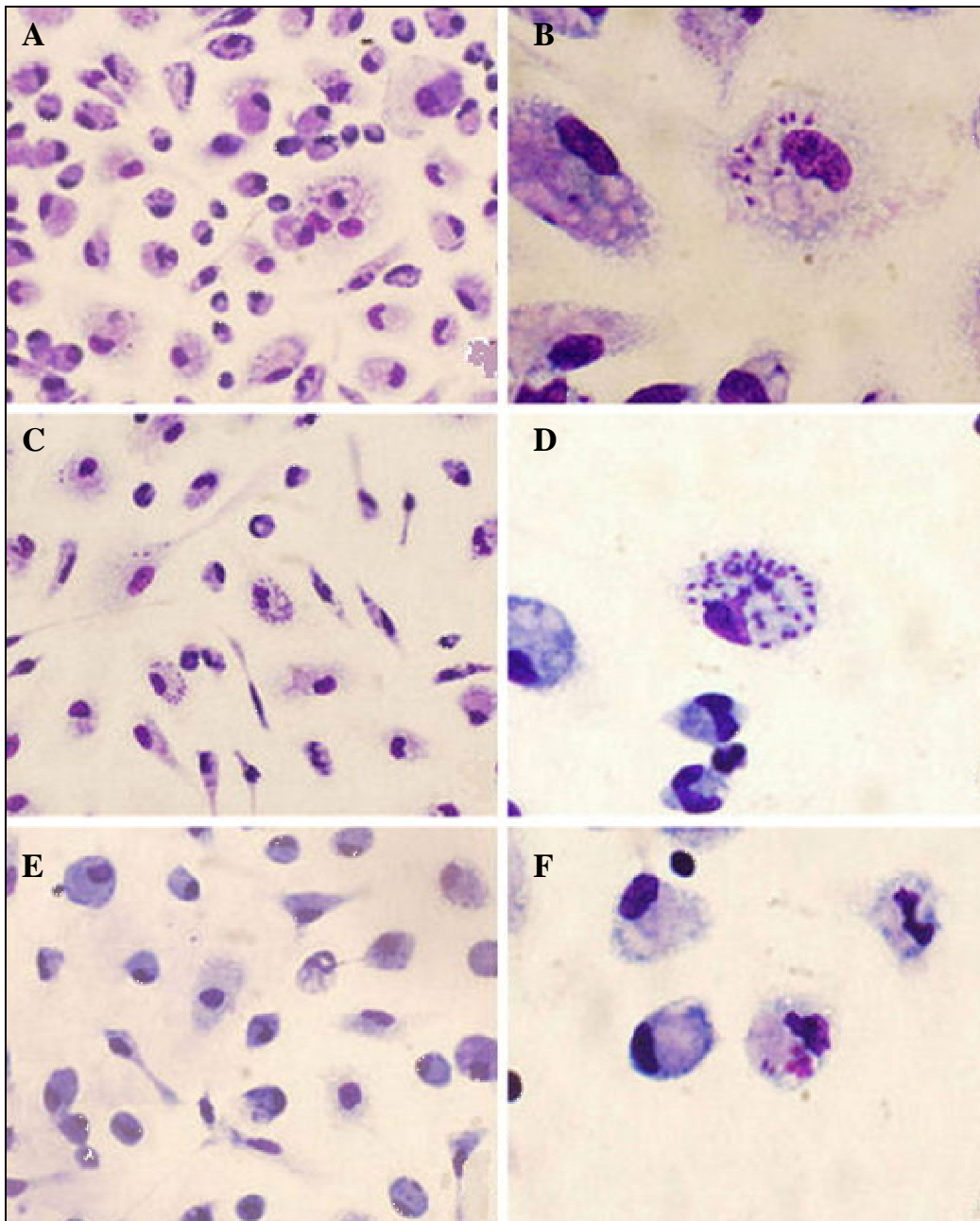


Figura 10 – **A.** Controle de macrófagos infectados com amastigotas de *L.chagasi* (aumento de 40X). **B.** (aumento de 100X). **C.** Ação anti-amastigota de SbK na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **D.** (aumento de 100X). **E.** Ação anti-amastigota de Sb^v-G na concentração de 10µg de Sb/mL (aumento de 40X). **F.** (aumento de 100X).

8. DISCUSSÃO

A quimioterapia ainda é o pilar para o controle da maioria das doenças parasitárias, principalmente, quando não se dispõe de vacinas, como é o caso das leishmanioses (KOUNI,2003). Apesar dos medicamentos contra leishmanioses estarem disponíveis para o tratamento, esse é dificultado, pela localização intra-vacuolar do parasito, contra-indicações dos fármacos, efeitos colaterais apresentados por grande parte dos pacientes tratados com as drogas disponíveis, respostas variáveis ao tratamento e deficiência imunológica, principalmente, em pacientes HIV+ e diabetes mellitus e o aumento dos casos de resistência as drogas existentes.

A gravidade destes inconvenientes, tem motivado a busca por novos agentes terapêuticos. Para desenvolver compostos específicos, é essencial ter conhecimento das propriedades enzimáticas e/ou macromoléculas que são únicas do parasito. Estudos filogenéticos sugerem que os parasitos tripanosomatídeos diferem consideravelmente quanto a sua organização celular quando comparados aos seus hospedeiros mamíferos. Várias enzimas, metabólitos e proteínas identificadas em parasitos estão ausentes em mamíferos ou são consideravelmente diferentes, sendo então, alvos estratégicos para o tratamento de tais doenças parasitárias (CARTER *et al.*; 2008).

Enfoques multidisciplinares deverão ser utilizados combinando metodologias pós-genômicas e o desenvolvimento racional de novas drogas antiparasitárias, seletivas para a maquinaria do parasito, lançando mão de uma exploração terapêutica das diferenças fundamentais entre o parasito e o hospedeiro mamífero.

Uma das mais marcantes discrepâncias entre *Leishmania* e seu hospedeiro humano são os passos metabólicos pelo qual eles sintetizam nucleotídeos purínicos. Assim, o metabolismo de purinas é considerado um alvo estratégico dos quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses, uma vez que a *Leishmania* é incapaz de sintetizar purinas pela via “de-novo” e depende de purinas pré-formadas pelo hospedeiro. Dessa forma, o presente

trabalho analisou a eficácia terapêutica de quatro complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos sintetizados com base nesta fundamentação teórica.

A eficácia anti-*Leishmania* “in vitro” dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos foi avaliada a partir de ensaios de citotoxicidade em macrófagos e promastigotas, incorporação de antimônio em macrófagos e toxicidade para amastigotas internalizadas em macrófagos. Esse estudo possibilitou a avaliação da ação desses complexos em meios biológicos e representa uma extensão de trabalhos realizados pelo grupo de Demicheli & Frézard, que pesquisaram as interações do Sb^{V} com ribonucleosídeos, caracterizando as reações termodinamicamente e cineticamente em condições fisiológicas modelo, de temperatura e pH.

Os ribonucleosídeos purínicos e pirimidínicos contêm, em sua estrutura química, sítios de coordenação de íons metálicos, por exemplo, metais como o antimônio, formam complexos com a unidade ribose. A coordenação de metais a estes nucleosídeos e a compreensão de sua atividade biológica é de grande interesse, face à importância farmacológica desta classe de compostos (DEMICHELI *et al.*, 2002).

Foram utilizados como modelo para testar a ação dos compostos estudados, o sistema macrófago peritoneal de camundongos BALB/c, promastigotas de fase estacionária de crescimento e amastigotas separadas de baço de hamsters *Mesocricetus auratus* experimentalmente infectados com *L. chagasi*.

De acordo com os ensaios de citotoxicidade dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos para macrófagos, observamos que nenhum dos compostos foi tóxico para as células na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ de Sb^{V} , mas mostraram citotoxicidade a $100\mu\text{g/mL}$, de acordo com a seguinte ordem ($\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G} > \text{Sb}^{\text{V}}\text{-K} > \text{Sb}^{\text{V}}\text{-A} > \text{Sb}^{\text{V}}\text{-C} > \text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$).

A toxicidade do antimoniato de potássio é maior quando comparada a dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos, exceto o $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$, sugerindo que a complexação do Sb^{V} geralmente reduz a citotoxicidade do fármaco, presumivelmente através da promoção de um sistema de liberação lenta de Sb^{V} . Este resultado é consistente com a maior atividade citotóxica do antimoniato de potássio contra uma linhagem de células tumorais, quando comparado ao antimoniato de meglumina (DZAMITIKA, 2006).

Quanto aos ligantes dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos, apenas a guanosina, ligante de Sb^{V} -G, mostrou citotoxicidade para macrófagos em todos os tempos, nas concentrações mais elevadas, embora tenha sido estatisticamente menos tóxica que o SbK . No entanto, a complexação de SbK com guanosina, intensificou a citotoxicidade do antimônio, provavelmente por aumentar a entrada do fármaco na célula, como será discutido adiante.

Nos ensaios de incorporação de antimônio em macrófagos, o complexo Sb^{V} -G, mostrou uma incorporação mais elevada de antimônio, quando comparada ao antimoniato ($\text{KSb}(\text{OH})_6$) - (Fluka Chemie GmbH[®]), o que pode explicar sua maior citotoxicidade. O fato do complexo Sb^{V} -G formar partículas de tamanho nanométrico, pode explicar a maior incorporação de antimônio pela célula exposta a esse composto, já que os macrófagos são conhecidos pela sua capacidade de promover a captura de partículas coloidais por fagocitose. Pode-se então sugerir que tanto a incorporação intracelular quanto a citotoxicidade para macrófagos deste complexo se devem a formação de nanopartículas que aumentariam o acúmulo intracelular do antimônio.

Segundo Demicheli *et al*, (2006) os compostos Sb^{V} -purínicos são capazes de formar nanopartículas em solução aquosa. Por outro lado, ao contrário do Sb^{V} -G, o complexo Sb^{V} -A, que é também um composto Sb^{V} -purínico, não foi incorporado por macrófagos de modo significativo em comparação ao antimoniato. Uma hipótese para explicar este fato, pode ser apoiada na dinâmica de transporte de purinas pelas células de mamíferos, considerando que os transportadores de adenosina e guanosina poderiam influenciar na incorporação desses dois complexos Sb^{V} -purínicos, em macrófagos em diferentes proporções.

Assim como Sb^{V} -A, os compostos Sb^{V} -pirimidínicos também não foram significativamente incorporados pelos macrófagos, em comparação ao antimoniato livre. Ao contrário dos complexos Sb^{V} -purínicos, os Sb^{V} -pirimidínicos não formam nanopartículas em solução aquosa, dessa forma, não espera-se que a captura de antimônio por fagocitose pelos macrófagos, é mais difícil. Além disso, sabe-se que os transportadores para purinas e pirimidinas são distintos em células de mamíferos, o que também poderia influenciar na diferença observada entre o Sb^{V} -G e os complexos Sb^{V} -pirimidínicos com relação à incorporação.

Fenotípica e funcionalmente os macrófagos constituem um grupo heterogêneo de células derivadas de monócitos circulantes, e embora sua função dependa, pelo menos em parte, de sua localização, estágio de desenvolvimento e das condições de cultura “in vitro”, há algumas propriedades que são conservadas em quase todas as populações dessas células, sendo a habilidade de ingerir partículas via fagocitose, a mais distinguida. Os macrófagos são capazes de reconhecer patógenos e agentes não infectantes utilizando uma variedade de receptores de sua superfície.

Para avaliar a ação anti-amastigota dos complexos, macrófagos foram infectados com formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, a fim de comparar a ação das drogas sobre amastigotas resultantes de ambas as formas de infecção dos macrófagos.

Para os ensaios de infecção de macrófagos tanto com promastigotas, quanto com amastigotas, foi feita uma padronização dos experimentos quanto ao número de macrófagos por poço, número de parasitos por macrófago, tempo ideal para a infecção de macrófagos, concentração dos compostos em µg/mL de Sb^v e tempo ideal para ação dos fármacos.

Utilizando a mesma proporção de parasitos/macrófago, a infecção dos macrófagos com amastigotas foi mais alta, enquanto a infecção com promastigotas foi moderada (Gráfico 7), o que pode ser explicado pelo fato das formas amastigotas obtidas do hospedeiro, terem sua superfície recoberta por imunoglobulinas IgG. As IgG's interagem com receptores FcγR na superfície de macrófagos e são mais facilmente internalizadas pela célula (MOSSER e MILES, 2007). Após causarem o rompimento de uma célula infectada por intensa multiplicação, as amastigotas já recobertas por imunoglobulinas do hospedeiro, infectam sucessivamente outros macrófagos com facilidade.

As formas promastigotas infectam proporcionalmente menos macrófagos quando comparadas à infecção por amastigotas obtidas do baço de hamster, pois têm seus componentes de membrana alterados quando mantidas em meio de cultura, e mesmo sendo utilizadas na fase estacionária, como no nosso experimento, não há garantia de que todas as promastigotas são metacíclicas. Além disso, a adesão e a fagocitose dependem da espécie de *Leishmania* estudada, pois os receptores de macrófagos se ligam aos diferentes parasitos com diferente avidéz (MOSSER e MILES, 2007).

Os componentes de membrana de promastigotas que têm sido implicados no recrutamento do parasito, incluem principalmente lipofosfoglicano LPG e Gp63, bem como outras espécies de fosfoglicanos presentes no glicocálice do parasito. Os componentes do sistema do complemento são importantes mediadores da adesão e fagocitose de promastigotas pelas células. As amastigotas podem ser fagocitadas pelos mesmos receptores que aqueles das promastigotas, mas há diferenças na adesão aos fosfoglicanos celulares. Sua opsonização com o IgG, mais do que com os componentes do complemento, aumenta a avidéz da ligação ao macrófago via receptor Fc γ R, potencializando a eficiência da fagocitose (PETERS *et al.*, 1995). No entanto, a adesão e a fagocitose dos parasitos, promastigotas ou amastigotas, são eventos muito mais complexos do que nos é permitido discutir neste trabalho.

Existem ainda, diferenças na resposta da célula hospedeira durante as interações da mesma, com promastigotas ou amastigotas. Por exemplo, estudos com várias espécies de *Leishmania* têm mostrado que os macrófagos produzem superóxido em resposta à infecção com promastigotas, no entanto, níveis muito baixos de superóxido são produzidos pela célula em resposta a infecção com amastigotas (PEARSON *et al.*, 1983; PHAM *et al.*, 2005).

Além do ensaio colorimétrico de citotoxicidade por MTT, a influência citotóxica da droga sobre os macrófagos, pôde ser diretamente analisada no ensaio de infecção de macrófagos em lamínulas circulares. Esta observação da citotoxicidade foi feita em microscopia ótica, comparando a morfologia celular e alterações de membrana em macrófagos infectados e macrófagos não infectados, na ausência e na presença das drogas. Embora, o ensaio colorimétrico de MTT seja um método confiável e amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular, nos ensaios de infecção de macrófagos, ao expormos macrófagos não infectados aos fármacos nas concentrações de 30, 40, 50, 60 e 100 μ g/mL de Sb^V calculado para cada composto, não encontramos uma correlação da citotoxicidade das drogas nesse ensaio, com os resultados do ensaio de MTT.

Devido a alterações morfológicas observadas nas concentrações de 40 μ g de Sb^V /mL e ruptura celular nas concentrações de 50, 60 e 100 μ g de Sb^V/mL, concluímos que o limite seguro para a utilização de todos os

compostos em macrófagos, sem que houvesse qualquer dano celular seria 30µg de Sb^V/mL. Macrófagos infectados poderiam tornar-se mais frágeis e sensíveis aos efeitos tóxicos dos fármacos, no entanto, a alteração da morfologia e ruptura celular observadas em determinadas concentrações dos fármacos, foi igual nas células infectadas e nas não infectadas.

Notamos que os complexos necessitam de um determinado tempo para iniciarem sua ação anti-amastigota. No caso do Sb^V-G, esta ação iniciou-se nas primeiras 24 horas, porém em concentrações maiores, mas sem que pudéssemos determinar a IC₅₀. A medida que o tempo de exposição ao fármaco foi aumentado, a ação anti-amastigota pode ser observada em concentrações menores de Sb^V/mL, sendo que em 72 horas de exposição foi possível determinar o IC₅₀ e o IT para Sb^V-G, sem que se ultrapasse os limites de citotoxicidade CC₅₀. Por este motivo, o tempo de 72 horas de exposição, foi o padronizado para melhor demonstração da ação dos fármacos e será mais discutido. Pelo fato do composto Sb^V-G ter sido o único entre os testados, a mostrar atividade anti-amastigota expressiva, em todos os tempos testados, em diferentes concentrações, optamos por discutir sua ação com maior profundidade, no tempo de exposição padronizado, embora discutamos também a atividade anti-amastigota dos demais compostos Sb^V-ribonucleosídeos.

Os macrófagos se infectaram com diferentes intensidades quando se usou promastigotas ou amastigotas, entretanto, a ação anti-amastigota dos fármacos, como era de se esperar, exibiu o mesmo perfil nos macrófagos infectados com ambas as formas do parasito, sendo Sb^V-G > Sb^V-A > Sb^V-C > Sb^V-U, alternando em algumas concentrações para Sb^V-C < Sb^VU em macrófagos infectados com amastigotas, sem diferença estatisticamente significativa entre os compostos Sb^V-A, Sb^V-C, Sb^V-U e SbK. No entanto, devido à infecção por amastigotas ter sido maior, a ação de Sb^V-G pode ter sido “mascarada” e por isso, a IC₅₀ para este composto, foi maior quando comparada aquela encontrada para macrófagos infectados com promastigotas.

A diferença na sensibilidade de cada forma evolutiva do parasito também pode ser devida a diferenças nas interações de promastigotas e amastigotas com os macrófagos. Assim mesmo, a maior ação anti-amastigota de Sb^V-G comparada ao antimoniato livre (Sbk), é notória à microscopia ótica,

demonstrada nas figuras 9 e 10, em macrófagos infectados com promastigotas e com amastigotas, respectivamente.

O fato do $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$ ter sido o único dos complexos Sb^{V} -ribonucleosídeo que se mostrou mais eficaz que o antimoniato livre (Sb^{V}) e que o antimoniato de meglumina, é condizente com sua maior citotoxicidade para macrófagos observada no ensaio colorimétrico MTT e com a maior incorporação de Sb^{V} por macrófagos, observada no ensaio de absorção atômica. Esse perfil de maior citotoxicidade e ação anti-amastigota do $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$, talvez possa ser explicado exatamente pela maior incorporação e acúmulo intracelular de Sb^{V} , quando comparado aos outros compostos e drogas de referência (Gráfico 4).

A maior citotoxicidade dos complexos purínicos $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$ e $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-A}$, e maior atividade anti-amastigota de $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$, quando comparados aos complexos pirimidínicos $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$ e $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$, se sustenta no modelo proposto por Demicheli *et al*, (2005), de que a interação do Sb^{V} com nucleosídeos de purinas pode mediar a ação leishmanicida de fármacos Sb^{V} como mostrado na figura 11).

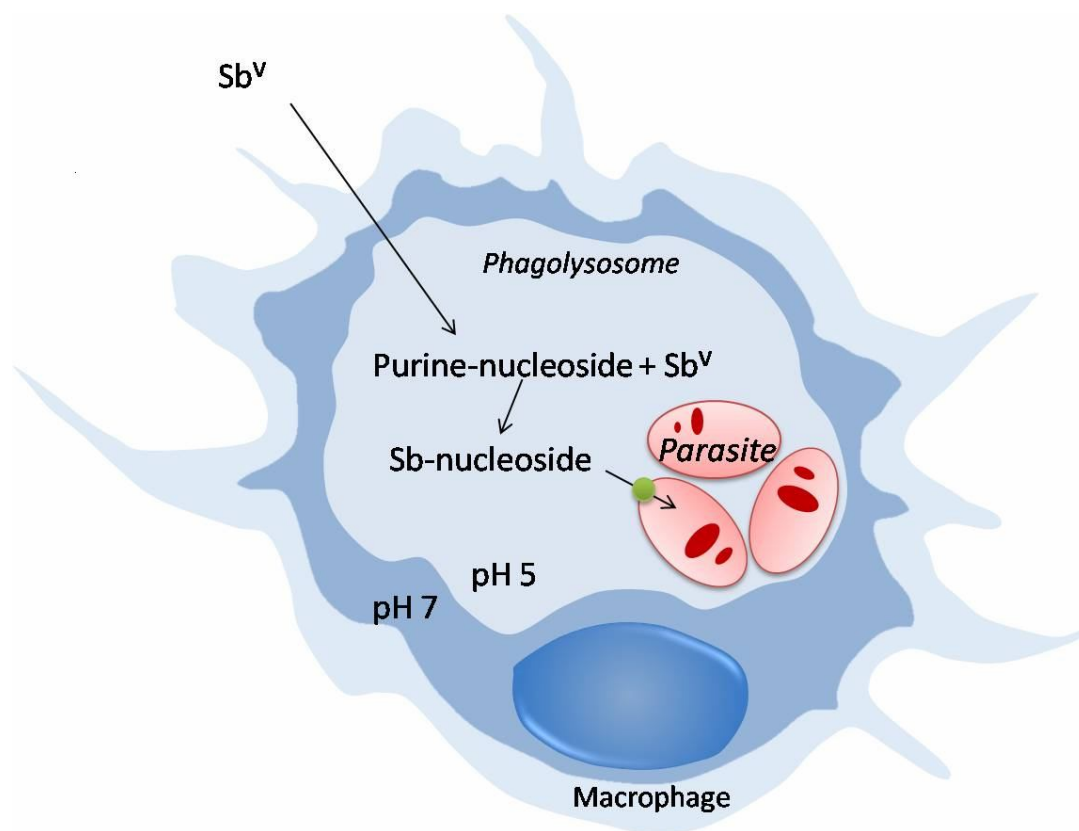


Figura 11. Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes proposto por Demicheli *et al*, (2005): formação de complexo Sb^{V} -ribonucleosídeo. Desenho de autoria de Rubens Lima do Monte Neto, em Ferreira *et al*, 2010.

De acordo com este modelo, após o tratamento com um medicamento antimonial, o fármaco atinge os fagolisossomas nos macrófagos, onde vive a *Leishmania*, por difusão simples ou após interação com glicoproteínas presentes na membrana celular e subsequente fagocitose. Dentro dos fagolisossomas, o Sb^V interage com purino nucleosídeos, formando os complexos Sb^V -purínicos. A sobrevivência da *Leishmania* depende da captura de ribonucleosídeos purínicos do hospedeiro e a interação do Sb^V com purino nucleosídeos, pode ser responsável pela ação citotóxica e leishmanicida dos fármacos antimoniais. Nesse caso, a maior citotoxicidade dos complexos Sb^V -purínicos para células hospedeiras observada nos ensaios de MTT, sugere que a formação destes complexos no hospedeiro vertebrado possa contribuir para os efeitos colaterais dos fármacos antimoniais pentavalentes (BERMAN, 1997).

Sabe-se que *Leishmania*, é incapaz de sintetizar o anel purínico dos nucleosídeos e, por isto, deve reconhecer e carrear purino-nucleosídeos presentes em seu ambiente. Analogamente, alguns anti-leishmaniais, como os análogos purínicos, por exemplo, o Alopurinol ribosídico (HPP,4-hidroxipirazole {3,4} pirimidina), também são carregados por esses transportadores específicos. Portanto, o processo de obtenção de purinas é uma estratégia importante para a sobrevivência do parasito. Com isso, duas hipóteses foram levantadas pelo grupo de Demicheli *et al*, (2005), quanto ao envolvimento dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos no mecanismo de ação dos antimoniais. Primeiramente, propõe-se que os complexos Sb^V -ribonucleosídeos poderiam atuar como inibidores dos transportadores de purinas em *Leishmania* levando, conseqüentemente, o parasito à morte. Em segundo lugar, os complexos Sb^V -ribonucleosídeos poderiam penetrar no parasito encontrando um ambiente de pH neutro e, então, inibir enzimas envolvidas com o metabolismo de nucleosídeos purínicos, interferindo assim com a via de transferência de purinas, da mesma forma que age o análogo purínico alopurinol (MARR, 1991). Esses complexos poderiam ser incorporados ao RNA do parasito e causar degradação do mRNA acompanhado da inibição da síntese protéica e com isso levar o parasito a morte.

A velocidade de formação dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos, é mais rápida em pH ácido, o que indica que esta reação é cineticamente favorecida dentro de ambientes biológicos ácidos, como por exemplo, o do

fagolisossoma (FERREIRA *et al.*, 2008). Como a *Leishmania* necessita de purinas para sua sobrevivência, é esperado que ribonucleosídeos purínicos estejam presentes em quantidades significativas dentro dos fagolisossomas.

De acordo com os estudos do grupo de Demicheli (FERREIRA *et al.*, 2008), os compostos contendo ribose, podem encontrar aplicações no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para o Sb^V dependentes do pH, pois esses complexos são estáveis em pH neutro e sofrem dissociação em pH ácido. Essa propriedade peculiar se aplica a outros complexos antimoniais pentavalentes, tal como o antimoniato de meglumina, e isso contribui para suas propriedades farmacológicas.

O Sb^V -A, que assim como Sb^V -G, é um complexo Sb^V -purínico, mostrou-se tóxico para macrófagos, corroborando com o modelo de ação proposto por Demicheli *et al.*, (2005). Observamos que o Sb^V -A apresentou atividade anti-amastigota quando comparado ao controle sem droga, mas esta atividade não foi significativa em comparação ao Sb^V livre e aos demais complexos Sb^V -ribonucleosídeos, tanto em macrófagos infectados com promastigotas, quanto com amastigotas. O fato da ação anti-amastigota entre Sb^V -A e o antimoniato livre não diferirem entre si, não contradiz tal modelo. Se o Sb^V forma complexos com ribonucleosídeos dentro da célula, o que pudemos observar foi que a complexação prévia do Sb^V com o ribonucleosídeo adenosina, diminuiu a citotoxicidade do antimoniato para macrófagos em algumas concentrações, mas não potencializou a ação leishmanicida do fármaco antimonial.

Enquanto isso, a complexação do antimoniato ao ribonucleosídeo guanosina, potencializou a ação anti-amastigota do antimoniato, aumentou a incorporação de antimônio e também a citotoxicidade do fármaco para macrófagos. A citotoxicidade de Sb^V -G só não apresenta significância com relação ao antimoniato livre nas maiores concentrações dos fármacos e no maior tempo de exposição (60 e 100 μ g de Sb^V /mL no tempo de 72 horas), onde a ação de ambos os fármacos sobre os macrófagos é igual, atingindo seu ponto extremo.

Como discutido, a localização intracelular do parasito dentro do vacúolo fagolisossomal dificulta o acesso dos fármacos. A toxicidade é um problema comum aos antileishmaniais mais potentes, pela necessidade de altas doses, para que as moléculas bioativas ultrapassem as barreiras celulares e atinjam o

parasito no ambiente intracelular. O $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$, apesar de sua maior citotoxicidade em relação ao SbK livre, oferece a vantagem de ser intensamente incorporado pelos macrófagos e acumular-se no ambiente intracelular no tempo de 72 horas, como observado no ensaio de absorção atômica. Esta maior habilidade de incorporação e acúmulo intracelular de Sb^{V} em macrófagos, potencializados pela complexação do Sb^{V} com a guanosina, proporcionam uma ação anti-amastigota expressiva em doses mínimas do fármaco, não sendo necessárias altas concentrações para atingir o parasito no meio intracelular, levando-o a morte.

Vale ressaltar, que nenhum dos ligantes sem complexação prévia com o SbK , mostrou atividade anti-amastigota, o que nos leva a concluir que a ação dos fármacos, em especial a de $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$, realmente se deve a associação do Sb^{V} com o ribonucleosídeo, que atua potencializando o efeito do fármaco antimonial. Ao contrário do que observamos em nossos experimentos, Giorgio *et al.*, (1998), relataram uma ação leishmanicida do ligante guanosina em estudos com 8Br-Guanosina em macrófagos de C57BL/6 infectados com *L.amazonensis*.

Ao contrário do que ocorre em amastigotas internalizadas em macrófagos, o $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$ não é tóxico para formas promastigotas, pois como se sabe, os antimoniais pentavalentes não agem sobre as formas promastigotas que crescem em culturas axênicas (EPHROS *et al.*, 1999). Este achado contrastante entre a atividade anti-amastigota do $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-G}$ e sua ação em promastigotas de cultura, é consistente com os estudos de outros autores, que sugerem que o Sb^{V} seja uma pró-droga.

Sendo o Sb^{V} uma pró-droga, para exercer sua atividade leishmanicida, é necessária a redução de Sb^{V} para Sb^{III} (WYLLIE *et al.*; 2004), que só ocorre em amastigotas (SHAKED-MISHAN *et al.*, 2001) ou dentro do macrófago por enzimas redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2) (SERENO *et al.*, 1998, DENTON *et al.*, 2004), pelo tiol glutationa encontrado em células de mamíferos (FREZARD *et al.*, 2001), ou ainda pela formação de complexos estáveis entre o Sb^{V} e os ribonucleosídeos (DEMICHELI *et al.*, 2002).

Em um estudo “in vitro” realizado por Ephros *et al.*, (1999), foi demonstrado que a ação da N-metil glucamina em promastigotas pode ser de

73 a 271 vezes menor que em amastigotas, mostrando que a susceptibilidade ao Sb^V é estágio específica. Este achado também corrobora nossos resultados encontrados nos experimentos de citotoxicidade (MTT) para promastigotas e de atividade anti-amastigota dos compostos contendo Sb^V .

Quanto ao parasito, embora também utilize pirimidinas em seu metabolismo, essas não são tão imprescindíveis para a sua sobrevivência como são as purinas. Devido à referida necessidade vital de purinas, o parasito internaliza mais facilmente os complexos Sb^V -purínicos, que conseqüentemente tornam-se mais ativos quando comparados aos Sb^V -pirimidínicos (Gráficos 2 A e B).

Por outro lado, o Sb^V -G e o Sb^V -A, consistem em complexos compostos por uma molécula de SbK ligada através de uma ribose, à uma base purínica guanina e a uma base purínica adenina, respectivamente. Sabe-se que os nucleosídeos purínicos, ao contrário dos pirimidínicos, são essenciais para a sobrevivência de *Leishmania*, fato que pode explicar a promoção significativa do crescimento de promastigotas em cultura, na presença dos compostos Sb^V -purínicos e não na presença de complexos Sb^V -pirimidínicos e drogas de referência.

Para a utilização das purinas pelas promastigotas, a ligação covalente dos ribonucleosídeos purínicos com o antimoniato poderia ser clivada por enzimas do parasito, ou mesmo a acidificação do pH que acontece ao longo do crescimento dos parasitos em cultura poderia dissociar os complexos. A dissociação dos complexos permitiria a utilização das purinas no metabolismo do parasito, promovendo o crescimento das promastigotas, como observado no ensaio de citotoxicidade em promastigotas. Enquanto isso, como é sabido, o antimoniato presente no meio, então dissociado das bases purínicas, não age promovendo, tampouco inibindo o crescimento dos parasitos, uma vez que promastigotas são incapazes de metabolizá-lo.

Embora os transportadores de nucleosídeos sejam diferentes para guanina e adenina em parasitos (LdNT1 reconhecem adenosina e nucleosídeos pirimidínicos e LdNT2, mediam o transporte de inosina e guanosina), tanto Sb^V -A quanto Sb^V -G estimulam o crescimento de formas promastigotas. O Sb^V -G promove o crescimento de promastigotas provavelmente devido a presença da base purínica, é altamente incorporado

por macrófagos e exerce atividade anti-amastigota, enquanto o Sb^V-A que é um composto da mesma categoria Sb^V-purínico, também capaz de estimular o crescimento de promastigotas, não é incorporado de maneira significativa por macrófagos e não possui ação anti-amastigota que sobressaia a ação do antimoniato livre.

A via envolvida na captação de adenosina no parasito é única e difere significativamente entre promastigotas e amastigotas. Durante o processo de transformação do parasito, é alterada a atividade de um grande número de proteínas e/ou enzimas. Por exemplo, a adenosina Cinase (AdK) que está envolvida na rota de captura de purinas, é estrategicamente importante na quimioterapia. Esta enzima fosforila adenosina a AMP e mostra um padrão de atividade estágio específico entre promastigotas e amastigotas. Promastigotas expressam adenina deaminase, que deamina adenina a hipoxantina, enquanto as amastigotas, assim como as células de mamíferos, expressam adenosina deaminase, que deamina adenosina a inosina (KOUNI, 2003). Além de diferentes transportadores para adenosina e guanósina em células de mamíferos, os diferentes perfis enzimáticos entre amastigotas e promastigotas também podem estar envolvidos na maior ação anti-amastigota do Sb^V-G comparada a do Sb^V-A.

Além disso, estudos demonstram que a adenosina extracelular aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em monócitos (LINK *et al.*, 2000) A ativação de receptores de adenosina também produz efeitos anti-oxidantes, além, da adenosina inibir a produção de superóxido em macrófagos ativado (SI *et al.*,1997). Sabe-se que as citocinas envolvidas na resposta efetiva anti-*Leishmania* são principalmente IL-12 e IL-2, que direcionam uma resposta celular do tipo Th1 protetora, enquanto citocinas IL-4 e IL10 direcionam uma resposta celular do tipo Th2, não protetora. A produção de reativos do oxigênio por macrófagos é essencial para provocar a morte dos parasitos intracelulares como *Leishmania*, e a inibição da produção de superóxido induzida pela ativação dos receptores de adenosina poderia prejudicar a célula na resposta contra o parasito. Contudo, de acordo com Kouni, (2003), a infecção também altera a permeabilidade e o metabolismo de purinas na célula parasitada, o que pode interferir na ação dos diferentes complexos Sb^V- purínicos.

Ribonucleosídeos de guanósina e o modelo *Leishmania*, são capazes de

ativar macrófagos, isto é, induzem nessas células a produção de metabólitos tóxicos, os reativos de oxigênio, como o ânion superóxido. Esse processo de ativação de macrófagos e produção de reativos de oxigênio é denominado “burst oxidativo” (NOSSAL, 1993). Enquanto a atividade de ribonucleosídeos de guanosina estimula células do sistema imune, os ribonucleosídeos de adenosina estão relacionados a inibição das funções imunes (GOODMAN 1991, BONNET e ROBINS, 1993). Isso poderia explicar a maior ação anti-amastigota do Sb^V -G, com relação a Sb^V -A, embora não tenhamos estudado o mecanismo de ação desses compostos sobre macrófagos infectados.

Pathak e Yi em 2001, já haviam mostrado que o Sb^V (mas não o Sb^{III}) é um potente inibidor da tirosina fosfatase, uma proteína do hospedeiro, levando a um aumento na resposta às citocinas. Este resultado sugere que Sb^V , pode matar os parasitos por ambos os métodos, direto e indireto e que a ativação da resposta do hospedeiro está implicada na atividade anti-amastigota de Sb^V . Esta é uma possibilidade que pode ser explorada para se entender o mecanismo de ação do Sb^V .

O quadro 7, mostra os prováveis mecanismos de ação que propusemos para o composto Sb^V -G:

	Prováveis mecanismos pelos quais Sb^V-G atinge amastigotas dentro dos macrófagos
1	Aumento da captura de Sb^V por macrófagos
2	Aumento da captura de guanosina por macrófagos
3	Interferência na via de salvação de purinas
4	Ativação de macrófagos pela guanosina

Quadro 7- Prováveis mecanismo pelos quais Sb^V -G atinge amastigotas dentro dos macrófagos

Nossos resultados demonstram que a atividade de Sb^V -G é promissora e estimula futuros estudos com este complexo Sb^V -purínico. Além do tratamento da leishmaniose visceral, a formação do hidrogel, sugere um grande potencial para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Assim, o desenvolvimento racional de fármacos, inclui o grupo dos complexos Sb^V -ribonucleosídeos aqui estudados.

9. CONCLUSÃO

Pela primeira vez é mostrada a influência das nucleobases sobre a citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexos Sb^{V} -ribonucleosídeos.

A complexação do antimoniato a ribonucleosídeos diminui a citotoxicidade do antimônio (exceto em Sb^{V} -guanosina). A complexação do antimoniato com a guanosina [Sb^{V} -G], embora aumente a citotoxicidade do antimoniato, potencializa a incorporação de antimônio por macrófagos e a ação anti-*Leishmania* do fármaco antimonial, e assim pode ser utilizado com maior eficácia em doses menores respeitando os limites de citotoxicidade, o que os torna complexos promissores no tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar.

Os complexos Sb^{V} -pirimidínicos e o Sb^{V} -A, são descartados entre os fármacos promissores para o tratamento, por não apresentarem ação anti-*Leishmania* diferente do antimoniato livre.

Essa dissertação apresenta resultados condizentes com modelo de ação do antimônio por interação com ribonucleosídeos, proposto pelo grupo de Demicheli, mas também abre perspectivas para novos estudos, afim de elucidar o modo de ação do Sb^{V} e do Sb^{V} -G, fármaco que 'in vitro', mostrou-se um promissor anti-leishmanial, embora as condições "in vivo" sejam marcadamente diferentes.

10. PERSPECTIVAS

Encontrar um tratamento eficaz e mais barato é extremamente necessário (COOK *et al.*, 1993). O grupo de pesquisas que se formou na UFMG- (ICEX e ICB), tem enfoque multidisciplinar, combinando diversas metodologias como biologia celular, biologia molecular, sobretudo a pós-genômica, parasitologia, bioquímica, interatômica e bioinformática, com o objetivo de desenhar drogas com base na estrutura de compostos líderes e modificações de compostos já ativos.

Tendo em vista os resultados satisfatórios de Sb^V-G, quanto à potencialização da incorporação de Sb^V em macrófagos e a atividade anti-amastigota do fármaco, são perspectivas testes “in vivo” com o Sb^V-G em hamsters experimentalmente infectados por *L. chagasi* e posteriormente em cães naturalmente infectados. Considerando a formação do hidrogel de Sb^V-G, para estes testes o composto será encapsulado em lipossomas e inicialmente será administrado nos animais por via parenteral.

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de se encontrar um tratamento local efetivo, especificamente para casos da LTA. A eficácia anti-amastigota do Sb^V-G, somada ao fato das nanopartículas deste complexo associarem-se na forma de um hidrogel, abrem perspectiva para o tratamento tópico da leishmaniose tegumentar. O tratamento local desta forma da doença, é atraente pela facilidade da administração do fármaco e porque o alcance deste na circulação sistêmica e, por conseguinte, sua toxicidade, devem ser menores (BERMAN, 1997). Portanto, são perspectivas, novos estudos com o intuito de avaliar a eficácia terapêutica do Sb^V-G em *Leishmania amazonensis* através de testes “in vitro”, e “in vivo” utilizando o composto em gel no tratamento tópico em modelos murinos.

Uma premissa é analisar as hipóteses dos possíveis mecanismos de ação que podem estar envolvidos na maior atividade de Sb^V-G. Para tal avaliação, podemos analisar o efeito da guanosina na produção de óxido nítrico a partir de ensaios “in vitro” de dosagem de óxido nítrico em macrófagos infectados e não infectados, expostos ao Sb^V-G. Ainda como futuros ensaios “in

vitro”, fazem parte de nossas perspectivas analisar o efeito do Sb^V-G em macrófagos e sua ação anti-amastigota através da microscopia eletrônica.

Outra importante perspectiva é analisar “in vivo” a resposta do hospedeiro ao tratamento Sb^V-G, a partir de exames laboratoriais como bioquímica sanguínea, hemograma e leucograma e técnicas moleculares como PCR em tempo real para determinação da carga parasitária em órgãos (LV) e lesões (LT).

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, no dia 17/02/2009 e aprovado na reunião de 01/07/2009 conforme o certificado:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 13/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade anti-leishmania in vitro de complexos Sb(V)-ribonucleosídeos em Leishmania (Leishmania) chagasi**", que tem como responsável(is) **Maria Norma Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 07/2009**.

Este certificado expira-se em **1/ 07/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 13/2009**, related to the project entitled "**Evaluation of Sb(V)-ribonucleosides complex activity in vitro in Leishmania (Leishmania) chagasi**", under the supervisors of **Maria Norma Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 1, 2009**.

This certificate expires in **July 1, 2014**.

Belo Horizonte, 24 de Agosto de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@ppq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, set. 2004.

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

BERMAN, J.D. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 397-401, oct. 2003.

BONNET, P.A., ROBINS, R.K. Modulation of leukocyte genetic expression by novel purine nucleoside analogues : a new approach to antitumor and antiviral agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.36, n.6, p.635-653, 1993.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose Visceral Grave Normas e Condutas* Brasília – DF, 2006.

BRASIL. *Manual de vigilância da LTA*, 2º ed, Brasília - DF, 2007.

CABRITA, M.A.; BALDWIN, S.A.; YOUNG, J.D.; CASS, A.E. Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochemistry and cell biology*, v.80, p.623-638, 2002.

CAIAFFA, W.T.; ALMEIDA, M.C.M.; OLIVEIRA, C.D.L.; FRICHE, A.A.L.; MATOS, S.G.; DIAS, M.A.S.; CUNHA, M.C.M.; PESSANHA, E.; PROIETTI, F.A. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 3, p. 958-967, 2005.

CARTER, S.N.; LANDFEAR, S.M.; ULMAN, B. Nucleoside transporters of parasitic protozoa. *Trends in Parasitology*. v.17, n.3, mar.2001.

CARTER, S.N; YATES, P; ARENDT, C.S; BOITZ, J.M; ULLMAN, B. Purine and Pyrimidine Metabolism in *Leishmania*. *Book: Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, v.625. Nova York, 2008

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature*, v. 5, nov. 2007.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate

or meglumine antimoniate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n.1, p. 69-72, 1988.

COOK, G.C. Leishmaniasis: Some Recent Developments in Chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Oxford, v.31, p. 327-330, 1993.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, p. 111–126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania* *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, n. 2, p. 132-141, Abr. 2002.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECCOUVEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A.; Antimony^v complex formation with adenosine nucleosides in aqueous solution, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1570, n. 192, 2002.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; LULA, I.S.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.N.; FRÉZARD, F. Pentavalente organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate. *Applied Organometallic Chemistry*, v. 17, p. 226, 2003.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Pentavalent antimonials: form chemistry to the design of new drugs. *Drug Design Reviews - Online*, v. 2, n. 3, p. 243-249, mai. 2005.

DEMICHELI, C.; SANTOS, L.S.; FERREIRA, C.S.; BOUCHEMAL, N.; HANTZ, E.; EBERLIN, N.M.; FREZARD, F. Synthesis and characterization of Sb^v-adenosine and Sb^v-guanosine complexes in aqueous solution, *Inorgânica Chimica Acta*, v. 359, p. 159, 2006.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G.H. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. *The Biochemical Journal*, v. 381, p. 405-412, 15. jul. 2004.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; RABELO, J.M.M. Fonte alimentar sanguinea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Pschycodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Publica do Rio de Janeiro*, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology Intrenational*, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

DZAMITIKA, S. A.; FALCÃO, C. A.; OLIVEIRA, F. B.; MARBEUF, C.; GARNIER-SUILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FRÉZARD, F. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, n.3, p. 217 – 24, 2006.

EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania donovani* Axenic Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n.2, p. 278-282, Feb. 1999

ESLAMI, Z.; TANNER, C. Time course and intensity of infection *in vitro* in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* promastigotes. *International Journal for Parasitology*, v. 24, n. 5, p.743-747, 1994.

FELICETTI, S.A.; THOMAS, R.G.; MCCLELLAN, R.O. Metabolism of Two Valence States of Inhaled Antimony in Hamsters. *American Industrial Hygiene Association Journal*, v. 35, n. 5, p. 292 – 300, Mai.1974.

FERREIRA, C.S.; PIMENTA, A.M.C.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. *Biometals*, v. 19, p. 573 - 581, 2006.

FERREIRA, C.S. *Complexo de antimônio^v com ribonucleosídeos: síntese, estudo de mecanismo de ação e potencial terapêutico*. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Minas Gerais: 167p, 2008.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALES, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Annals of internal medicine*, v. 113, p. 934–940, 1990.

FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.S.; COSTA, M.A.P. Glucathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 913-916, mar. 2001.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D.; ROCHA, O.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova* [online], v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FUSAI, T.; DURAND, R.; BOULARD, Y.; PAUL, M.; BORIES, C.; RIVOLLET, D.; HOUIN, R.; DENIAU, M. Importance of drug carriers in the treatment of visceral leishmaniasis. *Médecine tropicale : revue du Corps de santé colonial*, v. 55, n. 1, p. 73-8, 1995.

GIORGIO, S.; BARÃO, S.C, AUGUSTO, O.; KWEE, J.K. *Leishmania amazonensis* infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. *Acta Tropica*, v.70, n.1, p. 119-122, jun. 1998.

GIORGIO, S.; BARÃO, S.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.v.40, n.4, p.237-40, 1998.

- GOODMAN, M.G. Cellular and biochemical studies of substituted guanine ribonucleoside immunostimulants. *Immunopharmacology*, v.21, n.1, p. 51-68, Jan-Fev. 1991.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, set. 2004.
- HERWALDT, B. Leishmaniasis. *Lancet*, London, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *The New England journal of medicine*, v. 341, n. 24, p. 1795-800, 9. dez. 1999.
- KONG, W.; ENGEL, K.; WANG, J. Mammalian Nucleoside Transporters. *Current Drug Metabolism*, v. 5, n. 1, p63 - 84, 2004.
- KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic target in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 99, n. 3, p.283 - 309, set. 2003.
- LAINSON R, RANGEL E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811 – 827, 2005.
- LANDFEAR, M.S.; ULLMAN, B.; CARTER, S.C.; SANCHEZ, A.M. Nucleoside and nucleobase transporters in Parasitic Protozoa. *American Society of Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 245 - 254, 2004.
- LINK A.A., KINO. T, WORTH, J.A, MCGUIRE, J.L, CRANE, M.L GEORGE P. CHROUSOS, G.P WILDER, R. L AND. ELENKOV, I. J. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 1, p.436 - 442, 2000.
- LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, v. 69, n. 2, p. 593, 1997.
- LUGO, A.; ANEZ, N.; PETIT DE PENA, Y.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. Antimony determination in tissues and serum of hamsters infected with meglumine antimoniate. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 88, p. 37-41, 1994.
- MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, dez. 2008.
- MARR, J.J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, v. 118, n. 2, p. 111 - 9, 1991.

MARR, J.J.; BERENS, R.L. Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 7, p. 339 - 356, abr. 1983.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("Espundia", Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n.6, p. 859 - 76, 1986.

MAYRINK W, BOTELHO AC, MAGALHÃES PA, BATISTA SM, LIMA ADE O, GENARO O, COSTA CA, MELO MN, MICHALICK MS, WILLIAMS P, DIAS M, CAIAFFA WT, NASCIMENTO E, MACHADO-COELHO GL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.1, 2006.

MEYERHOFF, A. U.S. Food and Drug Administration Approval of AmBisome (Liposomal Amphotericin B) for Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, p. 42 – 8, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D.N e MILES, S.A. Avoidance of innate immune mechanisms by the protozoan parasites, *Leishmania* spp. In: DENKERS, E.Y e Gazzinelli, R.T. *Protozoans in Macrophages*, Landes Bioscience, p. 118 - 124, 2007.

NWAKA, S.; RIDLEY, R.G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public–private partnerships. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 2, n. 11, p. 919 - 928, nov. 2003.

NOGUEIRA, L.S.C., SAMPAIO, R.N.R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 76, p. 51-62, 2001.

NOSSAL, G.J.V. Life, death and the immune system. *Scientific American*, v. 269, n. 3, p. 20 - 30, set.1993.

OLIVEIRA, C.D.L.; MORAIS, M.H.F.; COELHO, G.L.L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities:challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, dez. 2008.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection, Ethiopia, Addis Ababa, p.20–22, Mar.2007. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2008.

ORTIZ, D.; SANCHEZ, M.A.; KOCH, H.P.; LARSSON, H.P.; LANDFEAR, S.M. An acid-activated nucleobase transporter from *Leishmania major*. *The journal of biological chemistry*, v. 12, n. 24, p. 16164 - 9, Jun.2009.

OSTROSKY-ZEICHMER, L.; MARR, K.A.; REX, J.H.; COHEN, S.H. Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clinical Infectious Diseases [S.l.]*, v. 37, p. 415 - 425, 2003.

PATHAK, M.N e YI, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *Journal of Immunology*, v. 167, p. 3391 - 3397, 2001.

PEARSON, R.D.; HARCUS, J.L.; ROBERTS, D.; DONOWITZ, G.R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *Journal of Immunology*, n. 131, p. 1994 - 9, 1983.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science*, v. 108, n. 12, p.3715 - 24, Dez. 1995.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, ago. 2008.

PHAM, N.K.; MOURIZ, J.; KIMA, P.E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infection Immunity*, v. 73, p. 8322 - 33, 2005.

PISCOPO, T.V.; MALLIA, A.C. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*; v. 82, p. 649-657. 2006.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quimica Nova*, v. 26, n. 4, p. 550 - 555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* v. 7, n. 9, p. 581 – 596, set. 2007.

ROBERTS, W.L.; RAINEY, P.M. Antimony quantification in *Leishmania* by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 211, n. 1, p. 1-6, 15. mai. 1993.

SACKS, D.L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious Agents and Disease*, v. 1, n. 4, p. 200 - 6, Ago. 1992.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; DE PAIVA, H.M.; DE FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral leishmaniasis. *Medical and veterinary Entomology*, v. 12, p. 315 - 317, 1998.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUNI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically grown amastigotes of leishmania infantum used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 42, n. 12 p. 3097 - 3102, dez. 1998.

SHAKED-MISHAN, P.; ULRICH, N.; EPHROS, M.; ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*, *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, fev. 2001.

SHAW, J.J. New world leishmaniasis: the ecology leishmaniasis and diversity of leishmanial species in Central and South America. Farrel,J. (ED) World Class Parasites: *Leishmania* Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2003.

SI, Q.S., NAKAMURA,Y.; KATAOKA,K. Adenosine inhibits superoxide production in rat peritoneal macrophages via elevation of cAMP level. *Immunopharmacology*, v. 36, n.1, p.1-7, Abr. 1997.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazon Brazil – a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, mai, 2004.

SILVERMAN, R.B. The organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. *Academic Press*: London, 1992.

SINAN – Sistema de Informacao de agravos e Notificacoes, 2006 Disponivel em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=RelatoriosGerenciais>>. Acesso em: 09 dez. 2008).

SOLER, C.; GÁRCIA-MANTEIGA, J.; VALDÉS, R.; XAUS, J.; COMALADA, M.; CASADO, F.J.; PASTOR-ANGLADA, M.; GELADA, A.; FELIPE, A. Macrophage require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *The FASEB Journal*, v.15, p. 1979 -1987, set, 2001.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; ANDRADE, H.F. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 60 – 68, 2004.

YARDLEY, V.; ORTUNO, N.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; DONCKER, S.D.; RAMIREZ, L.; CROFT, S.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; BERMUDEZ, H.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J.C. American tegumentary leishmaniasis: is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility?, *The Journal of infectious diseases*, v. 194, p. 1168 – 1175,.set. 2006.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, N. 38, p. 39925–39932, 2004.

12. ANEXO

➤ **Publicação oriunda do presente trabalho**

Artigo aceito pelo *Journal of the Brazilian Chemical Society* para publicação na edição de março de 2010[REF. 639/09V2]:

FERREIRA, C.S.; ROCHA, I.C.M.; NETO, R.L.M.; MELO, M.N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes.

Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^{V} -ribonucleoside complexes

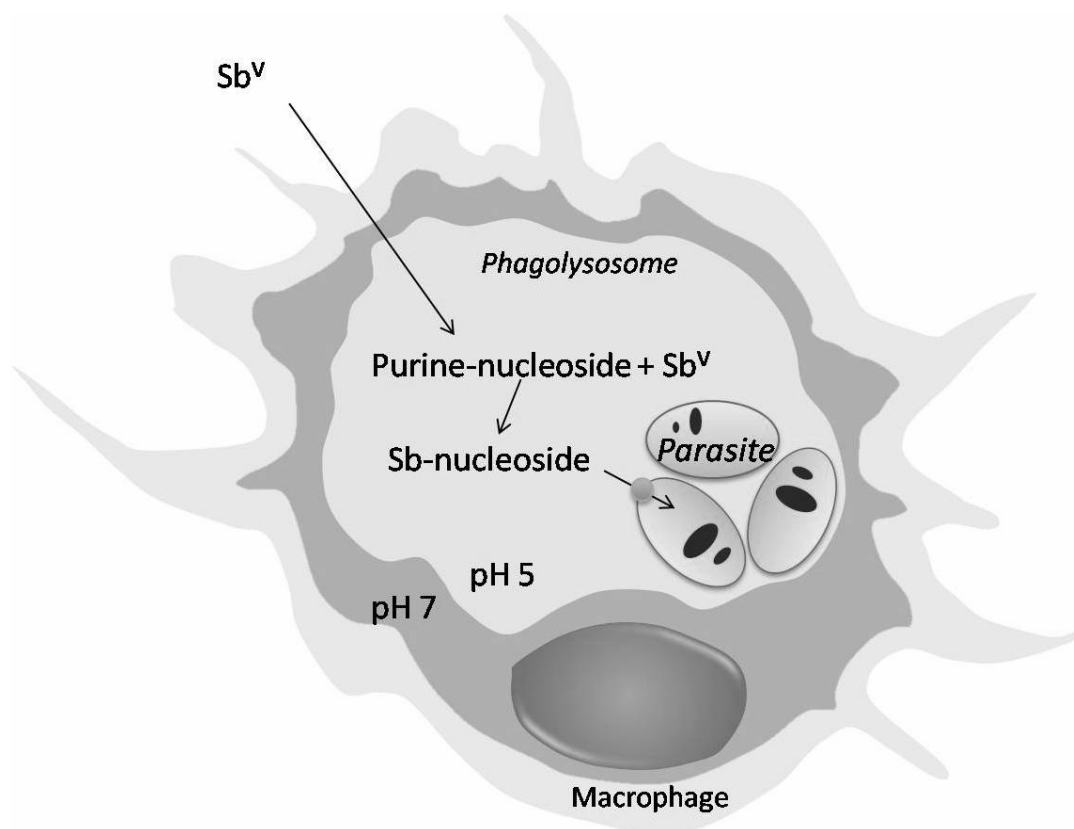
Cláudio S. Ferreira,^{a,b} Iara C. M. da Rocha,^c Rubens L. M. Neto,^b Maria N. Melo,^c

Frédéric Frézard^b and Cynthia Demichel^{1,a}

^aDepartamento de Química, ICEX, ^bDepartamento de Fisiologia e Biofísica, ICB and

^cDepartamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av.

Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brazil.



¹ demichel@netuno.lcc.ufmg.br

Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes

Resumo

A influência da nucleobase (uracila, U; citosina, C; adenina, A; guanina, G) nas propriedades físico-químicas e atividades biológicas “*in vitro*” dos complexos Sb^V-ribonucleosídeo foi investigada. Os complexos 1:1 Sb-U e Sb-C foram obtidos no estado sólido e caracterizados por RMN, ESI-MS e análise elementar. As constantes de estabilidade e as constantes aparentes de velocidade de formação e dissociação dos complexos 1:1 Sb-U, Sb-C e Sb-A foram determinadas. Embora o Sb^V se ligue através dos mesmos átomos de oxigênio das posições 2' e 3' nos diferentes nucleosídeos, as mudanças conformacionais na ribose e as propriedades físico-químicas do complexo dependem da nucleobase. A nucleobase influenciou fortemente as atividades citotóxica e leishmanicida dos complexos Sb^V-ribonucleosídeo. Os complexos Sb^V-nucleosídeos purínicos foram mais citotóxicos e eficazes contra a *Leishmania chagasi* do que os pirimidínicos, o que reforça o modelo de que a interação do Sb^V com os nucleosídeos purínicos pode mediar a atividade dos medicamentos antimoniais.

Abstract

The influence of the nucleobase (uracyl, U; cytosine, C; adenine, A; guanine, G) on the physicochemical characteristics and *in vitro* biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes, has been investigated. The 1:1 Sb-U and Sb-C complexes were characterized by NMR spectroscopy, ESI-MS and elemental analysis. The stability constant and apparent association and dissociation rate constants of 1:1 Sb^V-U, Sb^V-C and Sb^V-A complexes were determined. Although Sb^V most probably binds via oxygen atoms to the same 2' and 3' positions in the different nucleosides, the ribose

conformational changes and the physicochemical characteristics of the complex depended on the nucleobase. The nucleobase had a strong influence on the cytotoxicity against macrophages and antileishmanial activity of the Sb^{V} -ribonucleoside complex. The Sb^{V} -purine complexes were more cytotoxic and more effective against *Leishmania chagasi* than the Sb^{V} -pyrimidine complexes, supporting the model that the interaction of Sb^{V} with purine nucleosides may mediate the antileishmanial activity of pentavalent antimonial drugs.

Keywords: antimony, kinetics, nucleosides, cytotoxicity, leishmaniasis

Introduction

The pentavalent organoantimonial complexes, meglumine antimoniate (MA) and sodium stibogluconate, are the first line drugs for the treatment of all forms of leishmaniasis. Despite their clinical use for more than half a century, the mode of action of these drugs remains poorly understood.¹ It is still not clear whether the final active form of pentavalent antimonials is Sb^{V} or Sb^{III} .

According to a first model, Sb^{V} would behave as a prodrug, that is reduced within the organism into more toxic and active Sb^{III} .²

On the other hand, the formation of 1:1 and 1:2 Sb^{V} -ribonucleoside complexes was evidenced by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), *nuclear magnetic resonance* (NMR) and circular dichroism,³⁻⁶ suggesting the involvement of these complexes in the mode of action of pentavalent antimonials. The two different 1:1 and 1:2 Sb^{V} -adenosine complexes were obtained individually and characterized in the solid state.⁵ Moreover, Sb^{V} was found to react with guanosine forming a hydrogel containing a mixture of 1:1 and 1:2 Sb^{V} -guanosine complexes. The failure to detect any complexes between Sb^{V} and 2'-deoxyadenosine, adenosine-3,5-cyclic monophosphate, 2'-

deoxyribose, using HPLC–ES–MS and HPLC–ICP–MS analyses, supported the specific binding of Sb^{V} to vicinal 2'- and 3'-hydroxyl groups.^{3,5}

Kinetic and thermodynamic characterization of the reaction of Sb^{V} with 5'-GMP showed that complexation was faster at acidic pH,⁴ indicating that it would be kinetically favored in the acidic biological compartments in which *Leishmania* parasite resides. Moreover, the value of stability constant determined for the 1:1 Sb^{V} -5'-GMP complex⁴ is consistent with the formation of such complex in the vertebrate host following treatment with pentavalent antimonial drugs, especially if one considers the high accumulation and prolonged retention of antimony in macrophages⁷ which harbor *Leishmania* parasites. Another remarkable property of Sb^{V} -5'-GMP complexes is their slower dissociation rate constant in aqueous solutions at neutral pH.⁴

A model has been suggested for the possible involvement of Sb^{V} -nucleoside complex in the leishmanicidal action of pentavalent antimonials. Since *Leishmania* is a true auxotroph for purine, it was proposed that Sb^{V} -purine nucleoside derivatives may inhibit *Leishmania* purine transporters or act as potent enzyme inhibitors of the purine salvage pathway, as already reported in the case of other purine analogs.⁸

Although much progress has been achieved regarding the physicochemical characterization of Sb^{V} -ribonucleoside complexes, their pharmacological relevance and the possible influence of the nucleobase on their physicochemical and biological actions still have to be investigated.

This paper reports the influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics, as well as the cytotoxicity and *in vitro* antileishmanial activity of Sb^{V} -ribonucleoside complexes.

Experimental

Materials

Cytidine (C) and uridine (U), adenosine (A) and guanosine (G) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Potassium antimoniate ($[\text{KSb}(\text{OH})_6]$) was obtained from Fluka Chemie GmbH (> 99% purity). SbCl_5 (99%) and N-methyl-D-glucamine (99%) were obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis). All other reagents were of at least reagent grade. Double-distilled-deionized water was used throughout all the experiments.

General experimental techniques

C, H and N analyses were carried out using a Perkin– Elmer 240 Elemental Analyzer. Antimony content was determined by atomic absorption using a HITACHI Z 8200 spectrophotometer. Sb and K were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Perkin Elmer plasma emission spectrometer, model Optima 3000. The content of crystallization water molecules of the synthetic products was determined by thermogravimetry (TG) using a Shimadzu TGA-50 instrument operating under a nitrogen atmosphere.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Brüker DRX400-AVANCE (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz) spectrometer using D_2O as solvent and TMS(3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt) as an internal reference. Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (HMBC) and Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMQC) spectra for C, U and their complex with Sb^{V} were obtained in D_2O . Standard pulse sequences were used for homo- and heteronuclear correlation experiments. The proportions of each species (free ribonucleoside (Rb) and 1:1 Sb–Rb complex) were calculated by integration of the ^1H NMR signals corresponding to H-6. The chemical shift for the H-6 of U was assigned according to previous reference.⁹

ESI-MS analyses were performed on a 2000 QTrap Applied Biosystem mass spectrometer. ESI-MS was acquired in the negative mode using H₂O/CH₃OH (1:1, v/v) solutions of each compound and spraying the solution mixture through the ESI source at 25°C. Values of *m/z* are reported for the principal ion, that is, for the most abundant isotopomer of the cluster ion.

Preparation of the Sb^V-C and Sb^V-U complexes in the solid state

About 0.9 mmol of ribonucleoside was dissolved in 15 mL of water and 0.45 mmol of [KSb(OH)₆] was added to this solution. The pH of the mixture was adjusted to 7.0 and the solution was kept under stirring at 25°C. After 24 h, a white precipitate was formed. This precipitate was washed with acetone and dried over CaCl₂. A reaction yield of 30-40% was determined.

Sb^V-cytidine complex (Found: C, 20.69; H, 3.84; N, 8.02; Sb, 23.50; K, 7.86%. Calc. for C₉H₁₅KN₃O₉Sb (C₉H₁₅KN₃O₉Sb + 3.0H₂O): C, 20.61; H, 4.00; N, 8.01; Sb, 23.22; K, 7.50. mp 225°C (water).

Sb^V-uridine complex (Found: C, 21.60; H, 3.39; N, 5.40; Sb, 24.04; K, 7.67%. Calc. for C₉H₁₄KN₂O₁₀Sb (C₉H₁₄KN₂O₁₀Sb + 1.7H₂O): C, 21.53; H, 3.48; N, 5.58; Sb, 24.18; K, 7.76. mp 225 °C (water).

Preparation of meglumine antimoniate, Sb^V-adenosine (Sb^V-A) complex and Sb^V-guanosine (Sb^V-G) hydrogel

Meglumine antimoniate was synthesized, according to Demicheli *et al.*¹⁰ from an equimolar mixture in water of N-methyl-D-glucamine and freshly precipitated and hydrated antimony pentoxide obtained from SbCl₅ previously hydrolyzed in water. After precipitation with acetone, the resulting product was dried. Meglumine antimoniate product contained 29% of Sb by weight which corresponds to the expected

theoretical value for 1:1 Sb–N-methyl-D-glucamine complex $[C_7H_{17}NO_5 \cdot HSbO_3 \cdot 3H_2O]$.

The 1:1 Sb^V-A complex was obtained in the solid state, as described previously,⁵ with a reaction yield of 20-25%.

The Sb^V-G hydrogel was prepared as reported previously.⁵ Briefly, G and $[KSb(OH)_6]$ were co-dissolved in H₂O at 1:0.75 molar ratio, the pH was adjusted to 5 and the resulting mixture was kept under stirring at 60°C for 1.5 h. After cooling at 25°C, a translucent hydrogel was obtained.

Formation rate constant of 1:1 Sb^V-ribonucleoside complexes

The initial rates of complex formation (V_i) were calculated from the concentration of complex formed after 5 min of reaction between potassium antimoniate and the ribonucleoside in D₂O. The complex concentration was determined through integration of ¹H NMR signals corresponding to H-6. All aqueous solutions (D₂O) contained 0.1 mol L⁻¹ KCl, the pD was adjusted to 6.5 using DCl or NaOD and reaction was run at 37°C. The value of pD was obtained from pH measurements and calculated as: $pD = pH + 0.4$.¹¹

The concentrations of nucleoside and antimony were typically either 10 or 20 mmol L⁻¹. It was verified that, in these initial conditions of reaction, the amount of complex formed did not exceed 15% of the total complex amount at equilibrium. Data were determined as the mean value obtained from three independent experiments.

In the case of cytidine, the reaction partial orders, n and m, with respect to nucleoside (Rb) and Sb, respectively, were determined according to the following equations:

$$V_i = k_f [Rb]^n [Sb]^m \quad (1)$$

$$\ln V_i = n \ln [Rb] + m \ln [Sb] + \ln k_f \quad (2)$$

where [Rb] = initial molar concentration of nucleoside, [Sb] = initial molar concentration of Sb and k_f = apparent rate constant of complex formation.

The reaction of cytidine with potassium antimoniate was run in three different conditions:

experiment 1: [Rb] = 5 mmol L⁻¹ and [Sb] = 10 mmol L⁻¹

experiment 2: [Rb] = 20 mmol L⁻¹ and [Sb] = 20 mmol L⁻¹

experiment 3: [Rb] = 20 mmol L⁻¹ and [Sb] = 10 mmol L⁻¹

From the results of experiments 1 and 3 and equation (2), the reaction partial order n was determined as $n = 1.0 \pm 0.2$

From the results of experiments 2 and 3 and equation (2), the reaction partial order m was determined as $m = 0.9 \pm 0.2$

According to these results, k_f could be determined from equation:

$$V_i = k_f[\text{Rb}][\text{Sb}] \quad (3)$$

k_f was determined for each nucleoside (C, U and A) using equation (3), as the mean value obtained from three independent experiments.

Dissociation rate constant of 1:1 Sb^V-ribonucleoside complexes

First, 1:1 Sb^V-nucleoside complexes (Sb^V-C, Sb^V-U, Sb^V-A or Sb^V-G) were formed through incubation of 20 mmol L⁻¹ nucleoside with 20 mmol L⁻¹ potassium antimoniate for 2 h at 60°C at pD 6.5.

Dissociation was induced by diluting the mixture from 20 to 1 mmol L⁻¹ nucleoside concentration in D₂O containing 0.1 mol L⁻¹ KCl. The decrease of the complex concentration was then followed as a function of time (0, 2 h, 4 h, 24 h) at 37°C and pD 6.5.

The apparent rate constant of complex dissociation (k_d) was determined from the following equation:

$$\ln[\text{SbL}] = k_d t + \ln[\text{SbL}]_0 \quad (4)$$

Where $[\text{SbL}]$ and $[\text{SbL}]_0$ are the molar concentration of the 1:1 complex at time t and time zero, respectively.

$[\text{SbL}]$ was calculated through integration of ^1H NMR signals corresponding to H-6.

k_d was determined for each nucleoside, as the mean value obtained from three independent experiments.

Stability constant for 1:1 Sb^V-ribonucleoside complexes

Potassium antimoniate and nucleoside (C, U or A) were incubated in D_2O containing 0.1 mol L^{-1} KCl at 37°C and pD 6.5 and the reaction was run until equilibrium as evidenced by ^1H NMR.

The nucleoside and antimony concentrations were typically in the range of 1 to 2 mmol L^{-1} . The stability constant (K) was determined from the following equation:

$$K = [\text{SbL}]/[\text{Sb}][\text{L}] \quad (5)$$

Where $[\text{Sb}]$ and $[\text{L}]$ are the molar concentrations of free (non-complexed) antimoniate and nucleoside.

$[\text{SbL}]$ and $[\text{L}]$ were calculated through integration of ^1H NMR signals corresponding to H-6. K was determined for each nucleoside, as the mean value obtained from three independent experiments.

Biological assays of 1:1 Sb^V-ribonucleoside complexes

Parasites and animals

Leishmania (leishmania) chagasi (MCAN/BR/2002/BH400) strain was maintained in hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected and cryopreserved in the bank of strains (*Leishmania* Biology Laboratory / UFMG-Brazil). The *Leishmania (leishmania) chagasi* (MCAN/BR/2002/BH400) amastigotes used in the present study

were obtained from the spleen of hamsters experimentally infected. The spleen was ground in RPMI-1640 (Cultilab, Brazil) with the aid of a Tissue Grinder and filtered through a thin nylon. The material was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes (Centrifuge Hermle, 2323 K) and then subjected to lysis solution for 10 minutes at 37°C. The resulting suspension was centrifuged and the amastigotes were suspended in RPMI-1640 (Cultilab, Brazil) supplemented by 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU mL⁻¹ penicillin and 100 µg mL⁻¹ streptomycin.

Balb/c mice (male, 6-8 weeks) were obtained from Cebio (Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais). Free access was allowed to standard diet and tap water was supplied *ad libidum*.

Cytotoxicity assay (MTT assay)

The MTT assay is a semi-automated assay based on the ability of viable cells reduce the tetrazolium salt MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] into a colored product formazan by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. The original protocol was described by Mosmann, 1983.¹² Thioglycollate (Gibco®) elicited peritoneal macrophages of Balb/c mice were harvested in RPMI 1640 medium (Cultilab, Brazil). Cells were plated in 96-well plates TPP, Switzerland®), in RPMI medium supplemented with 10% FBS, and allowed to adhere for 4h at 37°C in 5% CO₂. The non-adherent cells were then removed by washing with RPMI medium, and the macrophages which adhered to the plates were then treated with Sb^V-ribonucleosides complexes, meglumine antimoniate or antimoniate at Sb concentrations varying from 10 to 100 µg mL⁻¹ for 72 h at 37°C under 5% CO₂. At the end of the period of incubation, 10µL of MTT (Sigma®) was added to each well and plates were incubated for 4h at 37°C in 5%CO₂. Enzyme reaction was then stopped by the addition of 100µL of dimethylsulfoxide (DMSO) solvent. Relative optical density

(OD) was then measured at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometer (ELISA reader).^{13,14}

Anti-amastigote activity

Resident peritoneal cells from Balb/c mice were plated onto 13 mm² coverslips inside 24-well plates (TPP, Switzerland[®]) and allowed to adhere for 4 h at 37°C in 5% CO₂. The macrophages adhered to the coverslips were infected with *Leishmania chagasi* as described previously.¹⁵ Amastigotes obtained from the spleen of experimentally infected hamsters were incubated with adhered macrophages to 2 h at 37°C, 5% CO₂, at a parasite/macrophage ratio of 10:1.¹⁵ After incubation period, non-adherent cells and free parasites were removed by washing with RPMI medium, and the culture was treated with Sb^V-ribonucleosides complexes, meglumine antimoniate or [KSb(OH)₆], at 10 µg mL⁻¹ or 30 µg mL⁻¹ of Sb for 72 h at 37°C in 5% CO₂. Subsequently, the coverslips were removed from wells, stained with Laborclin[®] and fixed to a slide with Canada Balsam (Vetec[®]). The number of amastigotes/macrophages and infected cells was determined by counting at least 300 macrophages in duplicates cultures, and the results were expressed as percentage of survival in comparison to that of the controls.

Results and Discussion

Physicochemical characterization of Sb^V-ribonucleoside complexes

The reaction of [KSb(OH)₆] with cytidine (C) and uridine (U) led to the formation of 1:1 Sb^V-ribonucleoside complexes that were isolated in the solid state.

ESI-MS analyses of these complexes in the negative mode revealed major ions at m/z 430 and 431 which can be assigned to $[\text{SbU}(\text{OH})_4]^-$ and $[\text{SbC}(\text{OH})_4]^-$, respectively (supplementary information).

Insert figure 1

The two new complexes (Figure 1) were further characterized by ^1H and ^{13}C NMR. Table 1 and Table 2 display the attribution of ^1H and ^{13}C NMR resonances for $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$ and $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$ complexes. The assignment of NMR resonance was achieved using HMBC and HMQC analyses, as illustrated for $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$ complex in Figure 2 A and B.

Insert figure 2

The most important changes in NMR parameters, resulting from the formation of these complexes, were observed for H-4', H-6 (upfield shift), H2', H-3' (downfield shift), C-1', C-4', C-5' and C-6 (downfield shift). These can be attributed to a change in the sugar conformation upon binding of Sb^{V} . Interestingly, the profile of proton resonances changes differed between $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$ and $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$ complexes, whereas about the same profiles of carbon resonances changes were observed. Furthermore, these profiles of proton resonances changes differ from that reported previously for the $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-A}$ complex⁵ which showed greater changes for H-1' and H-2'.

Insert table 1

Insert table 2

To further investigate the influence of the nucleobase on the binding of Sb^{V} to the ribose moiety, kinetic and thermodynamic parameters were determined for the

formation of 1:1 Sb^{V} complexes with C, U, A and G ribonucleosides. Table 3 reports the stability constants (K) and apparent association and dissociation rate constants determined for the different Sb^{V} -ribonucleoside complexes at 37°C and pD 6.5. Strikingly, Sb^{V} -U showed a significantly higher value of stability constant, when compared to Sb^{V} -C. Since both complexes exhibited comparable values of association rate constant but different values of dissociation rate constant, the dependence of K upon the nature of the pyrimidine nucleobase could be attributed to difference in the dissociation rate constants of the complexes. Another interesting feature of the present data is the lower values of the association and dissociation rate constants of Sb^{V} -A complex when compared to the other Sb^{V} -ribonucleosides complexes.

Insert table 3

These data indicate that, although Sb^{V} most probably binds to the same site in the different nucleosides, the ribose conformational changes induced by its binding and the physicochemical characteristics of the resulting complex depend on the nucleobase.

Biological activities of Sb^{V} -ribonucleoside complexes

The different Sb^{V} -ribonucleoside complexes were evaluated for their cytotoxicity towards murine peritoneal macrophages, as well as for their *in vitro* activity against *L. chagasi* parasite in the *Leishmania*-infected macrophage system.

Figure 3 shows the cytotoxicity of different Sb^{V} complexes towards macrophage at 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Sb. Antimoniate and meglumine antimoniate were also evaluated in the same assay. Although none of the antimonial compounds was found to be toxic at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the following complexes showed cytotoxicity at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ according to the order: $\text{Sb-G} > [\text{KSb}(\text{OH})_6] > \text{Sb-A} > \text{Sb-C} > \text{Sb-U}$

Insert figure 3

Interestingly, the higher toxicity of antimoniate when compared to most of Sb^{V} -complexes suggests that the complexation of Sb^{V} reduces its cytotoxicity, presumably by promoting a slow release system of Sb^{V} . This result is consistent with the higher cytotoxic activity of antimoniate against a tumor cell line, when compared to meglumine antimoniate.¹⁶ In the case of Sb^{V} -C, Sb^{V} -U and meglumine antimoniate, an inverse relationship was observed between the stability constant of the complex and cytotoxicity. Thus, no significant cytotoxicity of the highly stable complex meglumine antimoniate⁴ was observed, even at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Sb.

Figure 4A displays the *in vitro* antileishmanial activity of the different Sb^{V} -ribonucleoside complexes at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Sb. A significant reduction of the fraction of infected macrophages was observed only in the case of Sb-A and Sb-G complexes. Interestingly, these complexes were found to be more effective than the first-line antileishmanial drug meglumine antimoniate. Figure 4B illustrates that meglumine antimoniate, although inactive at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Sb, promoted a significant reduction of the fraction of infected macrophage at $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Sb.

Insert figure 4

The high cytotoxicity towards host cells of Sb^{V} -purine nucleoside complexes suggests that the formation of these complexes in the vertebrate host may contribute to the side effects of pentavalent antimonial drugs.¹

Furthermore, the higher antileishmanial activities of Sb-A and Sb-G complexes also support the model that the interaction of Sb^{V} with purine nucleosides may mediate the antileishmanial action of pentavalent antimonial drugs. According to this model, following treatment with an antimonial drug such as meglumine antimoniate, the drug

would reach macrophage phagolysosomes in which *Leishmania* parasite resides, either by simple diffusion or following binding to the cell surface and subsequent endocytosis. Sb^V-purine nucleoside complexes would then be formed within the phagolysosomes. The formation of these complexes is supported by both biological and physicochemical features. Since *Leishmania* is a true auxotroph for purine, its survival depends on the capture of purine ribonucleosides from the host.⁸ Therefore, purine ribonucleosides are expected to be present in significant amount within phagolysosomes. Furthermore, the stability constants determined for Sb^V-A and Sb^V-GMP⁴ are consistent with the *in vivo* formation of these complexes. In addition, the pH dependence of the rate of formation of Sb-ribonucleoside⁴ indicates that this reaction would be kinetically favored in the acidic environment of phagolysosomes. Ultimately, the Sb^V-purine nucleoside complexes may kill the parasites, through inhibition of the *Leishmania* purine transporters or interference with the purine salvage pathway.⁸

Importantly, the present study reports for the first time the strong influence of the nucleobase on the cytotoxicity and antileishmanial activity of Sb^V-ribonucleoside complexes, Sb^V-purine nucleoside complexes being more cytotoxic towards macrophages and more effective against *L. chagasi* than Sb^V- pyrimidine nucleoside complexes.

Conclusions

The present work indicates that, although Sb^V most probably binds via oxygen atoms to the same 2' and 3' positions in the different nucleosides, the ribose conformational changes induced by its binding and the physicochemical characteristics of the resulting complex were found to depend on the nucleobase. It is also established that the nucleobase has a strong influence on the cytotoxicity and antileishmanial activity of the Sb^V-ribonucleoside complex, the Sb^V-purine nucleoside complexes being more

cytotoxic towards macrophages and more effective against *Leishmania chagasi* than the Sb^V-pyrimidine nucleoside complexes. The higher cytotoxicities of Sb-A and Sb-G towards both *Leishmania* and host cells also support the model that the interaction of Sb^V with purine nucleosides may mediate the toxicity and antileishmanial activity of pentavalent antimonial drugs.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies, CNPq, MCT, CAPES and FAPEMIG. R.L.M.N. and C.S.F. were recipients of studentship from CNPq. C.S.F. is a CNPq post-doctoral fellow. C.D., F.F. and M.N.M. are CNPq research fellows.

Supplementary Information

Supplementary information related to ESI-MS of Sb^V-C and Sb^V-U complexes is available free of charge at <http://jbc.org.br> as a PDF file.

References

1. Berman, J. D.; *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, 684; Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R.; *Molecules* **2009**, *14*, 2317.
2. Burguera, J. L.; Burguera, M.; Petit de Pena, Y.; Lugo, A.; Anez, N.; *Trace Elem. Med.* **1993**, *10*, 66; Goodwin, L. C.; Page, J. E.; *Biochem. J.* **1943**, *22*, 236; Shaked-Mishan, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3971; Ferreira, C. S.; Martins, P. S.; Demicheli, C.; Brochu, C.;

- Ouellette, M.; Frézard, F.; *Biometals* **2003**, *16*, 441; De Oliveira, F. B.; Schettini, D. A.; Ferreira, C. S.; Rates, B.; Rocha, O. G. F.; Frézard, F.; Demicheli, C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, *17*, 1642.
3. Demicheli, C.; Frézard, F.; Lecouvey, M.; Garnier-Suillerot, A.; *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1570*, 192.
 4. Chai, Y.; Yan, S.; Wong, I. L. K.; Chow, L. M. C.; Sun, H.; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2257; Ferreira, C. S.; Pimenta, A. M. C.; Demicheli, C.; Frézard, F.; *Biometals* **2006**, *19*, 573.
 5. Demicheli, C.; Santos, L. S.; Ferreira, C. S.; Bouchemal, N.; Hantz, E.; Eberlin, M. N.; Frézard, F.; *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 159.
 6. Hansen, H. R.; Pergantis, S. A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 821.
 7. Roberts, W. L.; Berman, J. D.; Rainey, P. M.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1234.
 8. Marr, J.; *J. Lab. Clin. Med.* **1991**, *118*, 111.
 9. Deslauries, R.; Smith, I. C. P.; *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 833.
 10. Demicheli, C.; Ochoa, R.; Lula, I. S.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M.; Frézard F.; *Appl. Organomet. Chem.* **2003**, *17*, 226.
 11. Glasoe, P. K.; Long, F. A.; *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188.
 12. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
 13. Dutta, A.; Bandyopadhyay, S.; Mandal, C.; Chatterjee, M.; *Parasitol. Int.* **2005**, *54*, 119.
 14. Tempone, A. G.; Perez, D.; Rath, S.; Vilarinho, A. L.; Mortara, R. A.; Andrade, H. F.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 60.
 15. Eslami, Z.; Tanner, C.; *Int. J. Parasitol.* **1994**, *24*, 743.

16. Dzamitika, S. A.; Falcão, C. A.; Oliveira, F. B.; Marbeuf, C.; Garnier-Suillerot, A.; Demicheli, C.; Rossi-Bergmann, B.; Frézard, F.; *Chem. Biol. Int.* **2006**, *160*, 217.

Table 1. ^1H NMR parameters (δ , chemical shift) (400 MHz) for cytidine (C) and uridine (U) and their Sb^{V} derivatives ($\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$ and $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$)

Protons	C	$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$	$\Delta\delta$	U	$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$	$\Delta\delta$
	δ (ppm)	complex δ (ppm)		δ (ppm)	complex δ (ppm)	
1'	5.76 (d)	5.77 (d)	0.01	*5.90 (d)	5.86 (d)	-0.04
2'	4.17 (t)	4.27 (t)	0.10	4.36 (t)	4.39 (q)	0.03
3'	4.07 (t)	4.18 (t)	0.11	4.23 (t)	4.27 (t)	0.04
4'	3.99 (m)	3.92 (m)	-0.07	4.14 (m)	4.04-3.99 (m)	-0.13
5a'	3.81 (dd)	3.84 (d)	0.03	3.92 (dd)	3.94 (dd)	0.03
5b'	3.68 (dd)	3.74 (dd)	0.06	3.81 (dd)	3.82 (dd)	0.02
5	5.90 (d)	5.89 (d)	-0.01	*5.89 (d)	5.92 (d)	0.03
6	7.70 (d)	7.66 (d)	-0.04	7.88 (d)	7.79 (d)	-0.09

*Reference⁹

Table 2. ^{13}C NMR parameters (δ and chemical shifts) (100 MHz) for cytidine (C) and uridine (U) and their Sb^{V} derivatives ($\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$ and $\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$)

Carbon	C	$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-C}$	$\Delta\delta$	U	$\text{Sb}^{\text{V}}\text{-U}$	$\Delta\delta$
	δ (ppm)	δ (ppm)		δ (ppm)	δ (ppm)	
2	157.69	157.71	0.02	151.67	151.70	0.03

4	166.23	166.24	0.01	166.21	166.28	0.07
5	96.22	96.59	0.37	102.26	102.55	0.29
6	141.69	142.68	0.99	141.85	142.75	0.90
1'	90.38	92.13	1.75	89.41	91.57	2.16
2'	73.98	73.95	-0.03	73.67	73.61	-0.06
3'	69.34	69.21	-0.13	69.44	69.12	-0.32
4'	83.80	85.67	1.87	84.41	85.81	1.40
5'	60.79	61.76	0.97	60.77	61.67	0.90

Table 3. Stability constants (K) and apparent association and dissociation rate constants (k_f and k_d , respectively) for different Sb^{V} -ribonucleoside complexes at 37°C in D_2O containing 0.1 mol L^{-1} KCl at pD 6.5 (mean \pm standard deviation, $n = 3$).

	Sb^{V} -U	Sb^{V} -C	Sb^{V} -A	Sb^{V} -G
K (L mol^{-1})	1756 ± 58	1227 ± 86	1594 ± 91	-
k_f ($\text{L mol}^{-1} \text{h}^{-1}$)	158 ± 8	142 ± 6	82 ± 15	-
¹⁾ k_d (h^{-1})	0.0155 ± 0.0022	$0.0363 \pm$ 0.0020	$0.0081 \pm$ 0.0018	0.036 ± 0.011

Legends for figures

Figure 1. Structures proposed for the 1:1 Sb -C and Sb -U complexes

Figure 2. HMBC (A) and HMQC (B) spectra of Sb^{V} -U complex

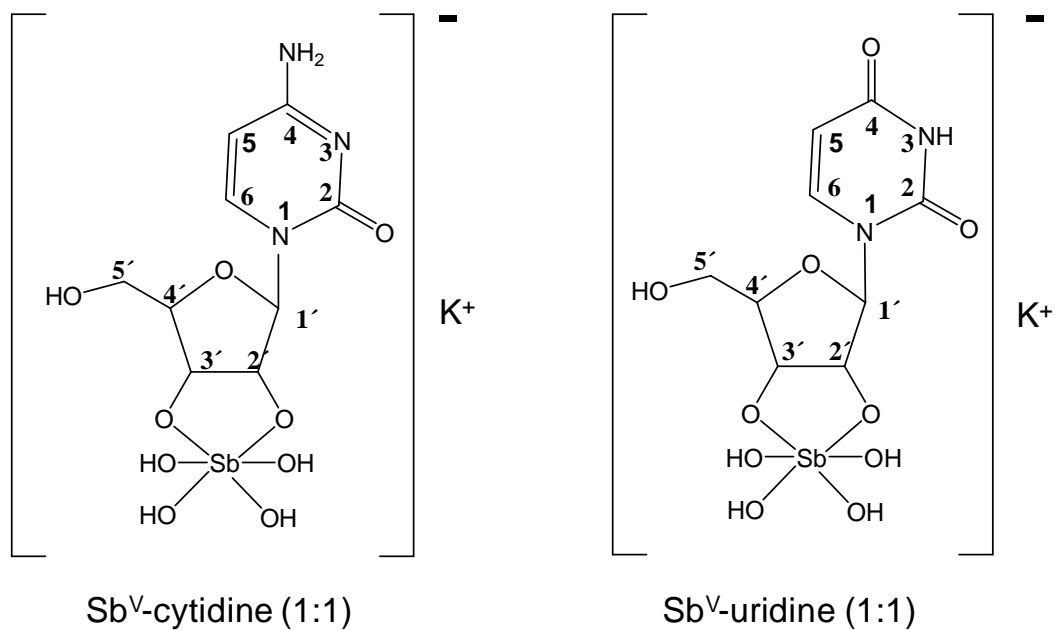
Figure 3. Cytotoxicity of different Sb^V complexes against murine macrophage at 10 µg mL⁻¹ of Sb (A) and 100 µg mL⁻¹ of Sb (B), as determined by the MTT assay. Sb K and MA represent [KSb(OH)₆] and meglumine antimoniate, respectively. Cont represents untreated control. Data are shown as means of absorbance ± standard error (n = 3).

Figure 4. *In vitro* antileishmanial activity of different Sb^V complexes at 10 µg mL⁻¹ of Sb (A) and 30 µg mL⁻¹ of Sb (B) in the *Leishmania chagasi*-infected macrophage model. Sb K and MA represent [KSb(OH)₆] and meglumine antimoniate, respectively. Cont represents untreated control. Data are shown as means of fraction of infected macrophage ± standard error (n = 2). *P<0.05 according to One-way ANOVA, followed by Newman Keuls multiple comparison Post-test.

Figure S1. Negative ESI-MS spectrum of Sb^V-C

Figure S2. Negative ESI-MS spectrum of Sb^V-U

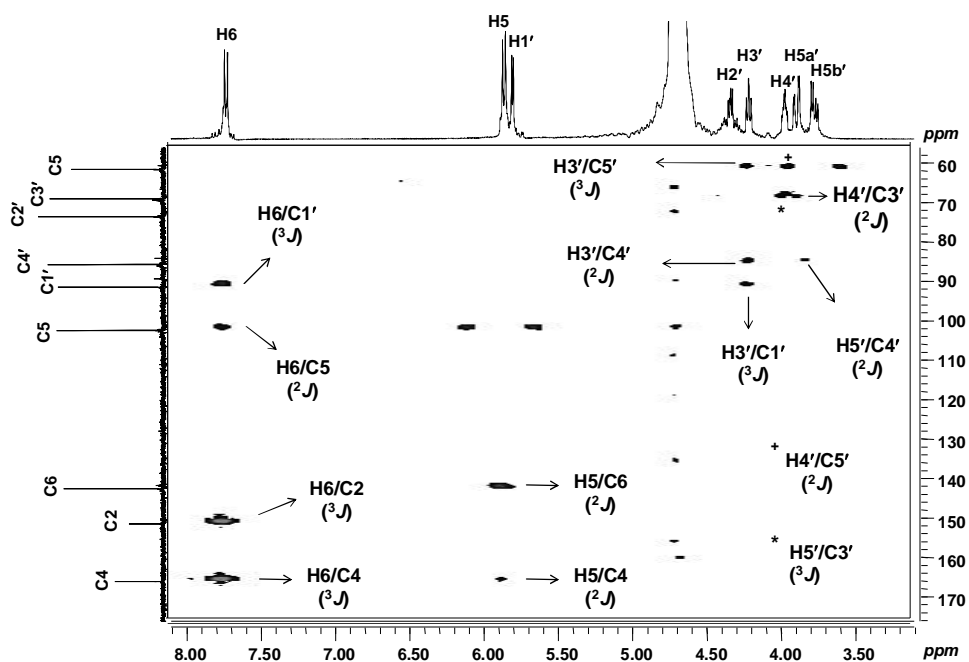
Figure 1.



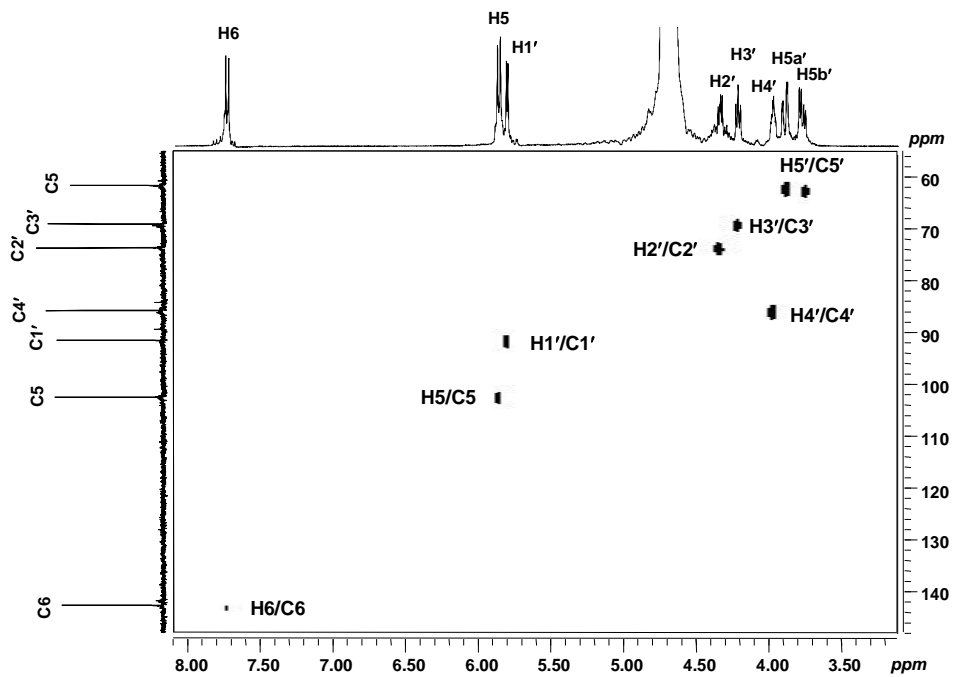
Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes

Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli

Figure 2. A

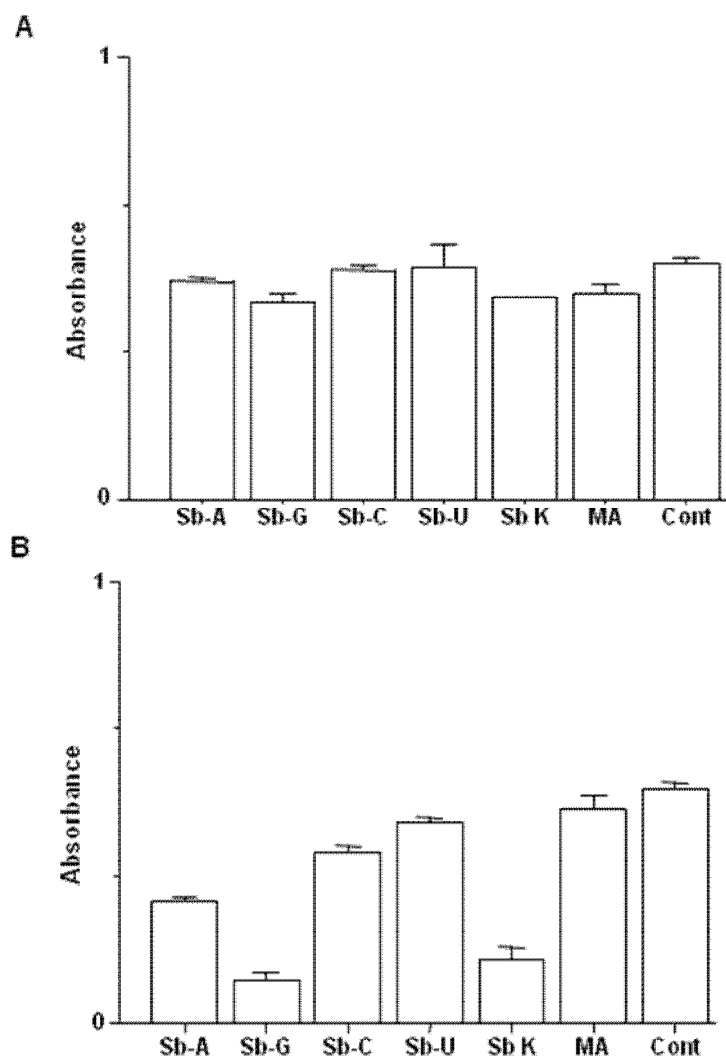


B



Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V -ribonucleoside complexes *Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli*

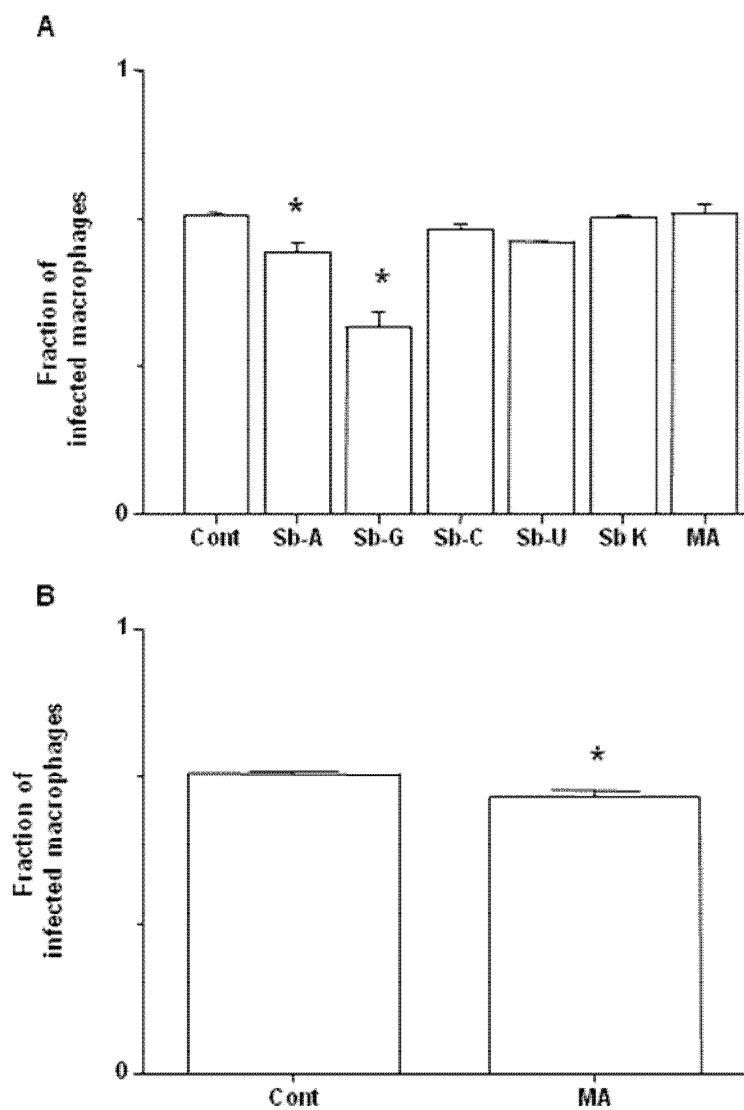
Figure 3.



Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^{V} -ribonucleoside complexes

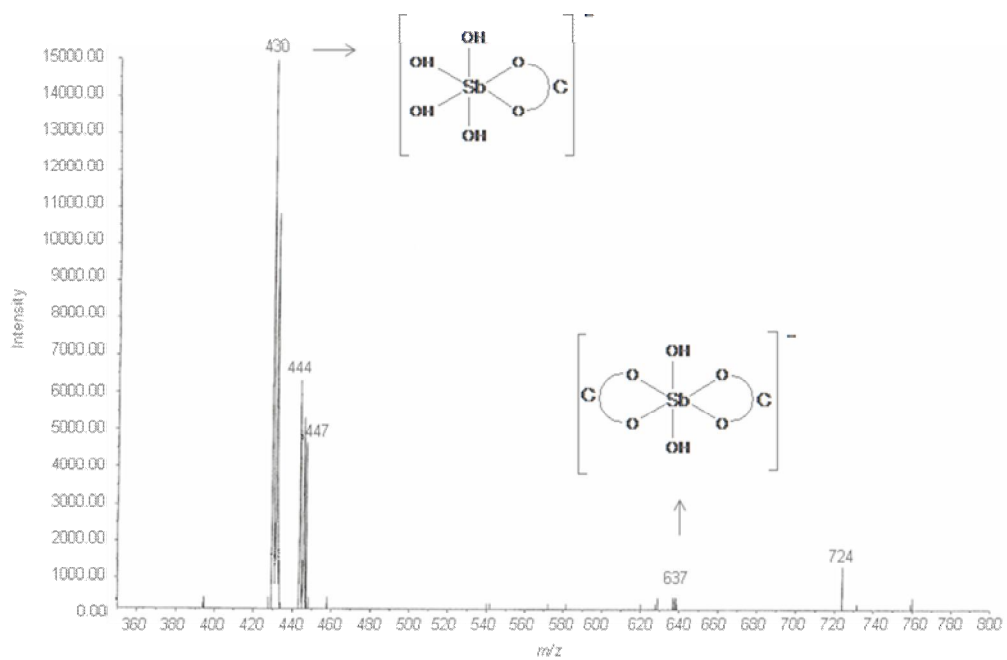
Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli

Figure 4.



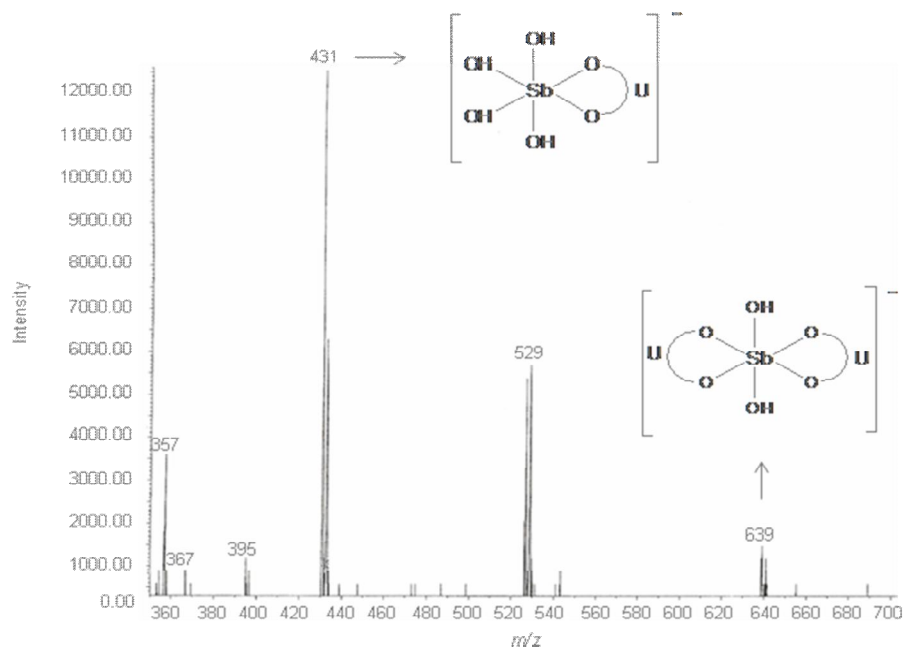
Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes
Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli

Figure S1



Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^V-ribonucleoside complexes
Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli

Figure S2



Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of Sb^{V} -ribonucleoside complexes

Cláudio S. Ferreira, Iara C. M. da Rocha, Rubens L. M. Neto, Maria N. Melo, Frédéric Frézard and Cynthia Demicheli