

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“Avaliação *in vitro* da azitromicina nas espécies
Leishmania (Leishmania) amazonensis, *Leishmania*
(Viannia) braziliensis e *Leishmania (Leishmania) chagasi*”**

Fernanda de Oliveira Silva

**Belo Horizonte
Junho de 2005**

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“Avaliação *in vitro* da azitromicina nas espécies
Leishmania (Leishmania) amazonensis, *Leishmania*
(Viannia) braziliensis e *Leishmania (Leishmania) chagasi*”**

Fernanda de Oliveira Silva

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Ana Rabello

Junho de 2005

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR

S586a Silva, Fernanda de Oliveira.
2005

Atividade *in vitro* da azitromicina nas espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* / Fernanda de Oliveira Silva. – Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas René Rachou, 2005.

xiv , 54 f.:il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 43 - 54

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação Centro de Pesquisas René Rachou.

1. *Leishmania* 2. *in vitro* 3. Azitromicina I. Título. II. Rabello, Ana Lúcia Teles (Orientadora); III.

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Aos meus pais Antônio e Dirce

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ana pela oportunidade de demonstrar o meu trabalho, orientação, pelo carinho, paciência e incentivo em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À Zélia pelo carinho, sugestões e amizade durante todos esses anos de convivência.

A todos os amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas especialmente aos Eliane e Maria Raquel pelo apoio na etapa final do trabalho, à Maria Cláudia, Denílson, Luis André pelo carinho e apoio, Carine, Alexandre, Nádia, Rodrigo e Vanda.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou em especial ao Dr. Álvaro Romanha pelas sugestões e contribuição para a realização do trabalho.

À Dra. Tércia e ao Dr. Guenael pela doação do fármaco utilizado nesse estudo.

À Anna Carolina Lustosa pela grande ajuda e paciência nas análises estatísticas.

Ao bibliotecário Segemar pela disponibilidade no atendimento das solicitações de publicações.

À equipe do Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou.

Aos colegas da Pós-graduação/CPqRR pela amizade e ótima convivência.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo suporte técnico, científico e financeiro.

Às amigas Ana Carolina e Fabrícia meu agradecimento especial pela amizade, carinho, ótima convivência e ajuda em todos os momentos.

Ao Marcelo meu grande companheiro durante todos esses anos, sempre disposto a ajudar e incentivar.

Aos meus pais e meu irmão pelo carinho, compreensão e incentivo, sem vocês isso não seria possível.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído.

Resumo

A azitromicina, um antibiótico azalídio, concentra-se em níveis elevados em várias células fagocíticas, especialmente macrófagos. Esta propriedade é essencial para sua atividade contra organismos intracelulares. A elevada penetração nos tecidos e a meia-vida prolongada da droga favorece a eliminação de parasitos intracelulares. A azitromicina apresenta atividade contra várias infecções causadas por protozoários.

A potencial atividade leishmanicida da azitromicina contra três espécies de *Leishmania* do Novo Mundo foi avaliada utilizando modelos *in vitro*. Em experimentos realizados em triplicatas, promastigotas axênicas ($1 \times 10^6/\text{mL}$) das espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* foram cultivadas em meio Schneiders's em placas de 96 poços. Após a exposição à azitromicina (Zitromax®), 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina B (Fungizon®) 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (controle) durante 72 horas, a inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pelo método colorimétrico alamar Blue™. A atividade foi observada para todas as espécies testadas com valores de DE_{50} 789,3 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) amazonensis*, 458,7 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (V.) braziliensis* e 1201,7 $\mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) chagasi*.

Em amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais estimulados com meio de cultivo tioglicolato, foram obtidos de camundongos Balb/c. As células foram infectadas com $4 \times 10^6/\text{mL}$ promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* na fase estacionária (proporção de 1:10 macrófagos/parasitos) foram cultivados em meio RPMI 1640 em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, a 37°C com 5% de CO_2 . Para a infecção com *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas amastigotas axênicas, na mesma proporção de macrófagos/parasitos e nas mesmas condições de cultivo.

Após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de azitromicina e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, as lamínulas foram retiradas e coradas em Giemsa e o número de amastigotas em 100 macrófagos, determinado. Observou-se redução significativa do número de amastigotas intracelulares das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, quando comparado ao controle sem adição de droga, com valores de DE_{90} de 64,5 $\mu\text{g/mL}$ e 43,9 $\mu\text{g/mL}$. Não houve significância estatística para a espécie *L. (L.) chagasi*, embora redução de 89,6% do número de amastigotas tenha sido observada com 300 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina.

A azitromicina apresentou atividade contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, podendo ser uma alternativa para o tratamento das leishmanioses.

Abstract

Azithromycin, an azalide antibiotic, concentrate to a high degree within in different phagocytic cells especially in macrophages. This ability is essential for activity against intracellular organisms. The greater tissue penetration and prolonged elimination half-life of azithromycin may contribute to its effectiveness in eliminating intracellular parasites. Azithromycin has been proven effective against various protozoal infections.

The potential antileishmanial activity of azithromycin against three species of *Leishmania* from the New World was assessed using *in vitro* models. In three repeated experiments, cell-free log-phase promastigotes (1×10^6 /mL) triplicate cultures of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* were grown in Schneider's insect medium in 96-well plates. After exposure to azithromycin (Zitromax®), 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/mL and amphotericin B (Fungizon®) 0.2 µg/mL (control), for 72 hours, parasite viability was determined by the colorimetric alamar Blue™ assay. Activity was observed for all species tested, with ED₅₀ values of 789.3 µg/mL for *L. (L.) amazonensis*, 458.7 µg/mL for *L. (V.) braziliensis* e 1201.7 µg/mL for *L. (L.) chagasi*.

To evaluate drug activity upon intracellular amastigotes, tioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages were harvested from Balb/c mice, infected with 4×10^6 /mL stationary-phase promastigotes *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi* (for a macrophage/parasite rate of 1:10) were cultured with RPMI 1640 medium in 24-well plates with coverslips, at 37°C with 5% CO₂. Infection with *L. (V.) braziliensis* was performed with amastigotes-like at the same macrophage/parasite rate and same culture conditions.

After 72 hours of exposure to the different concentrations of azithromycin and 0.2 µg/mL of amphotericin B (control), the coverslips were removed, stained with Giemsa, and the number of amastigotes counted in 100 macrophages. The number of intracellular amastigotes of the species *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* were significantly decreased, with ED₉₀ 64.5 µg/mL and 43.9 µg/mL, respectively, as compared to the drug-free cultures. No significant decrease in parasite number was observed in macrophage cultures with *L. (L.) chagasi*, although a reduction of 89.4% in the number of amastigotes has been observed with 300 µg/mL of azithromycin as compared with the drug-free control.

Azithromycin showed *in vitro* activity against *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* and may offer an alternative to the treatment of leishmaniasis.

Lista de Figuras

Figura 1 – Classificação taxonômica das principais espécies do gênero <i>Leishmania</i>	4
Figura 2 – Estrutura química da azitromicina	17
Figura 3 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	29
Figura 4 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	30
Figura 5 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	31
Figura 6 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	32
Figura 7 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) em macrófagos infectados com amastigotas axênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	33
Figura 8 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) chagasi</i>	34
Figura 9 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) em macrófagos infectados com amastigotas axênicas de <i>L. (L.) chagasi</i>	35

Lista de Tabelas e Quadro

Quadro 2 – Classificação por prioridade de pesquisa – Organização Mundial da Saúde	2
Tabela 1 – Fármacos disponíveis para tratamento das leishmanioses.....	6
Tabela 2 – Concentração nos tecidos da azitromicina após administração oral.....	19
Tabela 3 – Valores de DE ₅₀ e DE ₉₀ para promastigotas e amastigotas intracelulares.....	35

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Leishmaniose: doença em expansão e desprovida de instrumentos adequados de controle	1
1.2 Alternativas terapêuticas disponíveis	5
1.2.1 Antimonial pentavalente	7
1.2.2 Pentamidina	9
1.2.3 Anfotericina B	10
1.2.4 Anfotericina B dispersão coloidal	12
1.2.5 Anfotericina B complexo lipídico	12
1.2.6 Anfotericina B lipossomal	13
1.2.7 Paromomicina	13
1.2.8 Agentes orais	14
1.2.9 Antifúngicos	14
1.2.10 Miltefosina	15
1.2.11 Sitamaquina	16
1.3 O antibiótico macrolídio azitromicina	17
1.3.1 O uso clínico da azitromicina	20
1.3.2 Atividade da azitromicina contra <i>Leishmania</i> spp	21
2 Justificativa	22
3 Objetivo	22
4 Materiais e métodos	23
4.1 Parasitos	23
4.2 Manutenção, isolamento e cultivo de parasitos	23
4.3 Drogas	23
4.4 Avaliação da atividade leishmanicida da azitromicina em cultivo de promastigotas através de método colorimétrico de medida de viabilidade celular – alamar Blue™	24
4.5 Avaliação da atividade leishmanicida da azitromicina em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i>	25
4.5.1 Obtenção de macrófagos	25
4.5.2 Obtenção de formas amastigotas-like de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i>	26
4.5.3 Infecção de macrófagos	26
4.6 Análise dos dados	27
5 Resultados	29

5.1 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> ..	29
5.2 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	30
5.3 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	31
5.4 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	32
5.5 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra amastigotas intracelulares de <i>L. (V.) braziliensis</i>	33
5.6 Atividade <i>in vitro</i> da azitromicina contra amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) chagasi</i>	34
6 Discussão	36
7 Conclusões	42
8 Referências Bibliográficas	43

1 Introdução

1.1. Leishmaniose: doença em expansão e desprovida de instrumentos adequados de controle

As leishmanioses, tegumentar e visceral, compreendem uma das dez doenças consideradas endemias prioritárias pela Organização Mundial da Saúde, pelo seu significativo impacto sobre a saúde mundial. Estima-se que a prevalência da infecção no mundo seja de aproximadamente 12 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões estejam sob risco de adquirir a doença, que atinge as Américas, a Ásia e o sul da Europa. A estimativa da incidência mundial de leishmaniose visceral é de 500.000, sendo que 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. A incidência mundial de leishmaniose tegumentar é de 1,5 a 2,0 milhões, sendo que 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru e 80% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria ([http: www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr) 2005; Desjeux 2004). A doença é de notificação obrigatória em apenas 32 dos 88 países onde é endêmica, o que resulta em sub-notificação de número importante dos casos. Estima-se que 80% dos indivíduos sob o risco de adquirir leishmaniose no mundo vivam com menos de dois dólares por dia (Davies et al. 2003).

As leishmanioses constituem sério problema de saúde pública no Brasil. Entre 1980 e 1991, o Ministério da Saúde recebeu notificações anuais médias de 22.000 casos novos de leishmaniose tegumentar e 1.500 casos novos de leishmaniose visceral. No ano de 2000, foram notificados 33.720 casos de tegumentar e 4.880 novos casos de visceral, valores em média, mantidos até 2004. Ao analisar a evolução da leishmaniose tegumentar no Brasil, observa-se uma expansão geográfica. Na década de 80 foram registrados casos em 19 unidades federadas e nos últimos anos todas as unidades federadas registraram casos autóctones da doença. Em relação à leishmaniose visceral, o aumento recente do número de casos pode ser explicado pela modificação do padrão de ocorrência geográfica, com o registro de casos em centros urbanos, como Belo Horizonte, Natal, São Luís, Teresina, Fortaleza, Montes Claros e Araçatuba, caracterizando uma expansão da área tradicional de ocorrência dessa doença provavelmente em decorrência do intenso processo migratório da população rural para a periferia das cidades de médio e grande porte e da adaptação de reservatórios e vetores a novos ambientes modificados pelo homem. Deve-se considerar que embora a leishmaniose seja doença de notificação compulsória no Brasil, devido à sub-notificação, o

número preciso de casos não é conhecido. Várias epidemias de leishmaniose têm sido observadas em diferentes regiões do país durante a última década (Elkhoury et al.2004).

A leishmaniose encontra-se entre as doenças tropicais da categoria 1 da Organização Mundial da Saúde, definidas como doenças em expansão e para as quais não se dispõe de instrumentos adequados para controle. A incidência da infecção vem aumentando em todo o mundo nas últimas décadas e são considerados insuficientes os instrumentos de intervenção em seus diferentes aspectos: diagnóstico, terapêutico e controle de vetores e reservatórios.

Quadro 1: Classificação por Prioridades de Pesquisa – Organização Mundial da Saúde (Remme et al. 2002).

Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3
Estratégias de controle insuficientes e doença em expansão	Estratégias de controle existentes não levaram à redução do impacto da doença sobre as populações	Estratégia de controle efetiva, em situação de eliminação
Tripanossomíase africana	Malária	Doença de Chagas
Leishmaniose	Esquistossomose	Lepra
Dengue	Tuberculose	Oncocercose
		Filariose

Esta expansão das leishmanioses está relacionada com mudanças ambientais e aos movimentos migratórios, que aumentam a exposição de pessoas susceptíveis aos insetos vetores.

Existem mais de 25 espécies de *Leishmania* capazes de produzir a doença no homem. A Figura 1 apresenta a classificação taxonômica das principais espécies do gênero *Leishmania* causadoras de doença humana segundo Lainson e Shaw 1987. A transmissão das leishmanioses ocorre através da picada de insetos da família *Plebotominae*, designados genericamente por flebotomíneos. Dois gêneros estão envolvidos na transmissão *Phlebotomus* (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* (Américas).

Dependendo da espécie infectante e de determinantes de susceptibilidade dos hospedeiros, as infecções se apresentam sob diferentes aspectos clínicos. As duas principais divisões clínicas da doença são a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral.

A leishmaniose tegumentar pode ser subdividida nas seguintes formas: **1)** leishmaniose cutânea, por sua vez sub-dividida em **a)** cutânea localizada, com lesões únicas ou múltiplas, geralmente ulceradas, que evoluem satisfatoriamente com o tratamento; **b)**

cutânea disseminada com lesões múltiplas, geralmente pequenas e não-ulceradas, distantes do local de inoculação, cujo tratamento habitual é eficiente; c) cutânea difusa, com numerosos nódulos e placas presentes por todo o corpo, com tendência de refratariedade ao tratamento com os medicamentos disponíveis; **2)** leishmaniose mucosa, com lesões mucosas sem a presença de lesões cutâneas ativas, acomete o revestimento mucoso do trato respiratório superior, com predomínio da mucosa nasal e predileção do septo nasal, apresentando tendência à recidiva após tratamento; **3)** leishmaniose muco-cutânea: com lesões mucosas e presença concomitante de lesões cutâneas ativas, que em geral respondem bem ao tratamento habitual (Oliveira-Neto, 1998).

Três espécies de *Leishmania* são as principais responsáveis pela leishmaniose cutânea no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a mais freqüentemente encontrada no país e também mais freqüentemente associada à forma clínica mucosa, *L. (Leishmania) amazonensis*, dispersa por várias regiões do país é a espécie responsável pela manifestação difusa anérgica da leishmaniose cutânea, e *L. (V.) guyanensis*, de ocorrência nas regiões norte e nordeste do país. Em Minas Gerais, circulam as espécies *braziliensis* (70%) e *amazonensis* (30%) (Gontijo et al. 1995).

A leishmaniose visceral, causada pelas espécies do complexo donovani, pode se apresentar sob a forma clássica, oligossintomática ou assintomática. A doença clássica, se não tratada, caracteriza-se por febre irregular, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia, linfadenopatia e pancitopenia. Pode ocorrer em epidemias extensas, com elevada proporção de mortes. Os fatores associados ao desenvolvimento e à gravidade da doença são a desnutrição, o uso de medicamentos imunossupressores e especialmente a infecção pelo HIV. Se não tratada, as leishmanioses graves tornam-se crônicas e debilitantes, incapacitando pacientes até a morte e criando um círculo vicioso de pobreza e doença (Desjeux 2004). No Brasil, a espécie responsável pela leishmaniose visceral é a *L. (L.) chagasi*.

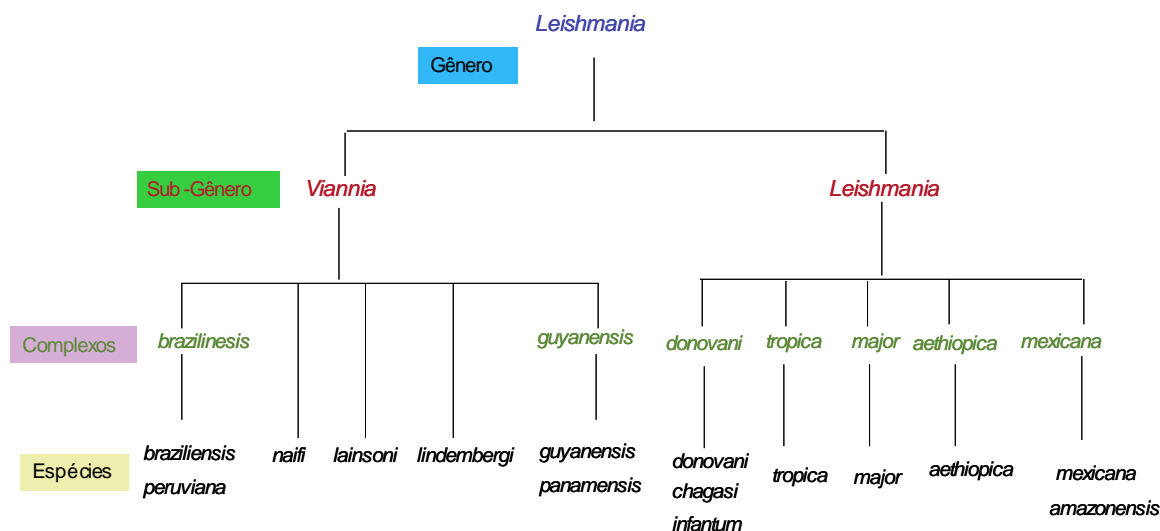


Figura 1 – Classificação taxonômica das principais espécies do gênero *Leishmania*

As principais estratégias de controle das leishmanioses incluem a identificação e o tratamento de casos humanos, o controle do vetor e o controle do foco zoonótico e dos reservatórios animais. O controle das leishmanioses é dificultado pela diversidade de situações epidemiológicas e pela insuficiência de instrumentos eficientes.

As principais prioridades de pesquisa e desenvolvimento para o controle das leishmanioses são a busca de ferramentas para o diagnóstico simples e rápido, novos tratamentos ou combinações de drogas para combater a resistência, estratégias para desenvolvimento de vacinas e para elaboração de material para educação e treinamento. A capacidade de determinar os principais aspectos das leishmanioses em diferentes regiões é crucial para definição de políticas de prevenção e controle e para a mobilização de recursos. (Davies et al. 2003; http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_leish.htm).

Além disto, as leishmanioses, como muitas outras doenças causadas por protozoários, representam um problema de países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento e não constituem mercado suficiente para despertar interesse dos setores privados. Estas doenças são caracterizadas como negligenciadas ou esquecidas, que recebem investimento limitado em pesquisa e desenvolvimento de métodos diagnósticos, drogas ou vacinas eficientes e com preço acessível.

1.2. Alternativas terapêuticas disponíveis

Segundo Singh e Sivakumar (2004) existem aproximadamente 25 compostos com efeitos leishmanicidas, mas apenas cerca de dez são classificados como compostos leishmanicidas, utilizadas para tratamento do homem, sendo a maioria deles de administração parenteral.

Os principais obstáculos relacionados ao tratamento das leishmanioses incluem o custo elevado de novas classes de agentes (por ex., formulações lipídicas da anfotericina B), a co-infecção *Leishmania*/HIV, com maior frequência de falhas terapêuticas e a resistência em larga escala ao antimonial pentavalente na Índia (Murray 2001).

O desenvolvimento de resistência aos antimoniais e a resistência potencial demonstram a necessidade urgente de pesquisa por novos fármacos e a deficiência de conhecimento sobre os mecanismos e preditores moleculares e bioquímicos de ação dos antimoniais na *Leishmania*.

Na última década, foram introduzidas novas opções terapêuticas potenciais para a leishmaniose visceral, como a formulação parenteral da aminosidina (paramomicina), as formulações lipídicas de anfotericina B e os fármacos de uso oral miltefosina e sitamaquina (WR 6026). Para o tratamento da leishmaniose cutânea, foram desenvolvidas algumas formulações tópicas de paramomicina e o tratamento desta forma clínica também pode ser beneficiado pela miltefosina oral. Diversos outros compostos, como os antifúngicos azóis itraconazol, cetaconazol e fluconazol têm sido estudados, com resultados controversos (Akuffo et al. 1990; Weinrauch et al. 1997; Alrajhi et al. 2002).

Considerando os antifúngicos azóis e a WR 6026 como fármacos em avaliação, existem apenas algumas opções terapêuticas conhecidas para o tratamento das leishmanioses. Estes fármacos apresentam restrições de uso, por efeitos terapêuticos adversos, disponibilidade no mercado local ou custos.

A tabela seguinte apresenta as principais alternativas terapêuticas para tratamento das leishmanioses.

Tabela 1 – Fármacos disponíveis para tratamento das leishmanioses.

Fármacos disponíveis	Formas clínicas em que é indicado	Ano de introdução	Mecanismo de ação	Referências
Antimoniais pentavalentes	Tegumentar e visceral	Sob a forma de sais trivalentes em 1912 para a leishmaniose mucocutânea e em 1915 para a leishmaniose visceral.	Inibição de enzimas da via glicolítica e oxidação de ácidos graxos	Berman 1988
Anfotericina B	Tegumentar e visceral	Utilizada pela 1ª vez em 1959, mas o seu uso foi intensificado a partir da década de 90	Liga-se ao ergosterol de fungos e da <i>Leishmania</i> inibindo a síntese da membrana	Berman e Wyler 1980
Anfotericina B formulações lipídicas	Tegumentar e visceral, estudos ainda raros	1991	Liga-se ao ergosterol de fungos e da <i>Leishmania</i> inibindo a síntese da membrana	Croft et al. 1991
Pentamidina	Tegumentar e visceral	1939	Compete com as poliaminas pela ligação com o ácido nucléico e pode também ligar-se preferencialmente ao DNA do cinetoplasto	Sands et al. 1985
Aminosidina	Monoterapia injetável para a leishmaniose visceral e em formulações tópicas para a leishmaniose tegumentar	1961	Modificação da síntese de RNA e em lipídios polares da membrana	Neal et al. 1995
Cetoconazol	Cutânea e visceral	1982	Bloqueia a síntese do ergosterol	Urcuyo e Zaias 1982
Itraconazol	Cutânea e visceral	Década de 90	Bloqueia a síntese do ergosterol	Akuffo et al. 1990
Fluconazol	Tegumentar e visceral	Década de 90	Bloqueia a síntese do ergosterol	Sundar et al. 1996
Aluporinol	Cutânea e visceral	Início da década de 80	Inibe o catabolismo da purina em células de mamíferos e o anabolismo da purina em <i>Leishmania</i>	Berens e Marr 1980
WR 6026	Visceral	1994	Formação de desetil e 4-CH ₂ que podem ser responsáveis por sua atividade	Sherwood et al. 1994
Miltefosina	Visceral e estudos iniciais para a leishmaniose cutânea	Final da década de 90	Impede a proliferação da <i>Leishmania</i> e altera a composição do esterol e de fosfolipídios	Croft et al. 1987

1.2.1. Antimonial pentavalente

O tratamento clássico para todas as formas de leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, na forma do estibogluconato de sódio (Pentostam®) ou antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Berman 2003). O Glucantime® apresenta 81 mg de Sb^{V} /ml e é principalmente utilizado em países de colonização francesa e espanhola e o Pentostam® possui 100 mg de Sb^{V} /ml, sendo mais utilizado em países de colonização inglesa. Os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram usados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose cutânea em 1912 por Gaspar Vianna, logo após o reconhecimento em 1904, que os protozoários do gênero *Leishmania* eram os agentes causadores das leishmanioses (*apud* Berman 1988). Os sais de antimônio vêm sendo aplicados a todas as formas clínicas de leishmaniose como droga de primeira escolha, desde a descoberta. O estibogluconato de sódio foi empregado, pela primeira vez, para o tratamento da doença em 1945.

Apesar de mais de seis décadas de uso no tratamento das diversas formas da doença, pouco se sabe a respeito dos seus mecanismos de ação. Segundo Davidson (1998), os antimoniais pentavalentes apresentam atividade *in vitro* contra todas as espécies de *Leishmania*. O principal modo de ação dos antimoniais está associado à diminuição de ATP intracelular, devido à interferência na glicólise e na β oxidação dos ácidos graxos em amastigotas (Balaña-Fouce et al. 1998).

Os antimoniais pentavalentes podem ser administrados por via intravenosa ou intramuscular, com mesmo perfil farmacocinético e igual eficácia. Visando padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a dose do antimonial pentavalente seja calculada em mg Sb^{V} /Kg/dia. A eliminação do antimonial é principalmente renal: mais de 80% da dose é excretada dentro das primeiras seis horas na urina (Chulay et al. 1988). O modelo farmacocinético do antimônio inclui uma fase inicial de absorção, uma fase de eliminação renal rápida (duas horas) e uma fase terminal lenta (meia-vida de 33 a 76 horas), na qual é relatada a conversão do pentavalente (Sb^{V}) para trivalente (Sb^{III}) nas células dos tecidos (Chulay et al. 1988). A fase terminal lenta pode ser resultado da conversão *in vivo* do Sb^{V} para Sb^{III} , a qual pode contribuir ao mesmo tempo, para a maior toxicidade e para a ação eficaz da droga (Davidson 1998). Sereno et al. (1997) demonstraram que o Sb^{III} foi substancialmente mais potente que o Sb^{V} para ambos, promastigotas e amastigotas axênicas, de três espécies de *Leishmania*, colaborando com a hipótese da conversão metabólica *in vivo* do Sb^{V} para Sb^{III} .

Em outro estudo, Sereno et al. (1998) observando a conversão metabólica dentro dos macrófagos do Sb^V , relataram que os compostos trivalentes são altamente tóxicos para amastigotas extracelulares e intracelulares. O baço é um dos órgãos alvos de acúmulo do fármaco e alvo da infecção por *Leishmania*. Os antimoniais encapsulados em lipossomos apresentaram atividade leishmanicida contra a infecção pela *L. (L.) chagasi* em hamsters (Frézard et al. 2000). Nesta forma, o fármaco é captado seletivamente por endocitose e alcança os fagolisossomos dos macrófagos onde se encontram os parasitos.

O uso prolongado dos antimoniais pode ocasionar toxicidade importante. A maioria dos efeitos adversos dos antimoniais aparece após sete a dez dias de tratamento, sugerindo que eles decorram de seu acúmulo nos tecidos. Os principais efeitos colaterais estão associados a dores abdominais, mialgias, artralgias, elevação das transaminases hepáticas e alterações cardiológicas, freqüentemente reversíveis. O efeito colateral mais grave atinge o aparelho cardiovascular, representado pelas alterações no eletrocardiograma, que incluem achatamento da onda T e inversão e prolongamento do intervalo Q-T, em geral reversíveis, mas que podem preceder arritmias sérias, devendo o medicamento ser administrado com monitoração eletrocardiográfica.

As desvantagens do uso dos antimoniais incluem o modo de administração parenteral, a longa duração da terapia e as reações adversas freqüentes e potencialmente graves. Além destes problemas, há a ocorrência de fracasso terapêutico em algumas situações. Segundo Bryceson (2001), ainda não está totalmente esclarecido se a resistência aos antimoniais é devida simplesmente à seleção de cepas resistentes, secundária ao seu uso por muitos anos, ou se eles apresentam capacidade de induzir resistência devido ao seu modo de ação ou perfil farmacocinético. De acordo com Croft (2001), a variação na resposta clínica aos antimoniais pentavalentes, Pentostam® e Glucantime®, tem sido um problema persistente no tratamento das leishmanioses há mais de cinquenta anos. Após décadas de uso, doses e duração do tratamento vêm aumentando progressivamente. Longos períodos de tratamento ou elevadas doses diárias podem levar à resistência ao antimônio. Em decorrência desta utilização maciça, os antimoniais têm apresentado eficácias cada vez menores, surgindo em alguns locais, grupos de resistência a esse fármaco (Croft 2001). Estes casos de resistência têm surgido em vários países do mundo, notadamente Índia e Quênia. Em distritos hiperendêmicos do norte de Bihar na Índia, 50-60% dos pacientes não respondem ao tratamento com Sb^V (Sundar 2001), sendo necessária a extensão do tratamento, com o antimonial ou a utilização de drogas alternativas, como anfotericina B, aminosidina ou miltefosina.

As falhas de tratamento ocorrem especialmente em pacientes com leishmaniose visceral, mucosa e cutânea difusa, tornando-se grave problema nas áreas endêmicas da

doença. Na co-infecção *Leishmania*/HIV, embora o tratamento com droga leishmanicida possa resultar em boa resposta e cura inicial, recaídas ocorrem como regra em muitos pacientes, independente da droga ou regime empregado (Alvar et al. 1997, Sundar 2001). Podem ocorrer variações de sensibilidade ao antimônio durante o tratamento ou espécies diferentes de *Leishmania* podem responder diferentemente. Segundo Sundar (2001), experimentos *in vitro* têm mostrado a resistência ao Sb^v de cepas de *L. (L.) donovani*. Esses isolados de pacientes que não respondem ao Sb^v requerem de três a cinco vezes mais droga para alcançar eficiência similar contra os parasitos em relação aos que respondem ao Sb^v.

Assim, a droga atualmente considerada como primeira escolha em todo o mundo está longe de ser satisfatória. As dificuldades relacionadas a aplicações injetáveis em seguimentos populacionais de baixo nível sócio-econômico e o acesso restrito aos serviços de saúde são as principais causas de não-adesão ao tratamento. Além disto, em várias situações, muito comuns na prática clínica, a medicação só deve ser administrada com acompanhamento freqüente através de eletocardiograma e análise das funções renal e hepática. O tratamento que exige a hospitalização do paciente é usualmente impossível em diversos países, onde estas drogas são administradas sem as facilidades para avaliação da toxicidade.

1.2.2. Pentamidina

As diamidinas aromáticas compreendem uma grande família de compostos farmacologicamente significantes, desenvolvidos devido ao seu potencial antimicrobiano (Robert & Briggaman 1977). A pentamidina, uma diamidina aromática, foi sintetizada como droga hipoglicemiante e teve sua atividade contra protozoários demonstrada posteriormente. De acordo com Balaña-Fouce et al. (1998), as diamidinas vêm sendo utilizadas desde 1939 para tratamento das infecções por *Leishmania spp.*

Esses fármacos são tóxicos para numerosos protozoários; ainda assim mostram seletividade acentuada de ação (Sands et al. 1985). As diamidinas aromáticas ligam-se seletivamente ao DNA do cinetoplasto do *Trypanosoma cruzi* e *T. rhodensiense*, produzindo alterações estruturais no cinetoplasto, levando à sua completa destruição (Robert & Briggaman 1977). Sabe-se que pode ocorrer também a inibição da biosíntese de poliaminas (Van Voorhis 1990).

O isetionato de pentamidina é razoavelmente bem absorvido pelos locais de administração parenteral. Aproximadamente 15 a 20% da droga são excretados na urina. A maior parte é depositada no fígado e rim, e uma pequena extensão na pele. Para tratamento das leishmanioses o seu uso tem sido limitado pela toxicidade, quando é administrada em 4mg/Kg por dose (Berman 2003). As reações incluem dispnéia, taquicardia, tonteiras ou

sensação de desmaio, cefaléia e vômitos. Outros efeitos adversos incluem erupções cutâneas, tromboflebite, trombocitopenia, anemia, neutropenia, elevação de enzimas hepáticas e nefrotoxicidade (Vöhringer & Arastéh 1993). O comprometimento da função renal foi observado em 24% dos pacientes, sendo geralmente reversível. No tratamento da leishmaniose, a pentamidina quando utilizada em doses elevadas, pode ser a causa de diabetes em mais de 8% dos casos, podendo ser irreversível, além de ser a causa da hipoglicemia (Van Voorhis 1990).

Essa droga vem sendo empregada como alternativa aos antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose visceral na Índia e cutânea nas Guianas Francesas, onde *L. (V.) guyanensis* é responsável por mais de 90% dos casos (Blum et al. 2004). Para a doença cutânea, a alta proporção de cura associada a baixas doses de pentamidina administrada em curtos períodos, pode ser uma alternativa atrativa ao Sb^V e ainda tratamento de escolha para casos recentes da doença, bem como em casos de falhas do tratamento padrão (Singh & Sivakumar 2004). Em um estudo na Colômbia (pacientes infectados com *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*) o tratamento curto e com baixas doses de pentamidina, proporcionou cura de 96%, semelhante à do antimoniato de meglumina (91%), com frequência também similar de efeitos adversos (Soto et al. 1994). Apesar de sua eficácia no tratamento da leishmaniose visceral, são necessários esquemas prolongados para prevenir recidiva, tornando-se elevada sua toxicidade (Bryceson 1985). Estudos realizados na década de 80 com a pentamidina relataram cura de 99% dos pacientes tratados durante cinco semanas, entretanto, sua eficácia tem se reduzido nos últimos anos, apresentando atualmente cura aproximada de 77% dos pacientes (Jha et al. 1991). Devido à toxicidade, redução de eficácia e relatos recentes de resistência, a pentamidina vem sendo abandonada para o tratamento das leishmanioses na Índia (Gupta et al. 2002).

1.2.3. Anfotericina B

A anfotericina B, um antibiótico poliênico, é amplamente utilizada para o tratamento de infecções fúngicas invasivas e para o tratamento da leishmaniose visceral. A atividade leishmanicida desse antibiótico foi demonstrada na década de 50, sendo utilizada desde então no tratamento da doença. Esse fármaco é ativo contra as diversas espécies de *Leishmania*, mas apresenta a desvantagem da elevada incidência de efeitos adversos. Essa droga apresenta grande afinidade pelo ergosterol, o principal esterol da membrana de fungos e dos parasitos *Leishmania*, e menor afinidade pelo colesterol, o principal esterol da membrana de mamíferos. A anfotericina B age formando micelas com o ergosterol e promovendo a

formação de canais transmembrana, que modificam a permeabilidade da membrana, com perda de íons e outros componentes celulares (Tiphine et al. 1999).

A administração oral é inadequada para tratamento sistêmico devido à pobre absorção digestiva (<5%) e apenas as infusões intravenosas possibilitam concentrações sanguíneas terapêuticas (Minodier et al. 2003). Concentrações elevadas são encontradas no fígado (14 a 41% da dose administrada), rins (0,3 a 2,0%), e pulmões (1,2 a 6%). As excreções renal e biliar são insignificantes, mas a droga pode causar danos glomerulares e tubulares reversíveis.

Relato dos efeitos adversos ocorre em 70 a 90% dos pacientes, incluindo náuseas, vômitos, febre, hipotensão e arritmias cardíacas (Tiphine et al. 1999). O uso da anfotericina B é limitado pela toxicidade, em particular por cardiotoxicidade e nefrotoxicidade cumulativas. Principalmente na Índia, esta droga tem sido utilizada em grande número de pacientes com leishmaniose visceral, clinicamente resistente aos antimonials e à pentamidina (Singh & Sivakumar 2004). Jha et al. (1995) demonstraram em Bihar que todos os 31 pacientes portadores de leishmaniose visceral e resistentes às demais drogas, que completaram o tratamento, apresentaram cura clínica e parasitológica até seis meses de acompanhamento. Sundar e Rai (2002) observaram que em regiões refratárias ao Sb^v na Índia, a anfotericina B é utilizada extensivamente, com excelentes resultados. Segundo esses autores, a anfotericina B é utilizada em doses de 0,75 a 1 mg/Kg em infusões com 5% de dextrose em um total de 15-20 infusões, diariamente ou em dias alternados, apresentando aproximadamente 100% de eficácia. A *L. (L.) donovani* indiana é altamente susceptível a este fármaco (Sundar & Rai 2002). Ocasionalmente, podem ocorrer recaídas (<1%), mas estes pacientes são satisfatoriamente retratados com a mesma droga (Sundar 2001).

O aumento do uso deste antibiótico deve-se principalmente aos casos de resistência ao antimônio e à pentamidina. Segundo Berman (1996), a demanda de desenvolvimento de formulações menos tóxicas e mais eficientes para o tratamento das micoses sistêmicas tem contribuído para aumentar as opções terapêuticas para as leishmanioses.

O medicamento deve ser administrado através de infusão requerendo hospitalização para tratamento por longos períodos, monitoramento da incidência dos efeitos adversos. O regime de hospital-dia reduz o custo do tratamento, mas ainda representa dificuldade de locomoção para os pacientes. Tal procedimento impede a ampla utilização do medicamento em focos endêmicos com grande número de casos.

A anfotericina B associada a lipídios constitui um avanço técnico para o tratamento das leishmanioses, apresentando mínima toxicidade relacionada à infusão e mínima toxicidade renal. Em geral, estas formulações atingem o sistema monocítico fagocitário, onde se encontram os parasitos e são pouco absorvidas pelos rins, órgãos alvo de maior toxicidade

da formulação convencional (Hiemenz & Walsh 1996). Estas drogas possuem a vantagem de serem menos tóxicas que a anfotericina B desoxicolato, entretanto apresentam ainda como inconvenientes, o fato de serem drogas de uso injetável e, principalmente, o custo elevado, o que torna inviável sua utilização em saúde pública. Estas novas drogas apresentam o desoxicolato substituído por outros lipídios formando as seguintes formulações de anfotericinas B: dispersão coloidal, complexo lipídico e lipossomal.

1.2.4. Anfotericina B dispersão coloidal

A anfotericina B dispersão coloidal é registrada na Europa como Amphocil® e nos Estados Unidos como Amphotec®. É composta de bicamadas de sulfato de colesterol, na qual a molécula de anfotericina B é inserida em uma proporção molar de 1:1. A dispersão coloidal não é um lipossoma verdadeiro, as partículas apresentam uma estrutura de disco de 120-140nm de diâmetro e 4nm de largura. Esta droga é rapidamente conduzida para o sistema monocítico fagocitário, resultando em baixa concentração plasmática máxima e elevado volume de distribuição (Tiphine et al. 1999). Alguns tecidos apresentam concentrações maiores, como fígado, baço e medula, sendo que ocorre menor concentração nos rins, contribuindo para a melhor tolerância. Essa droga é 4 a 15 vezes mais efetiva que a anfotericina B convencional, dependendo da duração da infecção (Olliaro & Bryceson 1993). De acordo com Tiphiane et al. (1999), a dispersão coloidal apresenta melhor tolerância renal em relação à anfotericina B convencional. Embora a dispersão coloidal tenha sido a primeira formulação, apenas alguns pacientes têm recebido este fármaco. Ainda assim, a alta incidência de efeitos adversos associados ao custo elevado, tem limitado sua utilização.

1.2.5. Anfotericina B complexo lipídico

A anfotericina B complexo lipídico é registrada com o nome de Abelat®, sendo constituída por uma suspensão complexa de fosfolipídios na proporção molar de 7:3 (Tiphine et al. 1999). Essa droga concentra-se no fígado, baço e pulmões e em menor extensão na medula (Davidson et al. 1991). Excelentes resultados são relatados no tratamento da leishmaniose visceral indiana (Sundar et al. 1997). Há também significativa redução dos efeitos adversos em relação à anfotericina B convencional entre eles febre, náuseas, fadiga e nefrotoxicidade.

1.2.6. Anfotericina B lipossomal

A anfotericina B lipossomal é registrada como Ambisome®, sendo constituída de anfotericina B encapsulada em lipossomas unilamelares. Os lipossomas são esféricos e têm diâmetro aproximado de 80 nm. A anfotericina B lipossomal apresenta comportamento farmacocinético diferente das outras formulações lipídicas e da convencional. As vesículas de lipossomas são pequenas, rígidas e esféricas, sendo levadas com facilidade para o sistema monocítico fagocitário. De acordo com Adler-Moore (1994), estudos *in vitro* sugerem que a anfotericina B lipossomal disponibiliza a anfotericina B para as células fúngicas pela fusão dos lipossomas com a membrana celular ligando-se ao ergosterol, levando à morte do fungo. Quando comparada com a anfotericina B convencional, observam-se picos elevados de níveis plasmáticos, meia-vida curta na circulação e elevadas concentrações hepáticas e esplênicas (Olliaro & Bryceson 1993). Dados farmacocinéticos sugerem que há ligação seletiva desse fármaco a macrófagos de fígado e baço.

Esta droga vem sendo utilizada satisfatoriamente no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral que não respondem ao tratamento padrão. Na Índia, a anfotericina B lipossomal vem sendo utilizada também para tratamento da leishmaniose visceral com eficácia. A anfotericina B lipossomal, em estudo realizado na Índia, Quênia e Brasil, apresentou taxa de cura em 95% dos pacientes, com doses mínimas necessárias de 6, 14 e 21 mg/Kg, respectivamente (Berman et al. 1998). Estudos sugerem que a formulação lipossomal é mais bem tolerada que a coloidal (Tiphine et al. 1999). De acordo com Amato et al. (2004), o tratamento padrão no Brasil (20 dias, 20 mg Sb^v/dia para um paciente com peso de 60 Kg) com antimoniato de meglumina (Aventis Pharma, Brasil) custa U\$ 81.00 e para o tratamento de dois pacientes imunocomprometidos com leishmaniose cutânea, o custo com Amphocil® foi de US\$ 3,810.00 e com Ambisome® foi de US\$ 2,544.00.

Comercialmente, as formulações lipídicas de anfotericina B possuem custo elevado tornando seu uso impeditivo em países subdesenvolvidos (Minodier et al. 2003).

1.2.7. Paramomicina

A aminosidina ou paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, utilizado pela primeira vez de forma experimental no tratamento da leishmaniose, em 1961 (*apud* Neal et al. 1995). Apesar de bem tolerada, é potencialmente nefrotóxica e ototóxica, podendo causar surdez irreversível, além de ser contra-indicada durante a gravidez. A paramomicina, ou sulfato de aminosidina, já foi testado em formulações para uso tópico e parenteral no tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral.

A ação da aminosidina foi demonstrada em promastigotas de *L. (L.) donovani* apresentando modificações na síntese de RNA e em lipídios polares da membrana, promovendo alterações na fluidez da mesma (Maarouf et al. 1997).

De acordo com Croft et al. (2002), em modelo experimental e tratamento clínico, lesões causadas por *L. (L.) major* tratadas com a paramomicina em pomada cicatrizaram mais rápida e completamente do que as lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) panamensis*.

Segundo Singh & Sivakumar (2004), a paramomicina injetável tem sido utilizada para tratamento da leishmaniose visceral, em doses de 14-16 mg/Kg/dia, administradas por até três semanas. Em alguns estudos de fase II na Índia e Quênia, demonstraram resultados promissores com 90% de cura dos pacientes com leishmaniose visceral, em tratamentos com doses diárias de 15 mg/Kg⁻¹ durante 20 dias, incluindo casos refratários ao antimônio (Thakur et al. 2000). De acordo com Rosenthal & Marty (2003), combinada com os antimoniais, a aminosidina (12-18 mg/Kg/dia) permitiu a redução na duração da terapia e pode ser mais eficiente que os antimoniais usados isoladamente, em áreas com altos níveis de resistência ao Sb^v. Doses únicas de anfotericina B lipossomal e do aminoglicosídeo aminosidina foram capazes de curar pacientes com leishmaniose visceral, podendo vir a substituir as drogas atuais de primeira linha (Sundar et al. 1997, 1998). Esse fármaco é ainda uma alternativa terapêutica restrita, sendo bem tolerado e com baixo custo em relação à anfotericina B desoxicolato, mas apresentando como inconveniente a necessidade de administração parenteral.

1.2.8. Agentes orais

Outros antifúngicos e antimicrobianos de uso oral e/ou tópico têm sido objeto de estudo por diferentes autores, entretanto, até o momento não está determinada a real eficácia destes compostos no tratamento das leishmanioses.

1.2.9. Antifúngicos

O alupurinol foi a primeira droga oral utilizada para o tratamento da leishmaniose. Ele inibe o catabolismo da purina em células de mamíferos e o anabolismo da purina em *Leishmania*. Os parasitos *Leishmania* apresentam deficiência de enzimas que sintetizam as purinas. Estes análogos provavelmente inibem o metabolismo do parasito pela competição com o ATP (Van Voorhis 1990). São geralmente ineficientes na ausência do antimônio pentavalente (Blum et al. 2004). Em uma combinação do alopurinol (20 mg/Kg/dia durante 15

dias) e estibogluconato (20 mg/Kg/dia durante 15 dias) em *L. (V.) panamensis*, o alopurinol foi mais eficiente (proporção de cura de 71-74%) que o estibogluconato isolado para a mesma dose (proporção de cura de 36-39%) (Martinez et al. 1997).

Os antifúngicos azólicos incluem duas classes amplas os imidazóis e os triazóis. Nas concentrações atingidas durante seu emprego sistêmico, o principal efeito é a inibição da esterol 14- α -demetilase. Os imidazóis como cetoconazol e os triazóis como traconazol e fluconazol, apresentam efeito leishmanicida ao bloquear a síntese do ergosterol (Croft & Yardley 2002).

O cetaconazol e o itraconazol são imidazóis N-substituídos, que interferem com a demetilação de esteróis em fungos e altera a permeabilidade da membrana. O cetoconazol já foi ou é esporadicamente empregado no tratamento das leishmanioses visceral e cutânea, respectivamente. Segundo Balãna-Fouce et al. (1997), o cetoconazol mostrou bons resultados para leishmaniose cutânea no Novo Mundo, com regimes de 200 a 400 mg duas vezes ao dia durante três meses, sem nenhuma ocorrência de recaídas por até um ano após o tratamento. O cetoconazol já foi utilizado em conjunto com o alopurinol na quimioterapia das leishmanioses. Os efeitos tóxicos mais frequentes são náuseas e vômitos, observados com doses superiores a 10 mg/kg/dia (Van Voorhis 1990).

Não se tem até hoje estudos clínicos conclusivos sobre a utilidade dos antifúngicos orais para tratamento das leishmanioses.

1.2.10. Miltefosina

Dois compostos do grupo alquilfosfocolina desenvolvido pela Zentaris (Frankfurt, Alemanha) foram originalmente desenvolvidos como drogas anti-cancerígenas e têm recentemente sido caracterizadas como drogas anti-protozoárias promissoras. Sua atividade leishmanicida foi demonstrada na década de 80, sendo primeiramente utilizada *in vitro* em modelo animal, apresentando elevada atividade contra *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*.

A miltefosina interage com a membrana celular sem interagir com o DNA e modula a permeabilidade e a fluidez da membrana, a composição lipídica, o metabolismo dos fosfolipídios e a propagação do sinal de transdução (Singh & Sivakumar. 2004). Ela também induz morte apoptótica celular. Os mecanismos de ação contra *Leishmania* ainda não estão bem definidos (Jha et al. 1999). Há bloqueio da proliferação do parasito e alteração de sua composição de fosfolipídios (Croft et al. 2003). Administrada oralmente, a miltefosina tem um longo período de meia-vida, variando entre 150 a 200 horas.

Esta droga mostrou-se promissora no tratamento da leishmaniose visceral nas fases I e II. O estudo de fase III mostrou cura inicial de 100%, mas a cura final após seis meses foi de 94%, comparada à eficácia de 97% dos pacientes tratados com anfotericina B (Singh & Sivakumar 2004). A miltefosina foi registrada na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral em 2002.

Os principais efeitos adversos da miltefosina são gastrointestinais, com vômitos em 38% e diarreia em 20% dos pacientes, com dose de 100 mg/dia, durante 28 dias (Sundar et al. 2002). Ela apresenta potencial efeito teratogênico, não devendo ser administrada a mulheres grávidas ou com possibilidade de gravidez.

Escobar et al. 2002 observaram variação na sensibilidade a diferentes espécies de *Leishmania*. Seifert et al. (2003), em estudo de resistência de promastigotas a miltefosina, geraram em laboratório linhagens resistentes de *L. (L.) donovani* através de exposição contínua à droga *in vitro*. A resistência foi estável por até doze semanas em meio de cultivo sem a droga.

Em 2001, Soto et al. demonstraram a eficácia da miltefosina (>90%) para a leishmaniose cutânea, em doses de 2,25 mg/Kg/dia durante três a quatro semanas, sendo eficiente e bem tolerada. Em outro estudo com a miltefosina (2,5 mg/Kg/dia oralmente por 28 dias), Soto et al. 2004 avaliaram a atividade desta droga em regiões da Colômbia e Guatemala. Em regiões na Colômbia onde *L. (V.) panamensis* é comum, a proporção de cura para a miltefosina e placebo foram de 91% (40 dos 44 pacientes) e 38% (9 dos 24). Esses valores foram similares aos valores históricos para o tratamento padrão com o antimônio e o placebo. Em regiões da Guatemala onde a *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* são comuns, a proporção de cura dos pacientes foi de 53% (20 dos 28) para a miltefosina e 21% (4 dos 19) para o placebo. A taxa de cura para a miltefosina foi menor que os valores históricos para o tratamento com o antimônio (> 90%).

1.2.11. Sitamaquina

A sitamaquina (WR6026), uma 8 amino-quinolina, foi descrita em 1994 e atualmente está sendo novamente estudada, podendo constituir uma alternativa oral. Este fármaco é rapidamente metabolizado formando desetil e derivados 4-CH₂OH, os quais podem ser responsáveis por sua atividade (Croft & Coombs 2003). Um estudo de fase II, conduzido no Quênia em 1994, mostrou a atividade moderada da sitamaquina oral (Kalazaquin®) para o tratamento da leishmaniose visceral (Sangraula et al. 2003). Segundo Sangraula et al. 2003, esta droga poderá vir a ser uma alternativa para a miltefosina, quando houver intolerância gastrointestinal ou em casos de desenvolvimento de resistência.

Alguns estudos clínicos de fase I/II têm mostrado níveis variados de eficácia. No Brasil, 67% dos pacientes foram curados de *L. (L.) chagasi*, quando tratados 2 mg/Kg diariamente durante 28 dias. Neste estudo, o elemento mais surpreendente foi a deficiência de correlação entre resposta para a dose de droga utilizada e a proporção de cura. A metaemoglobinemia é um efeito colateral comum e alguns pacientes têm desenvolvido nefropatias (Dietze et al. 2001).

1.3. O antibiótico macrolídio azitromicina

Os macrolídeos constituem um grupo homogêneo de drogas antimicrobianas, caracterizadas por estrutura química, espectro antibacteriano, mecanismo de ação e resistência similares, mas que apresentam propriedades farmacocinéticas diferentes (Periti et al. 1993). Todos os macrolídeos contêm um anel lactônico composto por 12 a 16 átomos (Figura 2). A azitromicina pertence a este grupo de antibióticos, que tem como droga mais conhecida a eritromicina. A claritromicina e a azitromicina são derivados semi-sintéticos recentes da eritromicina. A eritromicina possui o anel lactônico ao qual se ligam um ou mais açúcares desóxi. A claritromicina difere da eritromicina apenas pela metilação do grupo hidroxil na posição seis e a azitromicina difere pela adição de um átomo de nitrogênio substituindo o radical metil no anel lactônico. Estas modificações estruturais da azitromicina e da claritromicina melhoram a estabilidade ácida, a penetração tecidual e aumentam o espectro de atividade quando comparadas à eritromicina.

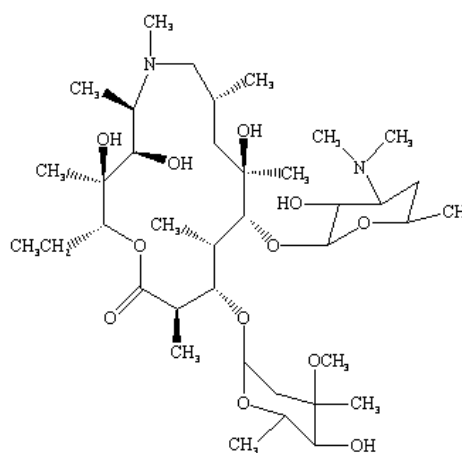


Figura 2 – Estrutura química da azitromicina.

Os macrolídeos interferem com a síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossomal 50S de organismos susceptíveis (Scheinfeld et al. 2004). Eles geralmente são bacteriostáticos. Os macrolídeos são concentrados intracelularmente em diversos tipos de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos, monócitos e macrófagos

alveolares, resultando em uma vantagem para o tratamento de patógenos intracelulares (Schlossberg 1995). A azitromicina inibe muitas espécies gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas, uma variedade de patógenos intracelulares e diversas bactérias gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas (David 1995). Ela difere de outros macrolídios pela habilidade de inibir certos bacilos aeróbicos gram-negativos.

A maior vantagem oferecida pelos novos macrolídios consiste na biodisponibilidade oral (Epstein et al. 1997). A azitromicina e a claritromicina são mais estáveis no ácido gástrico do que a eritromicina, aumentando sua absorção (Scheinfeld et al. 2004). Segundo Epstein et al. (1997), a absorção da azitromicina é diminuída com a ingestão de alimentos e deve ser tomada uma ou duas horas após as refeições (37% da biodisponibilidade). O metabolismo desta droga é primariamente hepático. Em contraste com a claritromicina, os metabólitos da azitromicina possuem pouca ou nenhuma bioatividade (Epstein et al. 1997). Apenas 20% da azitromicina são excretados na urina e o ajuste de dosagens em pacientes com problemas renais não é necessário (Epstein et al. 1997). A concentração plasmática máxima após uma dosagem plena de 500 mg é de 0,4 µg/ml. Quando esta dose plena é seguida pela administração de 250 mg uma vez ao dia por quatro dias, a concentração máxima estável da droga é de 0,24 µg/ml (Lalak & Morris 1993). O pico inicial plasmático é de 11 a 14 horas, seguido de uma prolongada meia-vida, de aproximadamente 68 horas, sendo a droga lentamente removida dos tecidos (Noah 2004). Devido à meia-vida longa, a azitromicina é administrada em esquemas de dose única diária (250 a 1.000 mg), por períodos que variam de três dias consecutivos a seis meses em dias alternados, dependendo da infecção e do objetivo terapêutico ou profilático (Zuckerman 2000).

As propriedades farmacocinéticas desta droga incluem vasta distribuição tecidual e concentração elevada do fármaco dentro das células, incluindo os fagócitos. Gladue et al. (1989) demonstraram que a concentração intracelular da azitromicina é 200 vezes maior que a concentração extracelular. Estes atributos resultam em concentrações muito mais elevadas do medicamento nos tecidos ou secreções quando comparadas às concentrações plasmáticas. As concentrações de azitromicina nos tecidos excedem em 10 a 100 vezes as concentrações séricas, enquanto que a proporção soro/tecido para a eritromicina é estimada entre 0,5 e 5 em humanos (Foulds et al. 1991). Em estudo sobre a atividade intracelular da azitromicina em várias células em voluntários, Wildfeuer et al. (1996) demonstraram que após o tratamento oral por três dias, a droga foi concentrada em leucócitos polimorfonucleares e monócitos do sangue circulante, comparado com o plasma. A azitromicina permanece também nos leucócitos polimorfonucleares *in vitro* por muitas horas após a remoção da droga extracelular (Gladue et al. 1989). Parece que os fibroblastos teciduais agem como reservatórios naturais do

medicamento *in vivo* e a transferência da droga para os fagócitos é realizada com facilidade (Gladue & Snider 1990). As concentrações elevadas deste fármaco são encontradas nas amígdalas, pulmão, próstata, linfonodos e fígado, com apenas pequenas concentrações encontradas na gordura e músculos (Lalak & Morris 1993). As concentrações da azitromicina no tecido (ou líquido) e as proporções da concentração em tecido (ou líquido) em relação ao plasma/soro, após sua administração oral, estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração nos tecidos da azitromicina após administração oral.

Tecido ou líquido	Tempo após a dose (h)	Concentração no tecido ou líquido (µg/g ou µg/ml)	Nível no plasma ou soro correspondente (µg/ml)	Proporção tecido (líquido) / plasma (soro)
Pele	72-96	0,4	0,012	35
Pulmão	72-96	0,4	0,012	> 100
Escarro*	2-4	1,0	0,64	2
Escarro**	10-12	2,9	0,1	30
Amígdalas [±]	9-18	4,5	0,03	> 100
Amígdalas [±]	180	0,9	0,006	> 100
Cérvix [§]	19	2,8	0,04	70

* Amostra foi obtida 2-4 horas após a primeira dose; ** Amostra foi obtida 10-12 horas após a primeira dose, ± Posologia de duas doses de 250 mg, separadas por 12 horas, § A amostra foi obtida 19 horas após dose única de 500 mg. Fonte: Monografia do Produto – Pfizer.

Os macrolídios são relativamente não-tóxicos. Os efeitos adversos da azitromicina afetam principalmente o trato gastro-intestinal, como náuseas, vômitos e diarreia, com metade da frequência e da intensidade dos efeitos observados com a eritromicina, em torno de 6 a 27%. Em aproximadamente quatro mil pacientes tratados com a azitromicina, os efeitos adversos mais comumente relatados foram diarreia (3,6%), náusea (2,6%), dor abdominal (2,5%), dores de cabeça ou perda do sono (1,3%) (Zuckerman 2000). Outras reações adversas são as elevações das enzimas hepáticas, nefrites intersticiais, cefaléias e tonteados, raramente relatadas. De acordo com poucos relatos de casos, a azitromicina pode raramente causar ototoxicidade, resultando em perda transitória de audição, após uso prolongado de (60 a 90 dias) de doses orais elevadas ou uso venoso, em pacientes com AIDS. Entretanto, há relato de um caso de perda irreversível de audição em uma paciente previamente hígida, com o uso de doses baixas de azitromicina (Ress et al. 2000).

1.3.1. O uso clínico da azitromicina

A azitromicina é eficiente contra diversos agentes infecciosos causadores de infecções respiratórias, sendo de quatro a oito vezes mais potentes que a eritromicina contra *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma pneumonia*, *M. hominus* e *M. catarrhalis*. Possui atividade equivalente para *Legionella pneumophila* e *Toxoplasma gondii* (Scheinfeld et al. 2004). Demonstra também atividade contra patógenos comuns da pele e patógenos transmitidos sexualmente: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Ureaplasma urealyticum*. Este fármaco também apresenta atividade contra patógenos entéricos, incluindo *Escherichia coli*, espécies de *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* e espécies de *Shigella* (Zuckerman 2000). Na infecção humana por *Babesia*, a azitromicina em combinação com a quinina, pode ser considerada uma terapia alternativa para tratar a infecção, especialmente quando há falhas no tratamento padrão (Shih & Wang 1998).

Segundo Gingras & Jensen (1992), diversos antibióticos incluindo os macrolídeos eritromicina e os azalídeos, os quais inibem a síntese dos ribossomos 50S, demonstraram atividade antimalárica *in vitro* contra duas cepas de *Plasmodium falciparum*, uma sensível à cloroquina e outra resistente. A azitromicina e a doxiciclina foram consideradas eficazes na profilaxia para *P. falciparum* em estudo no Quênia (Blondeau et al. 2002). Em estudo *in vitro*, Biswas (2001) avaliaram a atividade anti-malárica da azitromicina pela exposição de cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina, a curtos (24h) e longos (96h) períodos de cultivo. A droga demonstrou eficácia, isolada ou em combinação, no tratamento de *P. falciparum* sensíveis e resistentes. Em outro estudo, Orth et al. (2002) também sugerem que a combinação cloroquina-azitromicina deveria ser avaliada para profilaxia da malária e que a combinação quinina-azitromicina deveria ser avaliada para o tratamento da malária em áreas de resistência a drogas. Dunne et al. (2005) avaliaram a atividade da azitromicina isolada ou em combinação com a cloroquina no tratamento da infecção com o *P. falciparum* na Índia. Neste estudo, 61 (97%) dos 67 pacientes tratados com a combinação azitromicina-cloroquina não apresentaram febre ou parasitemia até o sétimo dia de tratamento, e não foi observada recaída clínica ou parasitológica até o 28º dia do tratamento. A combinação da azitromicina e cloroquina pode ser uma alternativa eficiente no tratamento da malária causada por *P. falciparum*.

A azitromicina vem sendo estudada para o tratamento da toxoplasmose. De acordo com Schlosser (1995), a azitromicina é o macrolídeo mais eficaz contra *Toxoplasma*, incluindo sua forma cística. Em estudo sobre a localização da azitromicina em células

infectadas com *T. gondii*, Schwab et al. 1994 demonstraram que a droga concentra-se primariamente em compartimentos acidificados, em parasitos e células hospedeiras.

Segundo Rosenblatt (1999), a azitromicina em combinação com a paramomicina mostrou-se promissora no tratamento da criptosporidiose e da toxoplasmose, quando combinada com a pirimetamina em pacientes com AIDS. Lescano et al. (2004) avaliaram a eficácia da azitromicina e da pirimetamina em camundongos infectados por cepa cistogênica de *T. gondii*. A associação de ambos os medicamentos proporcionou melhores resultados, diminuindo a contagem de cistos no cérebro dos animais tratados de forma concomitante.

1.3.2. Atividade da azitromicina contra *Leishmania spp.*

Dois estudos avaliaram a ação da azitromicina *in vitro* contra parasitos do gênero *Leishmania*. Em 2003, Tanyuksel et al. investigaram o potencial efeito leishmanicida da azitromicina *in vitro* em amastigotas intracelulares de *L. (L.) major* em macrófagos peritoneais de camundongos. A atividade da droga foi avaliada através do percentual de fagocitose e da atividade microbica, utilizando microscópio de fluorescência com o corante “acridina orange”. Na avaliação da atividade leishmanicida, não foram observadas diferenças significativas entre a concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o controle de parasitos sem presença de droga, mas atividade significativa ($p < 0,05$) foi detectada com as concentrações de 0,1, 0,3 e $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nesse estudo, para todas as concentrações de azitromicina utilizadas (0,05, 0,1, 0,3 e $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) não ocorreu nenhum efeito inibitório na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos.

Em outro estudo, Krolewiecki. et al. (2002) demonstraram a atividade da azitromicina *in vitro* e *in vivo* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*. Em culturas axênicas de promastigotas, a azitromicina reduziu significativamente a contagem de parasitos, após seis dias, de $8,0 \pm 0,1 \log_{10}$ no controle sem adição de droga para $6,3 \pm 0,5 \log_{10}$ nas culturas com $100 \mu\text{g/mL}$ de azitromicina e $6,8 \pm 0,2 \log_{10}$ nas culturas com $1000 \mu\text{g/mL}$ de azitromicina. Nenhum efeito foi visto com $10 \mu\text{g/mL}$ de azitromicina. Em culturas de macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) major*, a azitromicina causou diminuição significativa contagem de parasitos, com $\text{DE}_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$. O tratamento *in vivo*, de camundongos susceptíveis BALB/cByJ com 100 a 200 mg/Kg/dia de azitromicina resultou em diminuição significativa do tamanho de lesão e do número de parasitos por lesão.

Dois trabalhos relatam o uso clínico da azitromicina no tratamento da leishmaniose. Prata et al. (2003), em estudo aberto não-controlado, avaliaram 20 pacientes com leishmaniose cutânea, tratados com azitromicina em doses e esquemas terapêuticos variados,

demonstraram eficácia de 85% (n=17) de cura. Segundo esses autores, apesar de não ter sido incluído grupo controle, uma mudança clara nas características das lesões foi observada, sugerindo efeito evidente da azitromicina e não a resolução espontânea, eventualmente observada na forma cutânea da doença. Silva-Vergara et al. (2004), em estudo realizado em Minas Gerais, trataram três pacientes idosos com leishmaniose mucosa de longa evolução e portadores de cardiopatia com azitromicina via oral, em dose única diária de 500 mg, durante dez dias, em três séries com intervalos de um mês. Em todos os pacientes houve cicatrização das lesões depois da terceira série.

2 Justificativa

As leishmanioses são causa significativa de morbidade e mortalidade em vários países do mundo. Dependendo da região geográfica, como na Índia, a droga de primeira escolha é capaz de curar apenas 35-50% dos pacientes, situação que reflete o desenvolvimento progressivo de resistência aos antimoniais. As drogas utilizadas como alternativas terapêuticas apresentam inconvenientes como efeitos adversos graves, toxicidade, além do custo elevado de algumas delas como a anfotericina B lipossomal e a paromomicina. A necessidade de novas drogas com atividade leishmanicida é baseada não apenas na existência de falhas nos tratamentos, mas também na necessidade de fármacos com baixa toxicidade e fácil administração. A azitromicina, um macrolídeo desenvolvido na década de 80, apresenta-se como uma droga atrativa devido a vantagens como acumulação em órgãos e tecidos, especialmente em células fagocitárias, utilização no tratamento de crianças e mulheres grávidas. A justificativa relevante para avaliação desse composto deve-se a possível substituição da droga atualmente utilizada, injetável por tempo prolongado, com elevada frequência de efeitos colaterais, com toxicidade e contra indicações frequentes na prática médica, por outra droga de administração oral, bem tolerada e em esquema de curta duração.

3 Objetivo

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* da azitromicina sobre as espécies dermatópicas *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e viscerotrópica *L. (L.) chagasi*, utilizando dois modelos: a) promastigotas em cultivo; b) amastigotas em macrófagos peritoneais.

4 Materiais e métodos

4.1. Parasitos

Neste estudo, foram utilizadas as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* previamente caracterizadas através de eletroforese de isoenzimas e depositadas no banco de cepas da Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz.

4.2. Manutenção, isolamento e cultivo dos parasitos

As cepas das espécies dermatotrópicas *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram mantidas através de passagens mensais em hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, mantidas pelo biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. Para recuperação e isolamento de amastigotas, foram obtidos fragmentos de lesões não-ulceradas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* e para *L. (L.) chagasi* foram obtidos fragmentos de baço de hamsters. Os fragmentos foram mantidos por 24 horas a 4°C em 1 mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma ref. P4333). Os fragmentos foram incluídos em meio de cultura Schneider's (Sigma ref. S9895), esterilizado por filtração em membrana de nylon 0.22µm, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF Gibco ref. 10270-106) inativado a 56°C por 30 minutos, acrescido de 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina (Sigma ref. P4333). Essas culturas foram mantidas em estufa incubadora BOD (FANEM, São Paulo, Brasil) a 26°C e os parasitos (formas promastigotas) congelados e estocados. Para o procedimento de congelamento dos parasitos, promastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 1000g durante dez minutos e o sobrenadante descartado. O material foi ressuscitado em meio Schneider's, o mesmo utilizado para o isolamento. Os parasitos foram acondicionados em tubos para criopreservação, com 10% de glicerol. Esses tubos eram mantidos em freezer a -20°C para estoque dos cultivos de promastigotas.

4.3. Drogas

Foram utilizadas as drogas desoxicolato de anfotericina B (Fungizon®, Bristol-Myers Squibb) e azitromicina (Zitromax®, Pfizer). Cada frasco-ampola de Zitromax®, pó para solução para infusão intravenosa, contém azitromicina diidratada equivalente a 500 mg de azitromicina. Para reconstituição dos fármacos e diluições das concentrações empregadas nos

ensaios com promastigotas, foi utilizada água estéril para injeções. O conteúdo do frasco de azitromicina foi reconstituído em 4,8 ml de água para obtenção de uma solução de 100 mg/mL de azitromicina. Posteriormente, essa solução foi diluída em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma ref. R4130) para a realização dos ensaios com macrófagos peritoneais. O fármaco era armazenado sob refrigeração e utilizado até sete dias após a reconstituição, conforme descrição do fabricante. A anfotericina B desoxicolato (50 mg), foi reconstituída em água (10 mL) e diluída de acordo com as concentrações de estudo, em meio RPMI 1640 para os experimentos com macrófagos peritoneais. A solução estoque (5 mg/mL) foi mantida sob refrigeração e protegida da luz sendo utilizada até um mês após sua reconstituição, de acordo com as instruções do fabricante.

4.4. Avaliação da atividade leishmanicida da azitromicina em cultivo de promastigotas através do método colorimétrico de medida de viabilidade celular - alamar Blue™

O alamar Blue™ é um corante solúvel, estável em meio de cultura, não tóxico utilizado para avaliar viabilidade e crescimento celular. Como os sais tetrazolium (exemplo, MTT - azul de tiazolil), o alamar Blue™ monitora a redução do meio interno de células em crescimento. A medida do crescimento celular pode ser feita com espectrofotômetro ou fluorímetro. O alamar Blue™ é reduzido pelos metabólitos intermediários celulares como o NADPH/NADP e os citocromos, resultando na alteração da coloração inicial de um composto azul oxidado para um estado reduzido com coloração rosa. Como os espectros de absorção do alamar Blue™ se sobrepõem, a medida da absorbância deve ser feita utilizando filtros que permitem o registro da absorção da luz em dois comprimentos de onda de 570 e 600 nanômetros. Através da correlação entre o número de parasitos e absorbância do alamar Blue™, o efeito da droga é quantificado fotometricamente.

Os ensaios com promastigotas foram realizados em placas de 96 poços (Sarsted, EUA) em triplicatas. Após os ajustes de concentração de parasitos, 180 µl da suspensão de 1×10^6 parasitos/mL foram adicionados a cada poço, com 20 µl (1:10) das diferentes concentrações de drogas. A anfotericina B desoxicolato foi empregada como droga-controle dos experimentos, nas concentrações 0.1, 0.2, 0.4 e 1.0 µg/mL. A azitromicina foi testada nas concentrações: 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/mL. Triplicatas de cada concentração de parasitos foram mantidas sem adição de drogas. As placas foram incubadas em estufa BOD a 26°C e oito horas antes do final do experimento (72 horas) 20 µl do corante alamar Blue™ foram acrescidos aos poços. Ao final de 72 horas, a densidade ótica das soluções contidas nos poços foi registrada por espectrofotômetro em dois comprimentos de onda (570 e 600nm), simultaneamente. Para cada espécie de *Leishmania*, os experimentos

foram repetidos por três vezes. Após as leituras os dados foram armazenados em planilha do Microsoft Excel para determinar a atividade da azitromicina de acordo com a seguinte fórmula fornecida pelo fabricante do corante alamar Blue™:

$$\% \text{ de parasitos viáveis} = \frac{(117,216 * droga570) - (80,586 * droga600)}{(117,216 * parasito570) - (80,586 * parasito600)} * 100$$

Observação: O termo droga refere-se às concentrações de azitromicina e anfotericina B utilizadas nesse ensaio com leituras em 570 e 600 nanômetros. O termo parasito refere-se ao controle de promastigotas sem adição de droga com leituras em 570 e 600 nanômetros. Os valores fixos apresentados nessa fórmula são coeficientes fornecidos pelo fabricante do corante com leitura nos comprimentos de onda de 570 e 600 nanômetros

4.5. Avaliação da atividade leishmanicida da azitromicina em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*

4.5.1. Obtenção dos macrófagos

Camundongos Balb/c machos com peso de 20g foram inoculados por via intraperitoneal com 1,5 mL de meio de cultivo tioglicolato (3%) (Biobrás ref. 1131) para estimulação da produção dos macrófagos. Após quatro dias, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e colocados em recipiente contendo álcool 70% para descontaminação da pele, que foi aberta para exposição da cavidade peritoneal. Para obtenção das células, 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 resfriado foram injetados na cavidade peritoneal. A seguir, aspirou-se o conteúdo da cavidade peritoneal com seringa de 5 mL (injex) e o material aspirado, acondicionado em tubo de 50 mL (Corning, EUA) e centrifugado a 300g durante sete minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio RPMI 1640 não suplementado. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer com azul de “Trypan” (Sigma ref. T8154) a 10%, para avaliação da viabilidade celular. A suspensão de células foi ajustada para $2 \times 10^5 / 500 \mu\text{l}$ e o aspirado distribuído em placas para cultura de células (Sarsted, TPP®/Europa) com 24 poços. Ao fundo de cada poço foi colocada uma lamínula de vidro circular de 13 mm (Glass Técnica/Brasil). As células foram deixadas para aderir às lamínulas durante duas horas em estufa (Revco – Elite II/EUA) a 37°C com 5% de CO₂. Após esse tempo, o meio de cultura foi aspirado e um mL de meio RPMI 1640 aquecido (32°C),

suplementado com 10% de SBF, 50U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina foi acrescentado aos poços. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

4.5.2. Obtenção de formas amastigota-like de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* foram cultivadas em meio Schneider's pH 7.2 acrescido de 10% de SBF e 50U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina mantidos em estufa BOD a 26°C sob agitação, até atingirem a fase estacionária de crescimento (8º dia da curva crescimento para *L. (V.) braziliensis* e 10º dia para a *L. (L.) chagasi*). As promastigotas foram centrifugadas a 1000g durante dez minutos para a realização de troca do meio de cultivo. Os parasitos de *L. (V.) braziliensis* foram ressuspensos em meio de cultivo Schneider's pH 6.0 com 10% de SBF contendo penicilina (50U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e mantidos em estufa BOD a 32°C para transformação das formas promastigotas em amastigotas-like (modificado Balanco et al. 1998). As promastigotas de *L. (L.) chagas* foram ressuspensas em meio de cultivo Schneider's pH 7.2 acrescido de 20% de SBF, contendo penicilina (50U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e mantidos em estufa a 35°C (Teixeira et al. 2002).

4.5.3. Infecção de macrófagos

As promastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio NNN (Novy, Mc Neal & Nicolle) bifásico, cuja fase sólida foi constituída por ágar sangue com 10% de sangue de coelho e a fase líquida por meio LIT (Liver Infusion Tryptose), com 10% de SBF, 50U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

As promastigotas de *L. (L.) chagasi* foram cultivadas em meio Schneider's suplementado, como descrito para isolamento de promastigotas, item 4.2. As promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* foram mantidas em estufa BOD a 26°C sob agitação e utilizadas no oitavo dia da curva de crescimento para a infecção dos macrófagos.

Para infecção dos macrófagos com as formas amastigotas-like foram utilizados parasitos de *L. (V.) braziliensis* no oitavo dia pós-transformação e décimo para a *L. (L.) chagasi*.

A infecção das células ocorreu na proporção de 10 parasitos (promastigotas e/ou amastigotas-like) por macrófago. Foram utilizados 4×10^5 macrófagos/mL e 4×10^6 parasitos/mL, em volume final de 500 µl de meio RPMI 1640 suplementado (como descrito no item para obtenção dos macrófagos) e aquecido (32°C).

Para promover a infecção com as três espécies, as placas foram mantidas a 33°C com 5% de CO₂ durante três horas para formas promastigotas e amastigotas-like. Após a aspiração do conteúdo de cada poço, foi adicionado 1 mL de meio RPMI 1640 aquecido (32°C), contendo as diferentes concentrações de azitromicina (5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL) e de anfotericina B (0,1 e 0,2 µg/mL). Triplicatas de poços contendo macrófagos infectados receberam meio de cultivo sem drogas. Após 72 horas de cultivo em estufa a 37°C com 5% de CO₂, as lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas em meio RPMI 1640 suplementado, em temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com o corante Giemsa (duas gotas para cada mL) durante 15 minutos.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x). Foram determinados o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por 100 macrófagos em cada lamínula. A atividade leishmanicida das drogas foi avaliada através da fórmula:

$$I = \frac{AT \times 100}{AC}$$

I = % de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga

AT = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo tratado

AC = número de amastigotas/100 macrófagos no grupo não tratado (controle)

4.6. Análise dos dados

As análises estatísticas foram feitas no programa PRISMA versão 3.0 com nível de confiança de 95% e nível de significância $\alpha = 0,05$. Foi utilizado o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn's efetuando comparações entre o percentual de parasitos viáveis (redução do corante alamar Blue™) e as concentrações de drogas estudadas. Nos ensaios com amastigotas intracelulares foi empregado o mesmo teste estatístico para comparar o percentual de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga.

Para determinar a dose efetiva de 50% ou de 90% (DE₅₀ ou DE₉₀ - concentração de droga adicionada a uma cultura *in vitro* de parasitos capaz de reduzir para 50% em relação ao controle crescido sem adição de droga) foi utilizada a análise de regressão linear com o programa MINITAB versão 13.1 e quando não possível, utilizou-se a interpolação linear segundo Huber & Koella 1993. Nas análises de interpolação linear para cálculo de DE₅₀ ou DE₉₀ foi empregada a seguinte equação:

$$DE50 = \frac{b - 50}{b - a} Ca + \frac{50 - a}{b - a} Cb$$

b – percentual de redução maior que 50 (mais próximo)

a – percentual de redução menor que 50 (mais próximo)

Cb – concentração da droga em b

Ca – concentração da droga em a

Observação: os termos **a** e **b** na equação refere-se a percentual de redução nos ensaios com promastigotas e percentual de infecção nos ensaios com amastigotas intracelulares.

5 Resultados

5.1. Atividade *in vitro* da azitromicina contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A presença e quantidade de promastigotas mantidas em cultivo com as concentrações de azitromicina de 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/mL por três dias, foi estimada pela redução do corante alamar Blue™. Utilizando-se a fórmula apresentada em Material e Métodos (item 4.4), a partir das leituras de densidade óticas dos poços-teste e dos poços-controle, determinou-se o percentual de inibição de crescimento dos parasitos. As concentrações de 1000, 1250 e 1500 µg/mL da azitromicina inibiram significativamente o crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente, quando comparados ao controle sem adição de droga (Figura 3).

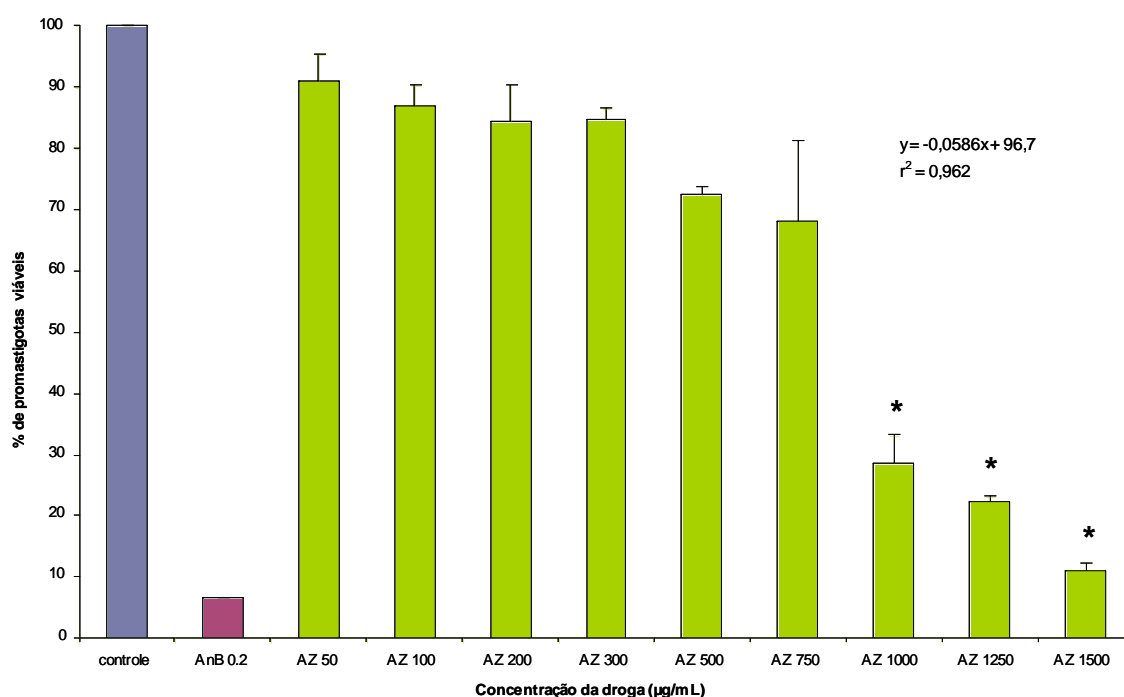


Figura 3 – Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, expressa pelo percentual de inibição de crescimento, após 72 horas de exposição às diferentes concentrações de droga. Os valores representam média \pm desvio padrão de três experimentos. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,05$.

O valor da DE_{50} foi de 789,3 µg/mL calculado através da análise de regressão linear ($r^2 = 0,96$) com intervalo de confiança de 95%. Atividade significativa ($p < 0,05$) foi

observada para todas as concentrações utilizadas de anfotericina B 0,1, 0,2, 0,4 e 1,0 µg/mL. Apenas a concentração 0,2 µg/mL foi apresentada no gráfico.

5.2. Atividade *in vitro* da azitromicina contra promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Para a avaliação da atividade da azitromicina contra promastigotas em cultivo de *L. (V.) braziliensis*, foram também utilizadas as concentrações de 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/mL, mantendo o cultivo de parasitos expostos à drogas por três dias. Inibição significativa do crescimento foi observada para as concentrações de 750 µg/mL ($p < 0,05$), 1000 µg/mL ($p < 0,01$), 1250 µg/mL ($p < 0,001$) e 1500 µg/mL ($p < 0,001$), quando comparadas ao controle sem adição de droga. Para as demais concentrações da droga não ocorreu diferença significativa quando comparadas ao controle (Figura 4).

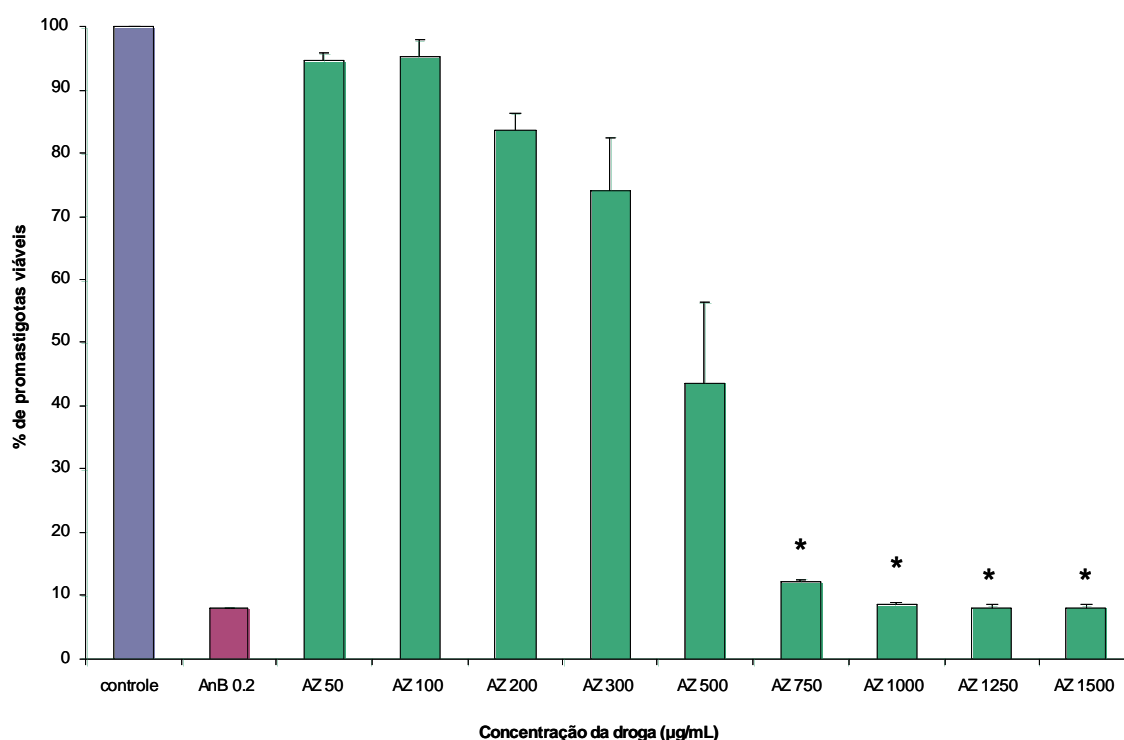


Figura 4 - Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, expressa pelo percentual de inibição de crescimento, após 72 horas de exposição às diferentes concentrações de droga. Os valores representam média \pm desvio padrão de três experimentos. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,05$.

Para as demais concentrações da droga não ocorreu diferença significativa quando comparadas ao controle. A DE_{50} foi de 458,7 µg/mL, obtido através da interpolação linear.

A anfotericina B mostrou-se altamente ativa nas concentrações utilizadas na inibição dos parasitos viáveis.

5.3. Atividade *in vitro* da azitromicina contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*

Da mesma forma que as precedentes, utilizando cultivo de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, a atividade da azitromicina foi avaliada através da redução do corante alamar Blue™ pelos parasitos viáveis. As culturas foram incubadas por três dias com as concentrações de 50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg/mL de azitromicina.

Houve diferença significativa no percentual de parasitos viáveis após 72 horas, para as concentrações de 1000 µg/mL ($p < 0,01$), 1250 µg/mL ($p < 0,01$) e 1500 µg/mL ($p < 0,001$) (Figura 5).

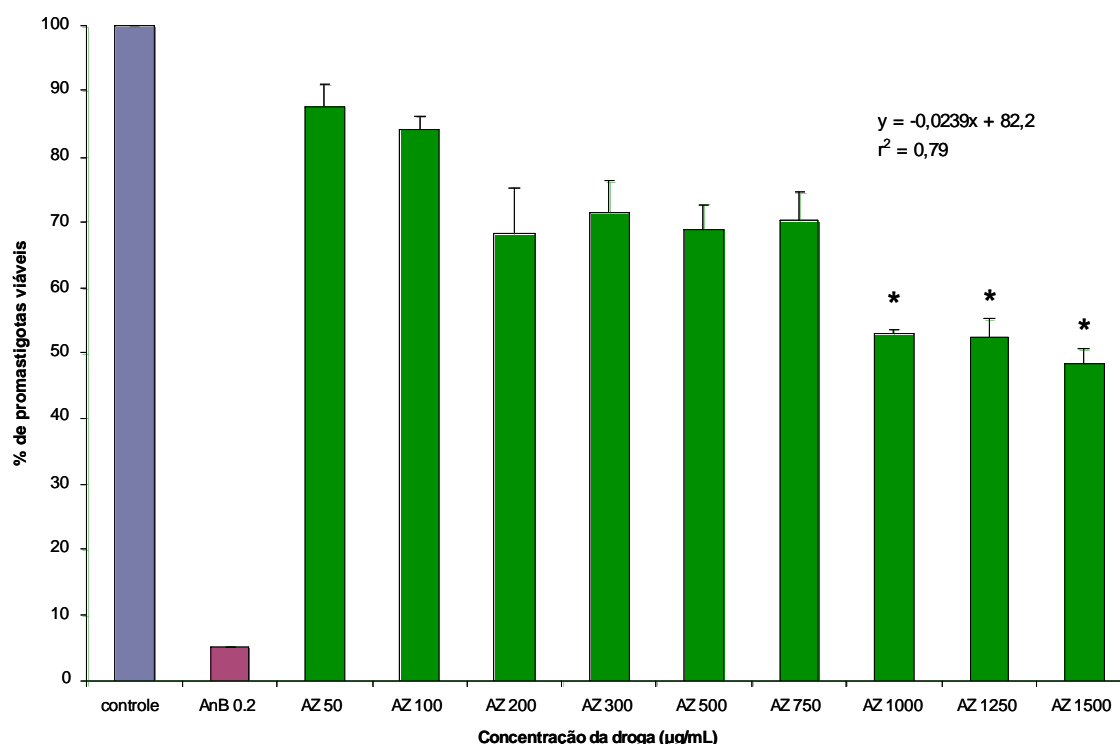


Figura 5 - Atividade da azitromicina (AZ) e anfotericina B (AnB) contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*, expressa pelo percentual de inibição de crescimento, após 72 horas de exposição às diferentes concentrações de droga. Os valores representam média \pm desvio padrão de três experimentos. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,05$.

O valor de DE_{50} foi de 1201,0 µg/mL obtido através da análise de regressão linear ($r^2 = 0,79$) com intervalo de confiança de 95%.

5.4. Atividade *in vitro* da azitromicina contra amastigotas intracelulares de *L.*

(L.) amazonensis

Para a avaliação da atividade da azitromicina contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis* presentes em macrófagos peritoneais de camundongos, determinou-se o percentual de infecção de amastigotas, pela leitura microscópica e contagem de parasitos presentes nos macrófagos dos poços-testes e dos poços controle. As concentrações de azitromicina empregadas neste ensaio foram 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL e 0,1 e 0,2 µg/mL de anfotericina B. Para as concentrações de 75, 100 e 150 µg/mL houve inibição significativa ($p < 0,001$) de parasitos presentes nas células infectadas, quando comparada ao controle sem adição de droga (Figura 6). Para as outras concentrações utilizadas não houve diferença significativa em relação ao controle. Foram infectados com amastigotas 68,2% dos macrófagos peritoneais, com número médio de amastigotas/macrófago infectado de 3,86.

O valor de DE_{90} foi de 64,5 µg/mL, determinado através da interpolação linear. As duas concentrações da droga controle (anfotericina B) utilizadas neste ensaio apresentaram diferença significativa de redução da infecção de amastigotas intracelulares.

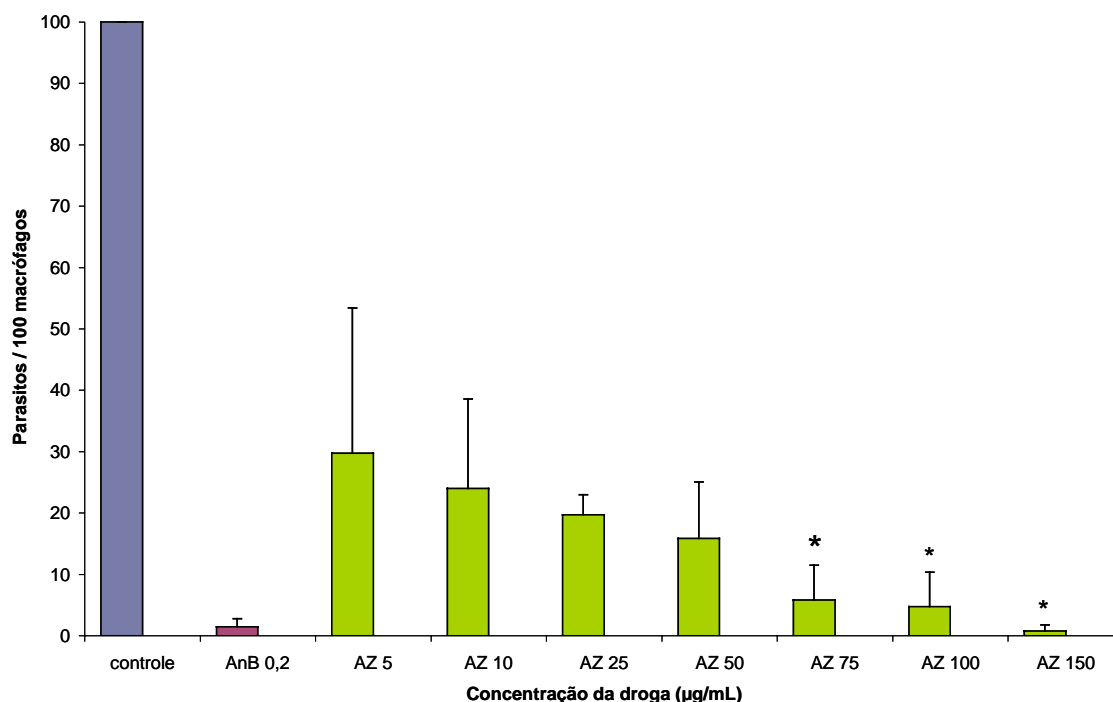


Figura 6 – Atividade da azitromicina (AZ) e da anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, expressa pelo percentual de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga. Os valores representam a média ± desvio-padrão de três experimentos. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,05$.

5.5. Atividade *in vitro* da azitromicina contra amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*

Para avaliação da atividade da azitromicina contra amastigotas de *L. (V.) braziliensis* em macrófagos, foram utilizadas as concentrações 0,1, 0,2, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL. Para o controle de anfotericina B, as concentrações utilizadas foram 0,1 e 0,2 µg/mL.

A atividade da droga foi evidenciada em todas as concentrações estudadas reduzindo o número de amastigotas por macrófagos em mais de 50% para a menor concentração (0,1 µg/mL), em relação ao controle sem droga. Para a concentração de 100 µg/mL houve inibição significativa ($p < 0,05$) de parasitos presentes nas células infectadas, quando comparada ao controle sem adição de droga (Figura 7). Foram infectados com amastigotas 83,7%, dos macrófagos peritoneais, com o número médio de amastigotas/macrófago infectado de 3,96. O valor da DE_{90} foi de 43,9 µg/mL, calculado através da interpolação linear.

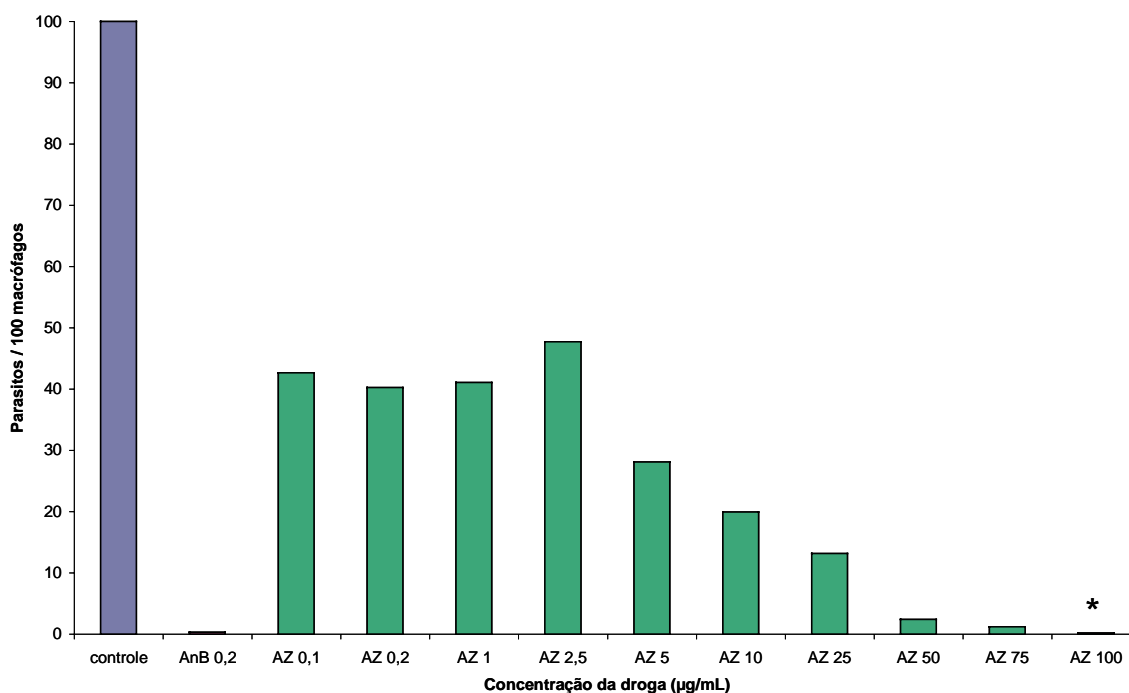


Figura 7 - Atividade da azitromicina (AZ) e da anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*, expressa pelo percentual de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga. O sinal * indica a concentração que apresentou significância estatística em relação ao controle, com valor de $p < 0,05$.

5.6. Atividade *in vitro* da azitromicina contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi*

No ensaio de avaliação *in vitro* da azitromicina em amastigotas intracelulares foram utilizadas as concentrações de 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL. Para a droga controle anfotericina B, as concentrações avaliadas foram 0,1 e 0,2 µg/mL. Não houve redução significativa do percentual de infecção de amastigotas em relação ao controle sem adição de droga para nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 8). As duas concentrações de anfotericina B mostraram-se ativas quando comparadas ao controle. Foram infectados com amastigotas 79,8% dos macrófagos peritoneais, com o número médio de amastigotas/macrófago infectado de 3,06.

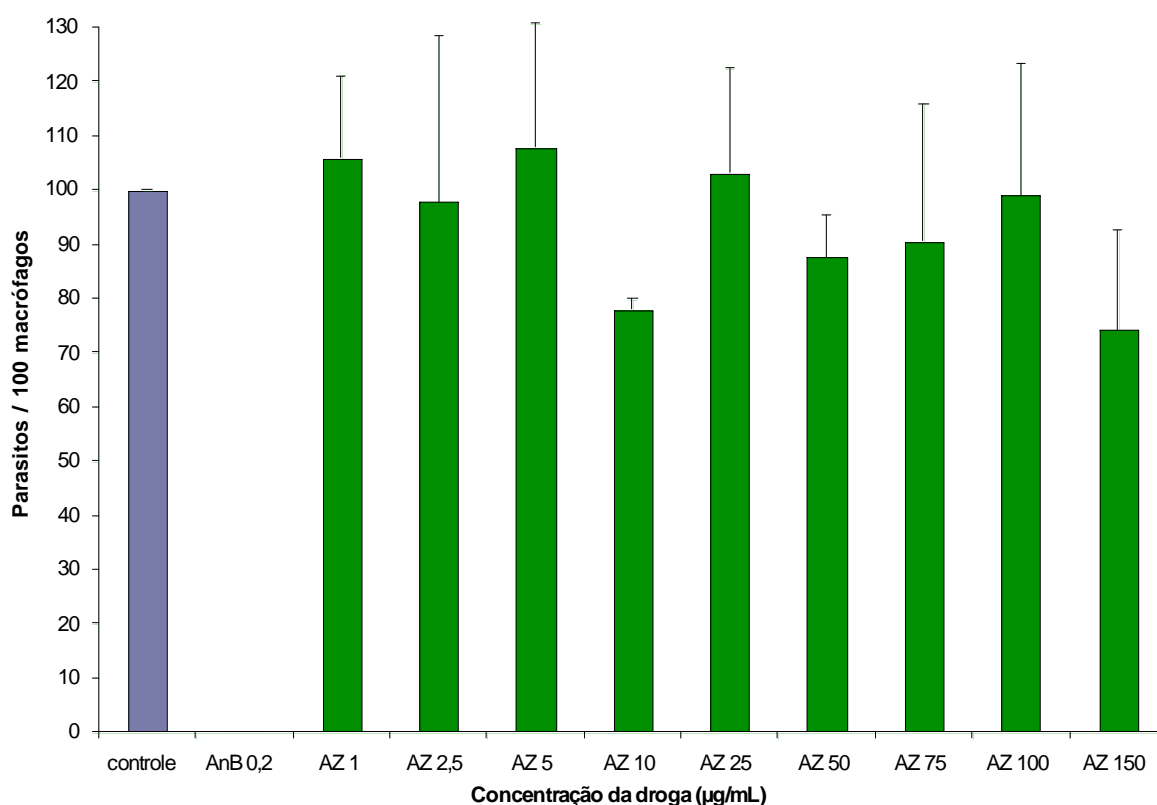


Figura 8 - Atividade da azitromicina (AZ) e da anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi*, expressa pelo percentual de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga. Os valores representam a média ± desvio-padrão de dois experimentos.

A (Figura 9), representa a avaliação *in vitro* da azitromicina em macrófagos infectados com amastigotas axênicas. Neste ensaio, foram infectados 82% dos macrófagos, com o número médio de amastigotas/macrófago infectado de 2,6. Embora a concentração de 300 µg/mL tenha reduzido em 89,6% o número de amastigotas quando comparado ao controle, não houve redução estatisticamente significativa do percentual de infecção de amastigotas em

relação ao controle sem adição de droga para nenhuma das concentrações avaliadas.

Para a concentração de anfotericina B (0,2 µg/mL) houve redução significativa do percentual de infecção de amastigotas intracelulares.

A (Tabela 3), representa a atividade da azitromicina em promastigotas e amastigotas em macrófagos com seus respectivos valores de DE₅₀ e DE₉₀ nas três espécies avaliadas.

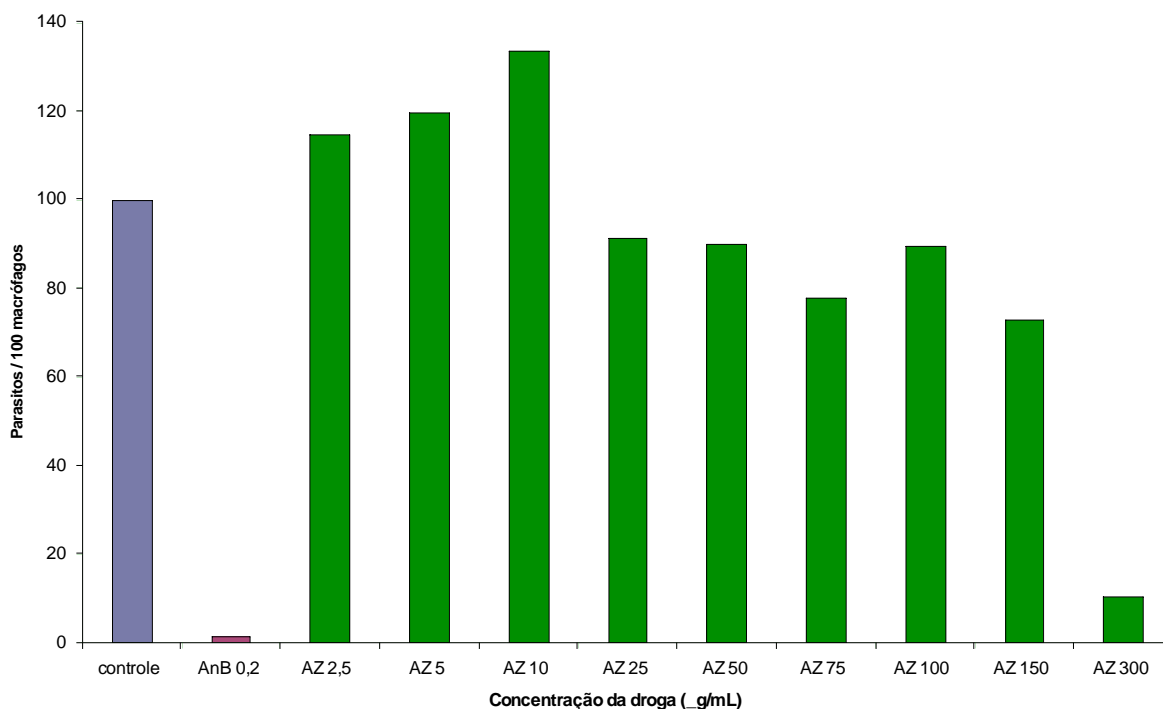


Figura 9 - Atividade da azitromicina (AZ) e da anfotericina B (AnB) contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi*, expressa pelo percentual de infecção de amastigotas/100 macrófagos em relação ao controle sem droga.

Tabela 3: Valores de DE₅₀ e DE₉₀ (µg/mL) para promastigotas e amastigotas intracelulares.

	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) chagasi</i>	Krolewiecki et al. 2002 <i>L. (L.) major</i>
DE ₅₀ (promastigota)	789,3	458,7	1201,0	Não determinada
DE ₉₀ (amastigota intracelular)	64,5	43,9	Não determinada nas concentrações testadas	12

6 Discussão

Várias drogas têm sido utilizadas e/ou ensaiadas para o tratamento das leishmanioses. No entanto, aquelas que mostraram ser mais efetivas e que constituem até hoje, a principal estratégia terapêutica, são os compostos de antimônio. Os compostos antimoniais foram introduzidos em 1945 e permanecem em amplo uso, mas requerem tratamento parenteral prolongado e provocam vários efeitos adversos, alguns deles graves. Além disto, apresentam eficácia variada no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral e é preocupante o surgimento de resistência significativa em alguns países asiáticos e africanos. Estes são alguns dos fatores limitantes para a utilização dessa droga.

Apesar do pequeno investimento industrial na busca de novas drogas para a leishmaniose e outras doenças relacionadas com a pobreza, alguns avanços têm ocorrido. Em março de 2002, a miltefosina foi registrada na Índia como primeira droga oral para tratamento da leishmaniose visceral. Esta droga é relativamente segura e altamente eficaz oferecendo taxas de cura de até 98%. Entretanto, a droga provoca efeitos gastrintestinais, principalmente vômitos e diarreia e tem potencial efeito teratogênico, não devendo ser utilizada em mulheres grávidas ou com vida sexual ativa. A administração da miltefosina a mulheres em idade de procriação, tem exigido o uso concomitante de anticoncepcionais, precedido de exame de gravidez negativo, procedimentos que dificultam em muito, sua ampla utilização. Ainda não há experiência suficiente com esta droga para estimar o impacto deste efeito teratogênico.

Em junho de 2005, durante a 58a. Sessão da Assembléia Mundial da Saúde, sediada pela Organização Mundial da Saúde, os Ministros da Saúde da Índia, Nepal e Bangladesh assinaram um acordo para eliminação da leishmaniose visceral na região do sudeste asiático, com o objetivo de reduzir a incidência anual de calazar a menos de um por dez mil habitantes em 2015. Um dos pilares da iniciativa é o uso da miltefosina para tratamento em massa dos pacientes infectados, o que reduziria a transmissão, uma vez que se trata de antroponose (http://www.who.int/tdr/diseases/leish/press_release.htm - disponível em 02 de junho de 2005).

Há necessidade crescente de drogas alternativas para o tratamento das leishmanioses, que possam oferecer eficácia, segurança, baixo custo e facilidade de administração.

O tratamento de escolha para as diferentes formas da leishmaniose é o antimonial pentavalente, comercializado como Pentostam® e o Glucantime®. Para o tratamento da leishmaniose visceral, o Ministério da Saúde no Brasil recomenda a dose de 20 mg Sb^v/Kg/dia, durante mínimo de 20 dias e máximo de 40 dias. Para a leishmaniose tegumentar, são preconizadas as doses de 15 a 20 mg de Sb^v/Kg/dia durante 20 dias para a leishmaniose

cutânea e 20 mg de Sb^V/Kg/dia por 30 dias para a forma mucosa. No ano de 2004, a compra de antimonial pentavalente representou a despesa de R\$ 9,7 milhões para o Ministério da Saúde, com custo de cada ampola do fármaco a R\$ 4,2 (Silveira-Maia, Gerência de Leishmanioses/Ministério da Saúde, comunicação pessoal).

Para o esquema de tratamento recomendado pela Organização Mundial da Saúde, as drogas de primeira linha apresentam custo elevado, especialmente para o tratamento da leishmaniose visceral, entre US\$30 (estibogluconato de sódio genérico), US\$120 (antimoniato de meglumina) e US\$150 (estibogluconato de sódio comercial). Os pacientes que não respondem ao antimônio podem ser tratados com drogas de segunda linha como a anfotericina B (US\$ 60) ou a pentamidina (US\$ 70), as quais são mais tóxicas. Novas drogas, como a anfotericina B incluídas em lipossomos, têm apresentado resultados eficientes, mas o custo elevado (US\$ 1.500) restringe o seu uso a países industrializados (Desjeux 2004).

A azitromicina atende os principais parâmetros de medicação eficiente e de simplicidade de utilização, com posologia única diária, boa tolerância e administração oral. Já é um medicamento comercializado em diversos países do mundo e já dispomos no Brasil de vários genéricos, com custo aproximado de R\$10,00 por comprimido. A possibilidade de tratamento oral é um fator altamente desejável, principalmente levando-se em conta a dificuldade de acesso a serviços de saúde de grande parte da população acometida pela leishmaniose.

A atividade leishmanicida da azitromicina é favorecida pela sua capacidade de acúmulo em tecidos, elevadas concentrações em mucosas e especialmente em macrófagos, células onde as formas amastigotas da *Leishmania* são principalmente encontradas.

Os modelos biológicos utilizados na busca de novas drogas com atividade leishmanicida podem ser subdivididos em dois grupos: *in vitro*, utilizando promastigotas em cultivo, formas amastigotas em cultivo axênico ou amastigotas em cultura de células, e *in vivo*, pela infecção experimental de animais com diferentes espécies de *Leishmania spp.* Estes ensaios utilizando modelos *in vitro* representam uma importante ferramenta na avaliação de drogas. Eles permitem determinar a atividade dos fármacos com rapidez, simplicidade promovendo uma aproximação do que pode ocorrer no hospedeiro vertebrado.

Os sistemas utilizando promastigotas permitem a informação direta sobre o efeito da droga no parasito. Estes ensaios são muito utilizados devido à facilidade da manutenção desses parasitos *in vitro*, em diferentes meios de cultivo (Teixeira et al., 2002). Este modelo permite a identificação rápida de compostos candidatos para testes futuros em amastigotas axênicas ou intracelulares. Uma limitação desse tipo de ensaio são as diferenças morfológicas e bioquímicas da susceptibilidade dos dois estágios para os compostos leishmanicidas.

Os métodos automatizados permitem a rapidez e a avaliação de maior número de drogas. Os métodos mais recentes para a avaliação de compostos com possível atividade leishmanicida utilizam a proteína verde fluorescente (GFP) e promastigotas transfectadas com a luciferase (Croft et al. 2002). O método colorimétrico utilizado no presente estudo mostrou-se como um indicador apropriado de viabilidade dos parasitos nos ensaios com promastigotas das três espécies estudadas. Observou-se elevada correlação entre leitura de densidade ótica e tempo de cultivo, que favoreceu a escolha pelo método colorimétrico. O método colorimétrico apresentou a vantagem de simplicidade e reprodutibilidade de leitura.

Atualmente, os ensaios têm sido mais direcionados ao estágio intracelular do parasito que é responsável pela doença no hospedeiro mamífero. O cultivo *in vitro* de amastigotas tem o potencial de produzir organismos livres de componentes contaminantes derivados do hospedeiro, podendo eficientemente ser empregados na avaliação de drogas, clonagem, identificação de genes e produção de vacinas (Gupta et al. 2001). Algumas desvantagens desse modelo estão relacionadas à necessidade de condições especiais para que as várias cepas de *Leishmania* se adaptem e sobrevivam sendo um modelo mais difícil tecnicamente.

Os modelos *in vitro* de células hospedeiras utilizando macrófagos peritoneais de camundongos, monócitos humanos ou células de ovário de hamster chinês oferecem opções adequadas para teste da atividade leishmanicida de novas drogas (Di Giorgio et al. 2000). Os sistemas que empregam amastigotas intracelulares são ensaios mais complexos do que os que utilizam promastigotas, porque eles necessitam de culturas de células (Fumarola et al. 2004) ou da obtenção de macrófagos peritoneais.

No presente estudo, demonstrou-se que a azitromicina apresenta atividade *in vitro* contra, as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, inibindo a multiplicação de promastigotas e amastigotas em macrófagos peritoneais. Este é o primeiro estudo da sensibilidade *in vitro* da azitromicina contra estas espécies, já que os dois estudos disponíveis na literatura avaliaram o potencial leishmanicida *in vitro* e/ou *in vivo* dessa droga contra a espécie *L. (L.) major*.

Nesse estudo, foi observada a ação direta da azitromicina sobre a diminuição do número de promastigotas das três espécies estudadas. No estudo de Krolewiecki et al. (2002) o efeito da redução significativa do número de promastigotas foi observado nos cultivos com as concentrações de 100 e 1000 µg/mL. No presente ensaio, as concentrações de azitromicina necessárias para reduzir significativamente o número de promastigotas foram 1000 µg/mL para a *L. (L.) amazonensis*, 750 µg/mL para a *L. (V.) braziliensis* e 1000 µg/mL para a *L. (L.) chagasi*. Não é possível afirmar que a azitromicina apresenta ação mais eficaz sobre a *L. (L.)*

major do que sobre as espécies avaliadas nesse estudo. Há diferenças de protocolos, como o meio de cultivo e o tempo de exposição à droga. Krolewiecki et al. (2002) determinaram a atividade da azitromicina após seis dias de exposição, enquanto nesse estudo os parasitos permaneceram em contato com a droga por três dias. O tempo mais prolongado de exposição à droga pode explicar a ausência de efeito dose-dependente observada por esses autores para as duas únicas concentrações utilizadas (100 e 1000 µg/mL).

O mecanismo pelo qual a azitromicina reduz o número de parasitos ainda não é conhecido. Há evidências que a droga tem efeito direto sobre os protozoários *T. gondii* (Cantin & Chamberland 1993) e *Plasmodium* (Gingras & Jensen 1992; Biswas 2001; Orth et al. 2002) através da inibição da síntese de proteínas (Blais et al. 1993). Os resultados do presente estudo sugerem que a azitromicina apresenta efeito direto sobre promastigotas, como demonstrado também pelo estudo de Krolewiecki et al. (2002), mencionado acima.

Foram necessárias concentrações bastante inferiores de azitromicina para alcançar efeito inibitório significativo sobre amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* quando comparadas com aquelas necessárias para inibir o crescimento das curvas de cultivo de promastigotas. Este fato provavelmente deve-se à propriedade da azitromicina de concentrar nos tecidos. A droga alcança concentrações de 10 a 100 vezes maiores nos tecidos do que no soro. Segundo Gladue et al. (1989), após duas horas de incubação, a proporção intracelular/extracelular de azitromicina foi de 79 em polimorfonucleares humanos e de 62 em macrófagos peritoneais de animais.

Um dos mecanismos de ação da azitromicina é a indução inespecífica da atividade macrofágica sobre patógenos (Xu et al. 1996). Em relação à atividade leishmanicida, o estudo de Tanyuksel et al. (2003) sugere efeito independente do aumento da capacidade fagocítica.

Krolewiecki et al. (2002) observaram que as concentrações de azitromicina eficazes em reduzir o número de amastigotas de *L. (L.) major* em macrófagos (12 µg/mL) foram 6,7 vezes menores do que as necessárias para inibir o crescimento de formas promastigotas. No nosso estudo, para a espécie *L. (L.) amazonensis*, esta relação foi de 13,3 vezes, sendo 1000 µg/mL a concentração significativa para promastigotas e 75 µg/mL para amastigotas. Para a espécie *L. (V.) braziliensis*, com concentração inibitória mínima de 750 µg/mL para promastigotas e 100 µg/mL para amastigotas intracelulares, a razão é de 7,5 vezes.

Embora a DE₉₀ da azitromicina sobre *L. (V.) braziliensis* (43,9 µg/mL) seja menor do que a determinada para *L. (L.) amazonensis* (64,5 µg/mL), sugerindo maior atividade sobre a primeira, os resultados da concentração inibitória mínima são discordantes, sendo de 100 µg/mL para *L. (V.) braziliensis* de 75 µg/mL para *L. (L.) amazonensis*. É possível que para *L. (V.) braziliensis*, significância estatística de concentração inibitória mínima não tenha sido

detectada para concentrações menores de azitromicina, devido ao pequeno número de observações, consequência de apenas um ensaio com esta espécie/modelo ter sido realizada.

No ensaio com *L. (L.) chagasi* não foi observada significância estatística em nenhuma das concentrações de azitromicina utilizadas, necessitando talvez de concentrações acima de 150 µg/mL para proporcionar a inibição da multiplicação das amastigotas nessa espécie. No experimento em que foram utilizadas amastigotas axênicas para infecção dos macrófagos, a concentração de 300 µg/mL de azitromicina inibiu 89,6% da infecção, sendo o percentual de infecção de 10,4%, em relação ao controle (100%). Não foi observada significância estatística para a concentração inibitória mínima nesse ensaio. O evento provalmente tenha ocorrido devido ao pequeno número de observações (um ensaio).

Nesse estudo, o efeito da azitromicina em modelo de macrófago foi dose-dependente para as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo o mesmo foi observado nos estudos com *L. (L.) major* (Krolewiecki et al., 2002).

Foram ressaltadas outras duas diferenças quando comparados os modelos de macrófagos infectados do nosso estudo e o de Krolewiecki et al. (2002): o modelo de macrófago utilizado e o tempo de exposição à droga. Nos ensaios realizados por esses autores, os macrófagos foram provenientes de medula e em nosso estudo, foram utilizados macrófagos peritoneais.

Os modelos *in vitro* empregando macrófagos peritoneais são úteis para avaliação de drogas contra diferentes espécies de *Leishmania*. De acordo com Berman & Neva (1981), esse modelo é o que mais se aproxima da situação *in vivo*, na qual os parasitos *Leishmania* são encontrados predominantemente na forma amastigota dentro dos macrófagos. Os macrófagos podem ativamente concentrar as drogas dentro dos fagolisossomos que contém os parasitos (Berman & Wyler 1980). Os sistemas que empregam as formas amastigotas intracelulares permitem a informação da influência do macrófago sobre a atividade da droga leishmanicida. Outra vantagem, segundo esses autores, é que os macrófagos humanos permitem o metabolismo das drogas para derivados com possível atividade leishmanicida.

De acordo com Croft et al. (2002) a maior limitação deste ensaio é o método utilizado para avaliar a atividade da droga. O parâmetro de medida sobrevivência/viabilidade nos macrófagos após a atividade da droga requer tempo e utilizam câmaras para cultura de tecido de custo elevado.

As infecções causadas pela *L. (V.) braziliensis* demandam maior atenção, devido à incerteza de cura, capacidade de produzir lesões à distância tanto na pele como em mucosas e a elevada frequência de recidivas. A forma mucosa é causada principalmente pela *L. (V.)*

braziliensis, mas ocasionalmente o acometimento mucoso pode ser associado à infecção por *L. (V.) guyanensis* (Naiff et al. 1988; Santrich et al., 1990), *L. (Leishmania) amazonensis* (Barral et al., 1991) e *L. (V.) panamensis* (Saravia et al., 1985). A espécie *L. (V.) braziliensis* mostrou-se mais sensível à azitromicina, com acetuada inibição do crescimento das formas promastigotas e redução do número de amastigotas intracelulares.

A anfotericina B foi empregada como droga controle nos ensaios devido à sua atividade leishmanicida para diferentes espécies. No presente estudo, a droga foi extremamente ativa contra as espécies de *Leishmania* estudadas, para ambos os estágios promastigotas e amastigotas intracelulares. As concentrações empregadas foram menores que as concentrações encontradas no plasma de humanos (1,0 µg/mL), após receberem uma dose de 70 mg por via intravenosa (Berman & Wyler 1980). Nesse estudo, as concentrações da droga controle nos ensaios com amastigotas intracelulares, foram mais eficientes na eliminação dos parasitos quando comparado ao estudo de Krolewiecki et al. (2002).

O tempo de exposição das células infectadas à azitromicina no estudo de Krolewiecki et al. (2002) foi de seis dias. No presente estudo, o fármaco permaneceu durante três dias nas placas de cultivo. Este fato pode dificultar a comparação entre os dois estudos. A concentração de pico da azitromicina no soro que se segue à administração de uma dose oral de 500 mg é aproximadamente 0,4µg/mL. O pico de concentração ocorre duas a três horas após a administração. Foulds et al. (1990) demonstraram que as concentrações de azitromicina variam de 1 a 9 mg/Kg em muitas amostras de tecidos obtidas entre 12 horas e três dias após dose de 500 mg e esses níveis elevados persistem por dias nos tecidos. A estimativa da meia-vida sérica é de um a seis dias após o regime de doses múltiplas de 500 mg (57 h ou 2,4 dias) e o mesmo ocorre para a estimativa da meia-vida da droga nos tecidos (2.3 – 3.2 dias). O tempo de exposição dos macrófagos à azitromicina no presente estudo foi de três dias, definido tendo como base os trabalhos da literatura, a meia-vida da droga nos tecidos e testes de padronização do ensaio.

Neste estudo, a azitromicina demonstrou atividade *in vitro* sobre *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, nos dois modelos empregados e pode constituir alternativa eficaz e simples para o tratamento das leishmanioses. Os resultados deste estudo, mostrando susceptibilidade de espécies causadoras de leishmaniose cutânea em nosso meio, permitiram definir um estudo clínico para avaliação de eficácia da azitromicina no tratamento da leishmaniose cutânea, em andamento no Centro de Referência em Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.

7 Conclusões

A azitromicina apresentou atividade *in vitro* sobre formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

A azitromicina apresentou atividade *in vitro* sobre amastigotas intracelulares das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

8 Referências Bibliográficas

Adler-Moore J. AmBisome targeting to fungal infections. **Bone Marrow Transplant.** 1994; 4 Suppl 5:S3-7.

Akuffo H, Dietz M, Teklemariam S, Tadesse T, Amare G, Berhan TY. The use of itraconazole in the treatment of leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1990;84(4):532-4.

Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **N Engl J Med.** 2002 21;346(12):891-5.

Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev.** 1997;10(2):298-319.

Amato VS, Rabello A, Rotondo-Silva A, Kono A, Maldonado TP, Alves IC, Floeter-Winter LM, Neto VA, Shikanai-Yasuda MA. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. **Acta Trop.** 2004;92(2):127-32.

Balana-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen Pharmacol.** 1998;30(4):435-43.

Balanco JM, Pral EM, Da Silva S, Bijovsky AT, Mortara RA, Alfieri SC. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigotes-like stages. **Parasitology.** 1998;116:103-13.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg.** 1991;44(5):536-46.

Berens RL, Marr JJ, Nelson DJ, LaFon SW. Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**. 1980 Sep 1;29(17):2397-8.

Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, KUZOE F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull World Health Organ**. 1998;76(1):25-32.

Berman JD, Neva FA. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages *in vitro*. **Am J Trop Med Hyg**. 1981;30(2):318-21.

Berman JD, Wyler DJ. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. **J Infect Dis**. 1980;142(1):83-6.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev Infect Dis**. 1988;10(3):560-86.

Berman JD. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis**. 2003;16(5):397-401.

Berman JD. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniases. **Clin Dermatol**. 1996;14(5):519-22.

Biswas S. *In-vitro* antimalarial activity of azithromycin against chloroquine sensitive and chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. **J Postgrad Med**. 2001;47(4):240-3.

Blais J, Garneau V, Chamberland S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin. **Antimicrob Agents Chemother**. 1993;37(8):1701-3.

Blondeau JM, Decarolis E, Metzler KL, Hansen GT. The macrolides. **Expert Opin Investig Drugs**. 2002;11(2):189-215.

Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. **J Antimicrob Chemother.** 2004;53(2):158-66.

Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Trop Med Int Health.** 2001;6(11):928-34.

Bryceson AD, Chulay JD, Mugambi M, Were JB, Gachihi G, Chungu CN, Muigai R, Bhatt SM, Ho M, Spencer HC, et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1985;79(5):705-14.

Cantin L, Chamberland S. In vitro evaluation of the activities of azithromycin alone and combined with pyrimethamine against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother.** 1993;37(9):1993-6.

Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1988;82(1):69-72.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.** 2003;19(11):502-8.

Croft SL, Davidson RN, Thornton EA. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother.** 1991;28 Suppl B:111-8.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol.** 1987 15;36(16):2633-6.

Croft SL, Yardley V, Kendrick H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2002;96 Suppl 1:S127-9.

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des.** 2002;8(4):319-42.

Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop Med Int Health.** 2001;6(11):899-905.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ.** 2003; 15;326(7385):377-82.

Davidson RN, Croft SL, Scott A, Maini M, Moody AH, Bryceson AD. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. **Lancet.** 1991;4;337(8749):1061-2.

Davidson RN. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs.** 1998;56(6):1009-18.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ.** 2003;15;326(7385):377-82.

Desjeux P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol.** 2004 Sep;2(9):692.

Di Giorgio C, Ridoux O, Delmas F, Azas N, Gasquet M, Timon-David P. Flow cytometric detection of *Leishmania* parasites in human monocyte-derived macrophages: application to antileishmanial-drug testing. **Antimicrob Agents Chemother.** 2000;44(11):3074-8.

Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, Sanchez J, Schuster B, Groggl M. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** 2001;65(6):685-9.

Elkhoury ANM, Rabello A, Arakaki D, Cupolillo E, Romero GAS, Santos J, Lindoso JAL, Luz K, Paz LC, Inocência LA, Hueb M, García-Zapata MTA, Sánchez M, Amato VS, 2004. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes portadores da co-infecção *Leishmania*-HIV.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids, Brasília, DF, 77p (Série A Normas e Manuais Técnicos – MS) – (Série Manuais; nº 49 – PNDST/Aids)

Epstein ME, Amodio-Groton M, Sadick NS. Antimicrobial agents for the dermatologist. II. Macrolides, fluoroquinolones, rifamycins, tetracyclines, trimethoprim-sulfamethoxazole, and clindamycin. **J Am Acad Dermatol.** 1997;37(3 Pt 1):365-81; quiz 382-4.

Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.** 2002;81(2):151-7.

Foulds G, Madsen P, Cox C, Shepard R, Johnson R. Concentration of azithromycin in human prostatic tissue. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 1991;10(10):868-71.

Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. **J Antimicrob Chemother.** 1990;25 Suppl A:73-82.

Frezard F, Michalick MS, Soares CF, Demicheli C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Braz J Med Biol Res.** 2000;33(7):841-6.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res Microbiol.** 2004;155(4):224-30.

Gingras BA, Jensen JB. Activity of azithromycin (CP-62,993) and erythromycin against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Am J Trop Med Hyg.** 1992;47(3):378-82.

Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. **Antimicrob Agents Chemother.** 1989;33(3):277-82.

Gladue RP, Snider ME. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. **Antimicrob Agents Chemother** 1990;34(10):2041.

Gontijo CM, Falcao AR, Falcao AL, Coelho MDE V. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1995;90(3):367-73.

Gupta N, Neena G, Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends in Parasitology.** 2001;17(3):150-153.

Gupta S, Tiwari S, Bhaduri AP, Jain GK. Anilino-(2-bromophenyl) acetonitrile: a promising orally effective antileishmanial agent. **Acta Trop.** 2002;84(3):165-73.

Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. **Clin Infect Dis.** 1996;22 Suppl 2:S133-44.

Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. **J Assoc Physicians India.** 1991;39(4):314-6.

Jha TK, Giri YN, Singh TK, Jha S. Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. **Am J Trop Med Hyg.** 1995;52(6):536-8.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med.** 1999 9;341(24):1795-800.

Krolewiecki A, Leon S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycin against *Leishmania major* *in vitro* and *in vivo*. **Am J Trop Med Hyg.** 2002;67(3):273-7.

Lalak NJ, Morris DL. Azithromycin clinical pharmacokinetics. **Clin Pharmacokinet.** 1993;25(5):370-4.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1987;81(4):702-3.

Lescano SA, Amato Neto V, Chieffi PP, Bezerra RC, Gakiya E, Ferreira CS, Braz LM. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, for treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma gondii* cystogenic strain. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2004;37(6):460-2.

Maarouf M, Lawrence F, Brown S, Robert-Gero M. Biochemical alterations in paramomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. 199;83:198-202.

Marr JJ, Berens RL. Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in *Leishmania* species to the action of allopurinol. **J Infect Dis.** 1977;136(6):724-32.

Martinez S, Marr JJ. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **New England Journal of Medicine.** 1992; 326:741-4.

Minodier P, Retornaz K, Horelt A, Garnier JM. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Fundam Clin Pharmacol.** 2003;17(2):183-8.

Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001;45(8):2185-97.

Naiff RD, Talhari S, Barrett TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1988;83(4):529-30.

Neal RA, Allen S, McCoy N, Oliaro P, Croft SL. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. **J Antimicrob Chemother.** 1995;35(5):577-84.

Oliveira-Neto M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Rio de Janeiro. Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, **Tese doutorado**, 166p, 1998.

Oliaro PL, Bryceson AD. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol Today.** 1993;9(9):323-8.

Orth C, Wllingmyre GD, Lee P, Knirsh C, Milhous W. Assessment of azithromycin in combination with other antimalarial drugs *Plasmodium falciparum* in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2002;2518-2524.

Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli. A. Adverse effects of macrolide antibacterials. **Drug Saf.** 1993;9(5):346-64.

- Peters DH, Friedel HA, Mc Tavish D. Azithromycin: A review of its antimicrobial activity pharmacokinetic properties and clinical efficacy. **Drugs**. 1992;44(5):750-799.
- Prata A, Silva-Vergara ML, Costa L, Rocha A, Krolewiecki A, Silva JC, DE Paula EV, Pimenta Junior FG, Giraldo LE. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2003;36(1):65-9.
- Remme JH, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PM, Engers HD, Kanyok TP, Kengeya Kayondo JF, Kioy DW, Kumaraswami V, Lazdins JK, Nunn PP, Oduola A, Ridley RG, Toure YT, Zicker F, Morel CM. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends Parasitol**. 2002; 18(10):421-6.
- Ress BD, Gross EM. Irreversible sensorineural hearing loss as a result of azithromycin ototoxicity. A case report. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 2000;109(4):435-7.
- Robert A, Briggaman MD. The aromatic diamidines. **International Journal of dermatology**. 1977;16(3):155-162.
- Rosenblatt JE. Antiparasitic agents. **Mayo Clin Proc**. 1999;74(11):1161-75.
- Rosenthal E, Marty P. Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**. 2003;49(1):61-8.
- Sands M, Kron MA, Brown RB. Pentamidine: a review. **Rev Infect Dis**. 1985;7(5):625-34.
- Sangraula H, Sharma KK, Rijal S, Dwivedi S, Koirala S. Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine. **J Assoc Physicians India**. 2003;51:686-90.
- Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. **Am J Trop Med Hyg**. 1990;42(1):51-5.
- Saravia NG, Holguin AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. **Am J Trop Med Hyg**. 1985;34(4):714-20.

Scheinfeld NS, Tutrone WD, Torres O, Weinberg JM. Macrolides in dermatology.

Dis Mon. 2004;50(7):350-68.

Schlossberg D. Azithromycin and clarithromycin. **Med Clin North Am.** 1995;79(4):803-15.

Schwab CJ, Cao Y, Slowik MR, Joiner KA. Localization of azithromycin in *Toxoplasma gondii*-infected cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 1994;1620-1627.

Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int J Antimicrob Agents.** 2003;22(4):380-7.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemestre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob Agents Chemother.** 1998;42(12):3097-102.

Sereno D, Lemestre JL. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrob Agents Chemother.** 1997;41(5):972-6.

Sherwood JA, Gachihi GS, Muigai RK, Skillman DR, Mugo M, Rashid JR, Wasunna KM, Were JB, Kasili SK, Mbugua JM, Et AL. Phase 2 efficacy trial of an oral 8-aminoquinoline (WR6026) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis.** 1994;19(6):1034-9.

Shih CM, Wang CC. Ability of azithromycin in combination with quinine for the elimination of babesial infection in humans. **Am J Trop Med Hyg.** 1998;59(4):509-12.

Silva-Vergara ML, Silva LDE A, Maneira FR, DA Silva AG, Prata A. Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2004;46(3):175-7.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J Infect Chemother.** 2004;10(6):307-15.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**. 2004 1;38(9):1266-72.

Soto J, Buffet P, Grogl M, Berman J. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. **Am J Trop Med Hyg**. 1994;50(1):107-11.

Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, Fischer C, Voss A, Berman J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin Infect Dis**. 2001 1;33(7):E57-61.

Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. **Ann Intern Med**. 1997 15;127(2):133-7.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, BERMAN J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**. 2002;28;347(22):1739-46.

Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis**. 2002;15(6):593-8.

Sundar S, Singh VP, Agrawal NK, Gibbs DL, Murray HW. Treatment of kala-azar with oral fluconazole. **Lancet**. 1996 31;348(9027):614.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**. 2001;6(11):849-54.

Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. **Med Microbiol Immunol (Berl)**. 2001;190(1-2):89-92.

TanyukseL M, Bas AL, Araz E, Aybay C. Determination of intracellular efficacies of azithromycin against *Leishmania major* infection in human neutrophils in vitro. **Cell Biochem Funct**. 2003;21(1):93-6.

Teixeira MC, DE Jesus Santos R, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L, Dos-Santos WL. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol Res.** 2002;88(11):963-8.

Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Zaniewski AE, Houlihan HH, Olliaro P.A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2000;94(4):429-31.

Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transpl Infect Dis.** 1999;1(4):273-83.

Urcuyo FG, Zaias N. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. **Int J Dermatol.** 1982;21(7):414-6.

Van Voorhis WC. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. **Drugs.** 1990;40(2):176-202.

Vohringer HF, Arasteh K. Pharmacokinetic optimisation in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clin Pharmacokinet.** 1993;24(5):388-412.

Weinrauch L, Livshin R, el-On J. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. **Br J Dermatol.** 1987;117(5):666-8.

WHO (WORDL HEALTH ORGANIZATION). Disponível em 02 de junho de 2005. http://www.who.int/tdr/diseases/leish/press_release.htm.

WHO (WORDL HEALTH ORGANIZATION). Junho de 2005. Disponível: http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_leish.htm.

WHO (WORDL HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis. Junho de 2005. Disponível: <http://www.who.int/tdr>.

Wildfeuer A, Laufen H, Zimmermann T. Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under *in vivo* conditions. **Antimicrob Agents Chemother.** 1996 Jan;40(1):75-9.

Xu G, Fujita J, Negayama K, Yuube K, Hojo S, Yamaji Y, Kawanishi K, Takahara J. Effect of macrolide antibiotics on macrophage functions. **Microbiol Immunol.** 1996;40(7):473-9.

Zuckerman JM. The newer macrolides: azithromycin and clarithromycin. **Infect Dis Clin North Am.** 2000;14(2):449-62, x.