UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estatinas como coadjuvantes nos tratamentos da doença de Chagas e
leishmanioses

Kelly Cristina Rodrigues

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estatinas como coadjuvantes nos tratamentos da doença de Chagas e
leishmanioses

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Kelly Cristina Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 31/01/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Kelly Cristina

Estatinas como coadjuvantes nos tratamentos da doença de Chagas e leishmanioses. Ribeirão Preto, 2013.

127p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio

Trypanosoma cruzi. 2. *Leishmania* sp. 3. Estatinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Kelly Cristina Rodrigues

Título do trabalho: Estatinas como coadjuvantes nos tratamentos da doença de Chagas e leishmanioses

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico...

*Aos meus pais, **José Luiz Rodrigues e Tania Sandra Dalla Costa Rodrigues**, pessoas indispensáveis nessa conquista. Obrigada pelo amor, cuidado, dedicação e sacrifícios devotados a mim, com o intuito de me oferecer a melhor herança, a educação.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

“Mesmo nos momentos de maiores dificuldades, agradeça a Deus. Agradeça por cada lágrima, por cada noite mal dormida, por cada dor sentida. No fim, tenha a certeza, tudo foi necessário para que você chegasse exatamente onde deveria”.

... Assim, agradeço a Deus por ter me concedido força, paciência e determinação. Por todas as vitórias, as derrotas e o aprendizado que cada momento me trouxe.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a concretização desse trabalho.

Em especial...

*Aos **meus pais** e ao **meu irmão Luis Gustavo Rodrigues**, pela força, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões. Meu eterno amor e gratidão!*

*Ao **Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque**, pela orientação, ensinamentos, apoio e confiança depositada em mim e no meu trabalho. Agradeço pela oportunidade concedida durante esses quatro anos, além do mestrado, que me fizeram crescer e amadurecer não só profissionalmente, mas como pessoa.*

*À **Cássia Mariana Bronzon da Costa** (“florzinha”), pela amizade que começou tímida e aos poucos se tornou tão especial e essencial aos meus dias, minha irmãzinha postíça! Obrigada por estar ao meu lado sempre, nos momentos bons e ruins, pela sua cumplicidade, sinceridade, pelo carinho que tem por mim e por esse coração imenso.*

*À **Míriam Paula Alonso Toldo**, pela amizade, companheirismo e auxílio fundamental em parte dos experimentos desde o início. Esses quase 7 anos de convivência, entre mestrado e doutorado, além de nos aproximar profissionalmente, nos deu a chance de sermos amigas. Obrigada pela paciência e pelo coração generoso de sempre.*

À **Mariana Rosa** e **Mariana Bryan**, pelo apoio, dedicação e ajuda em vários momentos, acadêmicos e pessoais. Pela companhia e auxílio nos finais de semana e feriados que passamos no laboratório. Muito obrigada pela amizade “Maris”!

Aos meus tios, **Selma** e **Carlos**, e a minha priminha Bárbara, apesar de não estarem tão presentes durante a caminhada acadêmica, fizeram meus finais de semana em Pitangueiras mais alegres. A companhia, o carinho e as palavras de incentivo de vocês sempre foram muito importantes. Obrigada por tudo!

Às minhas avós queridas, **Orides** e **Neide**, pelas orações, palavras de carinho e orgulho a cada nova conquista. Pelo apoio, confiança e amor dispensados a mim em todos os momentos da minha vida. A minha gratidão e carinho eternos!

Ao pós-graduando **Luiz Miguel Pereira**, pela serenidade, pelo auxílio, pelas dicas e discussões de trabalho, mas, sobretudo pela sua amizade. Obrigada “Buda”!

Ao **Théo** e à **Kyara**, meus lindos gatinhos, pela companhia diária e durante todo o tempo que estive escrevendo essa tese, me trazendo calma, equilíbrio e discernimento nos momentos necessários.

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, **Cristiana Gonzalez**, **Georgius Luiz de Oliveira** e **Inara Fernanda Gallo**, pelo apoio e auxílio fundamentais no dia-a-dia e nos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia, **Gisele**, **Janaína**, **Murilo**, **Fabricia**, **Vânia**, **Marina**, **Luiz Gustavo**, **Larissa** e **Christian**, pela convivência e por todas as conversas, desde as dúvidas de trabalho, aos momentos de descontração.

À todos os docentes do laboratório de Parasitologia pela amizade e colaboração.

Às funcionárias da FCFRP-USP, **Ana Turatti**, **Maraísa Palhão Vérri**, **Amélia Regina Azevedo Aguenta Albuquerque**, **Vânia Cláudia de Albuquerque**, **Wania Maria Tavares da Silva** e aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FCFRP-USP, **Rosana Ferreira L.S. Florêncio** e **Henrique Theodoro** pela dedicação e profissionalismo.

Aos **camundongos BALB/c**, modelos experimentais adotados, que involuntariamente contribuíram para a realização deste trabalho, em prol da busca por novas terapias.

Ao **laboratório de Parasitologia da FCFRP** por fornecer uma excelente infra-estrutura, o que tornou possível a realização dos experimentos.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP** e ao programa de Biociências Aplicadas à Farmácia pela oportunidade de realização do doutorado e pela estrutura física e científica de excelência.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo nº 2009/17108-3 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), processo nº 473769/2011-5, pela bolsa concedida e apoio financeiro, o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Sumário

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Doença de Chagas e Leishmaniose.....	1
1.2.Colesterol e Ergosterol.....	16
1.3.Inibidores da biossíntese de esterol.....	21
1.4. Estatinas.....	26
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Proposta de substâncias a serem testadas.....	33
3.2. Espécies e linhagens a serem utilizadas.....	34
3.3. Manutenção do cultivo celular.....	34
3.4. Avaliação da citotoxicidade das substâncias.....	35
3.5. Ensaio biológico <i>in vitro</i>	36
3.5.1. Sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania major</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	36
3.5.2. Sobre as formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania major</i> e <i>Leishmania braziliensis</i>	37
3.5.3. Sobre as formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.5.4. Sobre as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
3.5.5. Sobre as formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	39
3.5.6. Associação entre as estatinas e os medicamentos de referência benzonidazol e anfotericina B.....	40
3.6. Ensaio biológico <i>in vivo</i>	41

3.6.1. Sobre <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania major</i>	41
3.6.2. Sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3.7. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade das substâncias.....	46
4.2. Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
4.2.1. Sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	49
4.2.2. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	52
4.2.3. Sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	54
4.2.4. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	57
4.2.5. Sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	59
4.2.6. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	60
4.3. Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre <i>Leishmania braziliensis</i>	63
4.3.1. Sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	63
4.3.2. Associação entre as estatinas e a anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	66
4.3.3. Sobre as formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i>	69
4.4. Ensaio biológico <i>in vitro</i> sobre <i>Leishmania major</i>	69
4.4.1. Sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i>	69
4.4.2. Associação entre as estatinas e a anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i>	72
4.4.3. Sobre as formas amastigotas de <i>L. major</i>	76
4.5. Ensaio biológico <i>in vivo</i>	76
4.5.1. Ensaio <i>in vivo</i> para <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
4.5.2. Ensaio <i>in vivo</i> para <i>Leishmania braziliensis</i>	79
4.5.3. Ensaio <i>in vivo</i> para <i>Leishmania major</i>	85
5. DISCUSSÃO.....	92
6. CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS.....	107
ANEXO	

Resumo

RESUMO

RODRIGUES, K. C. **Estatinas como coadjuvantes nos tratamentos da doença de Chagas e leishmanioses**. 2013. 128f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

As doenças denominadas como negligenciadas têm causado nos últimos anos uma preocupação muito acentuada na comunidade científica e para as autoridades de saúde, relacionada às suas terapêuticas, no sentido de que os medicamentos existentes não se apresentam totalmente eficazes, além de determinarem efeitos colaterais extremamente elevados. Nesse perfil se encaixam a doença de Chagas e as Leishmanioses, etiologias determinadas respectivamente por *Trypanosoma cruzi* e parasitas do gênero *Leishmania*. Como proposta de encontrarmos uma alternativa para o tratamento dessas parasitoses, avaliamos o potencial terapêutico de três estatinas (sinvastatina, pravastatina e mevastatina), comercialmente encontradas para o tratamento de níveis elevados de colesterol e triglicérides, baseado no princípio de que a rota bioquímica para a formação de colesterol é semelhante à do ergosterol, componente da membrana plasmática desses protozoários. Foram realizadas avaliações *in vitro* e *in vivo* das estatinas puras e de suas associações com o benzonidazol, medicamento de referência no tratamento da doença de Chagas e com a anfotericina B, medicamento de referência no tratamento das leishmanioses, partindo do pressuposto que a substituição do benzonidazol / anfotericina B ou a diminuição de suas doses em combinação com as estatinas, atuando como coadjuvantes, pudessem auxiliar no tratamento e diminuir os efeitos colaterais provocados pela medicação. Observou-se nos ensaios com *T. cruzi in vitro* boa atividade antiparasitária, com valores de porcentagem de lise celular mais altos ou comparados aos encontrados para o benzonidazol, já *in vivo*, apenas a mevastatina apresentou redução da parasitemia em relação ao controle positivo e às outras estatinas testadas. Nos ensaios com *L. braziliensis* e *L. major* não foi observado resultado significativo, tanto *in vitro* como *in vivo*, apesar de em algumas situações encontrarmos resultados próximos ao controle positivo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, estatinas

Abstract

ABSTRACT

RODRIGUES, K. C. **Statins as coadjuvant to treatment of Chagas disease and Leishmaniasis**. 2013. 128f. Thesis (Doctored). Faculty of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Over recent years, neglected diseases has been a problem to the scientific community and health associations due the absence of total efficacy of drugs, and by their potential side effects. Chagas' disease and Leishmaniasis - both caused respectively by *Trypanosoma cruzi* and by parasites the genus *Leishmania* fit on this profile. Aiming to find an alternative treatment of these parasitosis we evaluated the potential therapeutic of three statins (simvastatin, pravastatin, and mevastatin) which are commercially employed for treatment of high levels of cholesterol and triglycerides, based on the similarity of the biochemical route of cholesterol and ergosterol formation, being the ergosterol a component of plasmatic membrane of these protozoa. *In vitro* and *in vivo* evaluation were made by the association of these statins with benznidazole and amphotericin B used for Chagas' disease and Leishmaniasis treatment respectively, hypothesizing that the replacement of benznidazole/amphotericin B or the reduction of the doses in combination with statins as coadjuvants could provide better treatment and side effects reduction caused by the commercial drugs. *In vitro* assays under *T. cruzi* showed significant antiparasitic activity when compared with benznidazole to all statins. On the other hand *in vivo* assays showed parasitic reduction only by mevastatin when it was compared with positive control. *L. braziliensis* and *L. major* in *in vivo* assay didn't show significant results despite the results have been similar to the positive control.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, statins

Resumen

RESUMEN

RODRIGUES, K. C. **Estatinas como coadyuvantes en los tratamientos de la enfermedad de Chagas y leishmaniosis.** 2013. 128f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Las enfermedades llamadas negligenciadas o desatendidas han causado en los últimos años una preocupación muy acentuada en la comunidad científica y para las autoridades de salud, relacionada a sus terapéuticas en el sentido de que los medicamentos existentes no se presentan totalmente eficaces, además de determinaren efectos colaterales extremadamente elevados. En ese perfil se encuentran la enfermedad de Chagas y la leishmaniosis, etiologías determinadas respectivamente por el *Trypanosoma cruzi* y parásitos del género *Leishmania*. Como propuesta de encontrarnos una alternativa para el tratamiento de esas parasitosis, evaluamos el potencial terapéutico de tres estatinas (simvastatina, pravastatina y mevastatina) comercialmente encontradas para el tratamiento de niveles elevados de colesterol y triglicéridos, basado en el principio de que la ruta bioquímica para la formación del colesterol es semejante al del ergosterol, componente de la membrana plasmática de esos protozoarios. Fueron realizadas evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de las estatinas puras y de sus asociaciones con en benzonidazol, medicamento de referencia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y con la anfotericina B, medicamento de referencia en el tratamiento de las leishmaniosis, partiendo del presupuesto que la sustitución del benzonidazol / anfotericina B o la disminución de sus dosis en combinación con las estatinas, actuando como coadyuvantes, pudiesen auxiliar en el tratamiento y disminuir los efectos colaterales provocados por la medicación. Se observó en los ensayos con *T. cruzi in vitro* buena actividad antiparasitario, con valores de porcentaje de lisis celular más altos o comparados a los encontrados para el benzonidazol. Ya en los ensayos *in vivo*, apenas la mevastatina presentó reducción de la parasitemia en relación al control positivo y las demás estatinas testadas. En los ensayos con *L. braziliensis* y *L. major* no se observó resultado significativo *in vitro* o *in vivo*, a pesar de en algunas situaciones existieren resultados próximos al control positivo.

Palabras llave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, estatinas

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2. Estrutura química dos fármacos benzonidazol e nifurtimox utilizados na quimioterapia da doença de Chagas.....	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i> , onde (VL) leishmaniose visceral e (CL) leishmaniose tegumentar.....	11
Figura 4. Estrutura química dos fármacos glucantime, miltefosina e anfotericina B, utilizados no tratamento da leishmaniose.....	15
Figura 5. Estrutura molecular do (a) colesterol e (b) ergosterol. As setas indicam as diferenças estruturais entre as duas moléculas, as quais são essenciais para o crescimento de células de mamíferos (colesterol) e de fungos e tripanosomatídeos (ergosterol e esteróis 24-metil).....	18
Figura 6. Representação esquemática das principais etapas e enzimas envolvidas na via metabólica de biossíntese de colesterol e ergosterol.....	20
Figura 7. Representação da via de biossíntese de colesterol e ergosterol e seus inibidores conhecidos.....	23
Figura 8. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as células da linhagem LLCMK2 em 48 horas.....	47
Figura 9. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as células da linhagem P388D1 em 48 horas.....	48

Figura 10. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), mevastatina (MEV), pravastatina (PRA) e benzonidazol (BNZ) sobre as formas epimastigota de *T. cruzi* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, sendo significativo quando $p < 0,05$. Em **(A)** e **(B)** temos que as três estatinas e o benzonidazol não apresentaram valores significativos de porcentagem de lise celular, quando comparados entre si, com $p > 0,05$ 51

Figura 11. Dose-resposta em função do log das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benzonidazol nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benzonidazol (BZN) sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, sendo significativo quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). 54

Figura 12. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, mevastatina, pravastatina e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* em 24 horas. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunn, sendo significativo quando $p < 0,05$. Para as formas tripomastigotas as três estatinas e o benzonidazol não apresentaram valores significativos quando comparados entre si, com $p > 0,05$ 56

Figura 13. Respostas das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benzonidazol nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benzonidazol (BZN) sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Teste estatístico Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, sendo significativo quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). Apenas as porcentagens de lise da associação da pravastatina em (1), (2) e (3) apresentaram valores estatisticamente significantes..... 58

Figura 14. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), mevastatina (MEV), pravastatina (PRA) e benzonidazol (BZN) sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*. O teste estatístico de Kruskal-Wallis, com avaliação complementar de Dunns, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa para as curvas dose-resposta obtidas ($p>0,05$)..... 60

Figura 15. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benzonidazol, nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benzonidazol (BZN), sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*. A avaliação pelo método estatístico Two-Way ANOVA, com avaliação complementar de Bonferroni mostrou que a MEV+BZN na combinação (2) e (3) apresentaram resultados estatisticamente significantes com $p<0,01^{**}$ e $p<0,0001^{***}$, respectivamente..... 62

Figura 16. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA), mevastatina (MEV) e anfotericina B (ANF) sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, Em **(A)** temos que as três estatinas não apresentaram valores significativos de porcentagem de lise celular, quando comparados com a anfotericina B. Situação semelhante pode ser observada em **(B)**..... 65

Figura 17. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+ANF), mevastatina (MEV+ANF) e pravastatina (PRA+ANF) com a anfotericina B (ANF), nas proporções de (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e anfotericina B pura sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas Teste estatístico Two-Way ANOVA , com teste complementar de Bonferroni, não havendo resultado de avaliação biológica significativa, apesar de resultados próximos ao controle positivo..... 68

Figura 18. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA), mevastatina (MEV) e anfotericina B (ANF) sobre as formas promastigotas de *L. major* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, não sendo encontrados resultados significativos em ambas as situações..... 71

Figura 19. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+ANF), mevastatina (MEV+ANF) e pravastatina (PRA+ANF) com a anfotericina B (ANF), nas proporções de (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e anfotericina B pura sobre as formas promastigotas de *L. major*. Teste estatístico Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, não havendo resultado de avaliação biológica significativa, apesar de resultados próximos ao controle positivo..... 75

Figura 20. Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV) na concentração de 10mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo animais tratados com benzonidazol (BZN) e controle negativo (CN) tratados com solução de DMSO 3,5%..... 77

Figura 21. Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com as associações da sinvastatina (SIN+BZN), pravastatina (PRA+BZN) e mevastatina (MEV+BZN) com o benzonidazol na concentração de 10mg/kg durante 20 dias. Controle positivo animais tratados com benzonidazol (BZN) e controle negativo (NC) tratados com solução de DMSO 3,5%..... 78

Figura 22. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. braziliensis* e submetidos ao tratamento com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%..... 79

Figura 23. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. braziliensis* e submetidos ao tratamento com as associações de sinvastatina (SIN+ANF), pravastatina (PRA+ANF) e mevastatina (MEV+ANF), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%..... 80

Figura 24. Aspecto das lesões iniciais de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias)..... 81

Figura 25. Aspecto das lesões iniciais de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF..... 82

Figura 26. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 20 dias de tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias)..... 83

Figura 27. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 20 dias de tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF..... 84

Figura 28. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. major* e submetidos ao tratamento com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%..... 85

Figura 29. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. major* e submetidos ao tratamento com as associações de sinvastatina (SIN+ANF), pravastatina (PRA+ANF) e mevastatina (MEV+ANF), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%..... 86

Figura 30. Aspecto inicial das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias)..... 87

Figura 31. Aspecto inicial das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF..... 88

Figura 32. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 20 dias de tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias)..... 89

Figura 33: Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 20 dias de tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF..... 90

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade das estatinas sobre células da linhagem LLCMK2 em 48 horas.....	46
Tabela 2. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade das estatinas sobre células da linhagem P388D1 em 48 horas.	48
Tabela 3. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em 24 horas.....	49
Tabela 4. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em 48 horas.....	49
Tabela 5. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol, sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em 24 horas.....	52
Tabela 6. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol, sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em 48 horas.....	52
Tabela 7. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em 24 horas.....	55

Tabela 8. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol puro, sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> na concentração de 128,0 µM.....	57
Tabela 9. Valores de porcentagens de lise celular e IC ₅₀ da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	59
Tabela 10. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol puro, sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	61
Tabela 11. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> em 24 horas.....	63
Tabela 12. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> em 48 horas.....	63
Tabela 13. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> em 24 horas.....	66
Tabela 14. Valores das porcentagens de lise celular e das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> em 48 horas.....	66

Tabela 15. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i> em 24 horas.....	69
Tabela 16. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i> em 48 horas.....	70
Tabela 17. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i> em 24 horas.....	72
Tabela 18. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i> em 48 horas.....	73

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WHO	<i>World Health Organization</i>
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LC	Leishmaniose Cutânea
IBEs	Inibidores da Biossíntese de Esteróis
μM	Micromolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IC ₉₀	Concentração Inibitória de 90%
SINV	Sinvastatina
MEV	Mevastatina
PRA	Pravastatina
BZN	Benzonidazol
ANF	Anfotericina
LLMCK2	Linhagem celular de fibroblastos
P388D1	Linhagem celular de macrófagos
MTT	[3-(4,5 – dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide]
UI	Unidade Internacional
μL	Microlitro
nM	Nanomolar.
DMSO	Dimetilsulfóxido

CPRG	Chlorophenol Red β -D-Galactopyranoside
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Oneway analysis of variance</i>
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
199	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
LIT	Meio de cultura <i>Liver Infusion Triptose</i>
SFB	Soro Bovino Fetal

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas e Leishmaniose

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças de grande importância na saúde pública, porém ainda consideradas doenças negligenciadas por muitas agências de saúde, em conjunto com a dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tuberculose, entre outras (WHO, 2010). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais dessas doenças, principalmente populações que vivem em climas tropicais e subtropicais, o que representa um sexto da população mundial. (TEIXEIRA et al, 2006).

As doenças negligenciadas são frequentemente agrupadas geograficamente e mais de 70% dos países e territórios que relatam a sua presença são de baixa renda ou de economias de renda média inferior. Elas não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países, concentrando-se quase que exclusivamente em populações que vivem em áreas rurais remotas, favelas urbanas ou zonas de conflito do mundo em desenvolvimento (WHO, 2010).

Trypanosoma cruzi (gênero *Trypanosoma*, subgênero *Schizotrypanum*) e o gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da doença de Chagas e leishmanioses, respectivamente. Esses protozoários pertencem à família *Trypanosomatidae* e ordem Kinetoplastida, que possuem características estruturais e bioquímicas semelhantes, incluindo uma mitocôndria única com um discreto DNA

estruturado, o cinetoplasto, o qual confere nome à ordem (BARRETT, CROFT, 2012).

- **Doença de Chagas**

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é uma zoonose (ou uma antropozoonose) descoberta pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909), que permanece até os dias atuais como o único cientista na história da medicina a descrever completamente uma doença infecciosa: o patógeno (*Trypanosoma cruzi*), o vetor (*Triatominae*), os hospedeiros, as manifestações clínicas e a epidemiologia (RASSI, 2012).

Os possíveis casos em humanos vêm de longa data, uma vez que a presença do parasito foi detectada em múmias no norte do Chile e sul do Peru, datadas de aproximadamente 9.000 anos (AFDERHEIDE et al., 2004), o que comprova que o ciclo da doença existe na natureza há milhares de anos. A doença estende-se desde o Texas nos Estados Unidos até aos países do Cone Sul, representando um sério problema de saúde pública com mais de 25 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (MATHERS et al., 2007; MONCAYO, SILVEIRA, 2009; WHO 2010) e 10 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* no mundo, principalmente nos países latino-americanos onde a doença é endêmica (WHO, 2010).

Apesar da doença de Chagas acometer principalmente países do continente americano, o desenvolvimento do ecoturismo (CARRERO-LÉRIDA et al., 2009) e a migração de pessoas infectadas de países endêmicos para não endêmicos fez com

que o parasita se espalhasse pelo mundo, principalmente em países como Austrália, Canadá, Espanha e Estados Unidos (SCHMUNIS, 2007), criando assim novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos. Estima-se que haja 300.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais de 5.500 no Canadá, cerca de 80.000 na Europa e na região do Pacífico Ocidental, 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (COURA, VIÑAS, 2010).

Alterações ambientais, naturais ou não, resultam na dispersão de animais e consequentemente de seus parasitas para novas áreas criando um novo cenário epidemiológico. Este é um fenômeno especialmente importante com parasitas generalistas como é o caso de *T. cruzi* (JANSEN-FRANKEN, 2013). O homem passou a fazer parte do ciclo de transmissão quando invadiu o ecótopo natural, compreendido pelos vetores e seus hospedeiros mamíferos. Assim, os vetores passaram a co-habitar as instalações humanas colonizando os mais variados locais, como buracos ou fendas em paredes, atrás de quadros ou pintura solta. Nota-se maior incidência em casas de condições precárias como as de pau a pique, sapé, madeira ou barro, camas, colchões, depósitos, dentre outros locais, sendo mais frequente nas zonas rurais, entre a população de baixa renda. (RODRÍGUEZ-BONFANTE et al., 2007).

Trypanosoma cruzi é transmitido principalmente por meio de triatomíneos pertencentes à família *Reduviidae*, sendo as principais espécies responsáveis pela contaminação: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomacula*, *Triatoma dimidiata*, entre outras (FURLANETO, 2006; RASSI, 2009).

Os triatomíneos possuem hábitos geralmente noturnos e durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerem as formas tripomastigotas circulantes,

que se multiplicam e sofrem metaciclogênese no tubo digestivo (GARCIA, DVORAK, 1982). No estômago do triatomíneo ocorre a transformação da forma tripomastigota para epimastigota. Uma nova transformação acontece na porção final do intestino, da forma epimastigota para tripomastigota metacíclica, forma infectante e encontrada nas fezes e urina do vetor (Figura 1a) (BRENER, 1973; RASSI et al., 2009).

Os hospedeiros vertebrados (roedores, animais domésticos, homem, dentre outros mamíferos) são contaminados quando os parasitas (formas tripomastigotas metacíclicas) eliminados no momento do repasto sanguíneo do triatomíneo atingem tecidos subcutâneos (BRENER, 1973) e células encontradas na região, principalmente fagócitos mononucleares e fibroblastos. Ao penetrar na célula, a forma tripomastigota transforma-se em amastigota que se reproduz por divisão binária (de SOUZA et al., 2010), sofrendo ao final do ciclo celular alterações morfológicas e transformação desta para a forma tripomastigota. Nesse estágio, ocorre o rompimento da célula e liberação dessas formas na circulação e posterior contaminação de novas células e tecidos distantes (Figura 1b) (BRENER, 1973).

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. **a)** no triatomíneo. **b)** no hospedeiro vertebrado. (Fonte: http://farm3.staticflickr.com/2680/4096363884_e10e6fc28f_z.jpg)

A transfusão sanguínea (DIAS, 1945; PELLEGRINO, 1949; SCHUMUNIS 1999; BERN et al., 2008) e via congênita (SHIKANAI-YASSUDA et al., 1991; TORRICO et al., 2004) são as principais causas em áreas urbanas não endêmicas (RASSI et al., 2010). A transmissão pode ocorrer também pela amamentação (DIAS, AMATO NETO, 2011), transplante de órgãos e transmissão sexual (SHIKANAI-YASSUDA et al., 1991; CHIEFFI, AMATO NETO, 2000; CARLIER et al., 2002; DIAS, AMATO NETO, 2011), secreções (DEANE et al., 1979), acidentes de laboratório (REICHE, JANKEVICIUS, 1997), além da via oral (MEDINA-LOPES, 1998), pela ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com *T. cruzi*. A transmissão oral é normalmente responsável por surtos regionais de infecção aguda em áreas desprovidas de vetores domiciliados (RASSI et al., 2012).

De acordo com as características do quadro clínico do indivíduo, a infecção com *T. cruzi* pode apresentar-se como uma fase aguda ou crônica, sendo a fase aguda geralmente assintomática com a presença de elevados níveis de parasitemia e parasitismo tissular (GOMES et al., 2009), que pode durar cerca de 2 meses. Alguns sintomas são encontrados em pacientes nessa fase como o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã, que consiste em um edema no local de inoculação devido à reação inflamatória existente na porta de entrada do parasita (WHO, 2002; PARKER, SETHI, 2011).

Além desse, outros sintomas podem aparecer na fase aguda da doença, como dor de cabeça, palidez, mialgia, dispneia, edema nos membros inferiores ou face, dor abdominal, tosse, hepatomegalia, erupção cutânea, esplenomegalia, edema generalizado, diarreia, várias linfadenopatias, miocardite (dor no peito, insuficiência cardíaca) e, mais raramente, meningoencefalite (convulsões, paralisia). A morbidade pode ser maior em crianças menores de cinco anos, idosos,

imunocomprometidos ou em casos com uma carga alta de parasitas, como em surtos orais. Na AIDS, a meningoencefalite é a manifestação mais frequente (diagnóstico diferencial com toxoplasmose) (WHO, 2010).

Na fase crônica os parasitas alojam-se em tecidos - alvo, especialmente tecido cardíaco e músculo liso digestivo, com diferentes formas clínicas possíveis: assintomáticos (forma indeterminada), mais frequentes no início da fase crônica e perdurando por toda a vida na maioria dos pacientes; forma cardíaca, que pode acometer até 30% dos pacientes, com distúrbios de condução, arritmia, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo secundário; lesões digestivas (megaesôfago e megacólon) ou formas mistas (cardíaca e digestiva) que acometem até 10% dos pacientes (WHO, 2010).

De acordo com o tipo de cepa e estado imunológico do hospedeiro, as alterações cardíacas e digestivas podem ter consequência fatal como resultado de destruição progressiva dos órgãos afetados, devido à multiplicação do parasita durante a fase aguda (VERA-CRUZ et al., 2003).

Mesmo após a descoberta da doença de Chagas há cem anos, apenas dois fármacos, nifurtimox e benzonidazol (Figura 2), mostraram-se terapeuticamente eficazes para o tratamento da infecção por *T. cruzi* (BOSCARDIN et al., 2010). Ambos são efetivos para o tratamento da fase aguda da infecção chagásica humana, porém apresentam baixo índice de cura na fase crônica da doença. O seu emprego em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias) causam efeitos colaterais indesejáveis e mesmo o nifurtimox que foi amplamente empregado, deixou de ser usado no Brasil e em outros países em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava, estando atualmente fora desses mercados

(COURA, CASTRO, 2002). Além disso, ambos induzem efeitos secundários significativos e resistência em algumas cepas de *T. cruzi* (COURA, DIAS, 2009).

Figura 2. Estrutura química dos fármacos benzonidazol e nifurtimox utilizados na quimioterapia da doença de Chagas.

Apesar de sua baixa eficácia na fase crônica da doença, o tratamento com benzonidazol é sugerido de modo a retardar ou até mesmo evitar a evolução da doença crônica (CALDAS et al., 2008; CASTRO, SOEIRO, 2009). Também na fase crônica os sintomas de cardiopatias e as alterações no sistema digestório são tratados com o uso de antiarrítmicos, implantação de marcapassos e processos cirúrgicos (COURA, CANÇADO, 2009).

Atualmente, embora não tenha todas as condições de um medicamento ideal, o benzonidazol é o único tratamento anti-chagásico comercialmente disponível e utilizado no Brasil (ESTANI, 1998; CANÇADO, 2000). A eficácia e a tolerância do benzonidazol é inversamente proporcional à idade do paciente, embora seus efeitos colaterais sejam mais frequentes em pacientes idosos (VIOTTI et al., 2009).

Em casos de transplantes de órgãos ou em pacientes imunodeprimidos, o benzonidazol e o nifurtimox demonstraram capacidade de conter a exacerbação causada pela reativação da carga parasitária, configurando indicação válida referente ao uso desses medicamentos. Outra indicação refere-se ao atendimento de vítimas de acidentes laboratoriais, que exigem início precoce do tratamento.

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) gerou nos últimos anos mais uma importante preocupação, devido ao grande número de portadores com situação propícia para reativação da infecção parasitária e consequente agravamento da patologia, principalmente a miocardite e acometimento do sistema nervoso central (COURA, CASTRO, 2002; BRITO et al., 2003).

Não existe vacina contra a doença de Chagas até o momento e a melhor maneira de enfrentar a doença ainda se dá por meio da quimioterapia, da prevenção e do controle, através do combate sistemático aos vetores pelo emprego de inseticidas eficazes, eliminação dos animais domésticos infectados, melhoria das habitações e saneamento básico, controle e descarte do sangue contaminado pelo parasita e seus derivados (BRENER et al., 2000).

- **Leishmanioses**

A leishmaniose é uma infecção causada por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania*, datada desde 400 a 900 anos d.C. nas Américas, onde cerâmicas pré-colombianas feitas pelos índios do Peru foram encontradas apresentando mutilações características de lábios e narizes (LAINSON, SHAW, 1988). Posteriormente, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas (SANTOS, COIMBRA, 1994).

O primeiro a observar o parasita do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No Brasil, Cerqueira, em 1855, observou a existência da moléstia da pele (PESSÔA, 1982) e mais tarde a natureza leishmaniótica dessas lesões foi confirmada por Lindenberg (1909) em indivíduos que trabalhavam nas matas do interior de São Paulo (PESSÔA, 1982). Migone, em 1913, descreveu no Brasil o primeiro caso de leishmaniose visceral em um paciente que havia contraído a doença no Mato Grosso. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, várias espécies de *Leishmania* foram descritas (LAINSON, 1997; BRASIL, 2000).

A leishmaniose tem a segunda maior incidência mundial parasitária, logo após a malária (LAINSON, SHAW, 1978; BARRETT, CROFT, 2012). É uma doença causada por no mínimo 23 espécies de *Leishmania* em humanos, ocorrendo em países de clima tropical e subtropical do Velho e Novo Mundo (LAINSON, SHAW, 1978; GRAVELINK, LERNER, 1996; PEARSON et al., 1999; BARRETT, CROFT, 2012), estimando-se cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, principalmente em áreas rurais e carentes, 20 milhões de pessoas infectadas em 88 países e dois milhões de novos casos por ano, com uma incidência de 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 0,5 milhão de casos de leishmaniose visceral por ano (WHO, 2007)

Brasil, Índia, Bangladesh e Sudão são responsáveis por 90% dos casos notificados de leishmaniose visceral. Brasil, Peru e Bolívia respondem por 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa, enquanto que Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia-Saudita e Síria são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose cutânea. As infecções humanas são encontradas também em 16 países da Europa,

incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Sua incidência vem aumentando para cerca de 2 milhões de casos mundiais ao ano (WHO, 2010).

A doença é transmitida pela picada de vetores conhecidos como “flebotomíneos” (Ordem Díptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae) (MAGILL et al., 1993), que constituem um grupo de insetos hematófagos, sendo que apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue. O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas, pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica (REBÊLO, 1999; GIL et al., 2003; CLABORN, 2010).

Pouco se conhece sobre os criadouros, encontrando-se as formas imaturas em fendas de rochas, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, e em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição (REBÊLO, 1999).

A transmissão da doença já foi relatada somente em áreas silvestres e rurais; atualmente é relatada também em centros urbanos. Acredita-se que um dos fatores que possa ter contribuído para tal mudança seja a maior adaptação do flebotomíneo a estas áreas, à medida que o homem invade áreas florestais e ambientes silvestres para desmatamento, construção de estradas, açudes, garimpo, dentre outras atividades, além do contato com áreas onde há presença dos flebotomíneos, tempo de exposição às picadas e do tipo de moradia, fazendo com que este se torne domiciliado (BRYCESON, 1996).

O vetor adquire a infecção quando faz o repasto sanguíneo em indivíduos infectados ou em reservatório animal, ingerindo macrófagos repletos de amastigotas em seu interior. No estômago, estas formas amastigotas são liberadas e

imediatamente se transformam em formas intermediárias, que se apresentam alongadas e com mobilidade, sendo posteriormente transformadas em formas flageladas, denominadas de promastigotas. As formas promastigotas flageladas dividem-se e desenvolvem-se em formas metacíclicas infectantes. Quando o vetor infectado pelo parasita faz novamente o repasto sanguíneo em outro hospedeiro vertebrado, ele perfura a pele com sua probóscida e, junto com a saliva (que contém substâncias com propriedades anticoagulantes e que reduzem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos), introduz as formas promastigotas (MARSELLA, GOPEGUI, 1998). Esses promastigotas por sua vez, invadem populações de macrófagos, transformando-se em formas amastigotas que sobrevivem e multiplicam-se na célula hospedeira (Figura 3) (BARRETT, CROFT, 2012).

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp., onde (VL) leishmaniose visceral e (CL) leishmaniose tegumentar. (Fonte: <http://calazar.zip.net/images/ciclo.png>)

A diversidade de espécies de *Leishmania*, associada à capacidade de resposta imune de cada indivíduo à infecção, relaciona-se com as várias formas de manifestação da leishmaniose. No homem, a doença pode manifestar-se de forma tegumentar, sendo ela cutânea, cutaneo-mucosa ou cutânea difusa; ou de forma visceral, dependendo da espécie e cepa do parasita (CLABORN, 2012).

A leishmaniose cutânea produz exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas; a leishmaniose cutaneo-mucosa, ou mucocutânea, é caracterizada por formas que se complicam frequentemente com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; já a leishmaniose cutânea difusa, apresenta-se por formas cutâneas disseminadas em indivíduos alérgicos ou, tardiamente, em pacientes que foram tratados de calazar (leishmaniose visceral) (BRYCESON, 1975; REY, 1991).

A leishmaniose visceral ou calazar caracteriza-se por formas viscerais, em que o parasito tem afinidade (tropismo) com células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfoides (BRYCESON, 1975; REY, 1991). Pode ocorrer o aparecimento de febre, emagrecimento, anemia, aumento do fígado e do baço e imunodeficiência, podendo levar à morte quando não tratada. Doenças causadas por bactérias, principalmente pneumonias, são as causas mais frequentes de morte nos casos de leishmaniose visceral, especialmente em crianças (MENDONÇA, 2006).

Com o surgimento da AIDS houve o aparecimento de manifestações clínicas atípicas, bem como o surgimento, ou ressurgimento, de uma doença em decorrência de imunossupressão, caracterizando a presença de doenças oportunistas. Dentre elas destacam-se apresentações atípicas de doença de Chagas e de leishmaniose visceral (LV). A associação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV) e pelo protozoário *Leishmania* sp. caracteriza a co-infecção Leishmania-HIV, considerada uma doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Desde o início da década de 1990, um aumento expressivo do número de casos de co-infecção tem sido observado e há projeções de seu crescimento contínuo devido à superposição geográfica das duas infecções, como consequência da urbanização das leishmanioses e da ruralização da infecção pelo HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Esses casos já foram relatados em pelo menos 35 países, com tendências a um aumento de sua área de abrangência (ALVAR et al., 2008; WHO, 2010).

Na Europa, a co-infecção LV-HIV tem sido considerada um problema de saúde pública, chegando a 77% a proporção de indivíduos com LV e infectados pelo HIV (DESJEUX, ALVAR, 2003; CRUZ et al., 2006). Estima-se que 10% dos portadores de HIV apresentem infecção assintomática por *Leishmania* sp. e destes, 2% a 9% dos co-infectados desenvolverão LV (PINTADO, LOPEZ-VELEZ, 2001). No Brasil, em 1987, foi descrito o primeiro caso de co-infecção *Leishmania*-HIV (RABELLO et al, 2003) e tem sido descritas outras séries de casos, porém acredita-se que a sua real incidência possa estar subestimada (RABELLO et al., 2003; CRUZ et al., 2006; CARVALHO et al., 2013). Esta hipótese pode ser amparada nos resultados do trabalho realizado por Orsini et al. (2012) avaliando a infecção assintomática da LV em pacientes portadores do HIV em Minas Gerais, reforçando a necessidade de investigação e acompanhamento de pacientes HIV positivos. As regiões com maior percentual de casos de co-infecção foram o Nordeste e o Sudeste, onde justamente predominam, respectivamente, os casos de LV e HIV (SOUSA-GOMES et al., 2012).

Apesar de muitas pesquisas serem realizadas, a quimioterapia de primeira linha ainda é baseada em antimoniais pentavalentes desenvolvidos há mais de 70 anos, que são tóxicos e propensos à resistência dos parasitas aos fármacos (FRÉZARD, DEMICHELI 2010). No Brasil, o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime® - Sanofi-Aventis) (Figura 4) é o medicamento de primeira linha utilizado no tratamento dos pacientes, sendo distribuído pelo Ministério da Saúde.

O antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime® - Sanofi-Aventis) é tóxico e nem sempre efetivo, sendo contra indicado a alguns grupos de pacientes, tais como pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca e gestantes nos dois primeiros trimestres de gestação, constituindo causas importantes da não adesão dos pacientes ao tratamento (BRASIL, 2006).

Dados recentes indicam que a resistência do parasita ao antimoniato tem se tornado um problema de saúde pública em países como o Sudão e a Índia (BRASIL, 2006; WHO, 2010). Assim, o medicamento considerado como primeira escolha para o tratamento em todo o mundo está longe de ser satisfatório (CROFT et al., 2006), apresentando entre outros efeitos colaterais, a cardiotoxicidade grave e nefrotoxicidade (TEMPONE et al., 2008).

Algumas alternativas terapêuticas, tais como o desoxicolato sódico de anfotericina B (Figura 4) e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) têm sido utilizadas, porém diversos efeitos colaterais, tais como: cefaleia, febre, calafrios, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, também têm sido relatados para este grupo de medicamentos (BRASIL, 2006).

A miltefosina (Figura 4), um fármaco anticancerígeno antigo, tem sido utilizada também na Índia contra leishmaniose visceral (fase clínica IV), porém a

teratogenicidade e a presença de resistência *in vitro* tem sido motivo de preocupações. Além disso, falhas clínicas com outras espécies de *Leishmania* do Novo Mundo têm sido demonstradas (SOTO, BERMAN, 2006).

Figura 4. Estrutura química dos fármacos glucantime, miltefosina e anfotericina B, utilizados no tratamento da leishmaniose.

Não há vacina contra as leishmanioses, assim como ainda não há para quaisquer doenças parasitárias humanas. Portanto, as medidas mais utilizadas para o tratamento e controle da enfermidade se baseiam na quimioterapia e no controle dos vetores e reservatórios.

Pesquisas na área de avaliação e desenvolvimento de fármacos são importantes e têm sido realizadas por diversos grupos de pesquisa, devido à forte necessidade de novos compostos ativos, cujos tratamentos são mais seguros (com toxicidade reduzida), mais baratos e mais eficazes no tratamento das leishmanioses e da doença de Chagas.

1.2. Colesterol e Ergosterol

Os organismos eucarióticos necessitam de esteróis para sua sobrevivência (SCHROEPFER, 1981; BENVENISTE, 1986; SCHALLER, 2003), pois estes servem como precursores de moléculas bioativas, as quais funcionam em níveis hormonais como reguladores do ciclo celular e do desenvolvimento (VANDEN BOSSCHE et al., 1995; ROBERTS et al., 2003; LEPESHEVA et al., 2011).

Na maioria dos fungos, plantas, assim como em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, os esteróis são produzidos apenas endogenamente ou no caso de insetos, alguns fungos e protistas, estes são adquiridos pela dieta. Muitas espécies, incluindo humanos, leveduras e *Trypanosoma brucei* podem utilizar tanto esteróis de origem endógena quanto exógena para fins estruturais, porém os esteróis que são convertidos em moléculas com função regulatória são provenientes apenas de fonte endógena (LEPESHEVA et al., 2010).

O colesterol e o ergosterol são esteróis e componentes estruturais essenciais da membrana plasmática, estabilizando e modulando sua fluidez e permeabilidade, além de modularem a atividade de enzimas ligadas à membrana e canais iônicos (ROBERTS et al., 2003; HAINES, 2001).

Em células de mamíferos, o colesterol é o principal esterol encontrado nas diferentes membranas. No entanto, outros esteróis predominam em microrganismos eucarióticos, como fungos e protozoários. No caso dos tripanosomatídeos, por muitos anos o colesterol foi considerado o principal esterol, devido ao fato de que todas as análises bioquímicas eram realizadas em protozoários cultivados em meios complexos contendo cérebro, coração ou extratos de fígado e no soro de bovinos. Quando a primeira análise bioquímica de tripanosomatídeos inferiores cultivados em

meio quimicamente definido foi realizada, ficou claro que eles sintetizavam ergosterol e não colesterol (FAGUNDES, 1974).

Está bem estabelecido que uma importante via metabólica em fungos e em membros da família *Trypanosomatidae* é a via de biossíntese de esterol. Nesses organismos, esta via produz uma classe especial de esteróis, incluindo o ergosterol e outros esteróis 24-metil, que são necessários para o seu crescimento e viabilidade, estando ausentes nas células hospedeiras de mamíferos (URBINA, 1997; ROBERTS et al., 2003). Enquanto os mamíferos podem acumular colesterol da dieta, o bloqueio da produção de ergosterol em fungos é letal, pois afeta a citocinese, cessa o crescimento celular e, eventualmente, leva a um colapso da membrana da célula (VANDEN BOSSCHE et al., 1995).

Contrariamente a *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos, as células do hospedeiro vertebrado são dependentes de colesterol e não de ergosterol. O colesterol e o ergosterol apresentam diferenças estruturais bem características, diferindo em alguns aspectos menores. O ergosterol possui o carbono 24 (C₂₄) da cadeia lateral metilado, ao contrário do colesterol que não possui substituinte nesta posição. Além disso, o colesterol possui apenas uma insaturação no anel B (C^{5,6}), enquanto que o ergosterol possui duas insaturações no anel B (C^{5,6} e C^{7,8}) e uma insaturação na cadeia lateral (C^{22,23}) (figura 5) (de SOUZA, RODRIGUES, 2009).

Figura 5. Estrutura molecular do (a) colesterol e (b) ergosterol. As setas indicam as diferenças estruturais entre as duas moléculas, as quais são essenciais para o crescimento de células de mamíferos (colesterol) e de fungos e tripanosomatídeos (ergosterol e esteróis 24-metil) (de SOUZA, RODRIGUES, 2009).

Foi demonstrado que algumas partes da molécula de esteróis são importantes para a sua atividade nas membranas celulares. Nos núcleos tetracíclicos, a 3β -OH é obrigatória para o crescimento, enquanto a presença de grupos metila em C14 ou C4 não permitem o crescimento. Estas duas características são essenciais, tanto para o colesterol como para o ergosterol para apoiar o crescimento. No entanto, certas características do ergosterol que estão ausentes na molécula de colesterol, tais como a presença de duas duplas ligações no anel B do núcleo esteroide, a presença de um metil β na posição 24, e da ligação dupla em C22 no lado cadeia, são essenciais para o crescimento de fungos e tripanosomatídeos (HALEVY, AVIVI, 1966; KORN et al., 1969; DIXON et al., 1972).

O ergosterol é um alvo potencial para a pesquisa de quimioterápicos (URBINA, 2009). Trabalhos têm demonstrado que protozoários parasitas da família *Trypanosomatidae*, como *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, agente causador da tripanossomíase americana ou doença de Chagas, e várias espécies de *Leishmania*, são altamente suscetíveis aos inibidores da biossíntese de ergosterol (URBINA, 1997; ROBERTS, 2003; FLORIN-CHRISTENSEN, 1990; WIKHE et al., 2007).

A exploração da via de biossíntese de esterol (Figura 6) é altamente relevante para o tratamento de doenças crônicas como a hipercolesterolemia e doenças infecciosas causadas por fungos e tripanosomatídeos. Pelo menos vinte etapas metabólicas são necessárias para sintetizar esteróis, tais como colesterol e ergosterol, com alguns passos envolvendo enzimas específicas que diferem entre as células de mamíferos e microrganismos, como fungos e tripanosomatídeos (TROCHA, SPRINSON, 1976; PEÑA-DIAZ et al., 2004; CARRERO-LÉRIDA et al., 2009; OLIVIER, KRISANS, 2000).

Algumas dessas enzimas têm sido extensivamente estudadas como alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos que interferem com o crescimento do parasita, sem efeitos graves sobre as células do hospedeiro e também como um meio de reduzir os altos níveis de colesterol endógeno em células de mamíferos. Desse modo, vários medicamentos desenvolvidos para reduzir os níveis de colesterol em humanos ou tratar doenças fúngicas, têm sido testadas com certo sucesso contra tripanosomatídeos (de SOUZA, RODRIGUES, 2009).

Figura 6. Representação esquemática das principais etapas e enzimas envolvidas na via metabólica de biossíntese de colesterol e ergosterol (Adaptado de SOUZA, RODRIGUES, 2009).

1.3. Inibidores da biossíntese de esterol

A maior parte dos esteróis presentes em eucariotos superiores concentra-se na membrana plasmática, enquanto a biossíntese destes ocorre no retículo endoplasmático das células. Em tripanosomatídeos, a produção de esteróis e a presença das enzimas de sua via de biossíntese podem ser encontradas também nas membranas dos glicossomos e das mitocôndrias, sugerindo uma localização múltipla desta via em parasitas (LEPESHEVA et al., 2011).

Apesar de alguns protozoários (*Plasmodium*, por exemplo) não terem uma via de biossíntese de esteróis em seu genoma, o sequenciamento de nove genomas de *Trypanosomatidae* (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum*, *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*) estabeleceu que nestes, todas as enzimas da via estão presentes (LEPESHEVA e WATERMAN, 2011).

Na primeira etapa da biossíntese ocorre a condensação de acetil-CoA e prossegue com vários intermediários até a produção de farnesilpírofosfato, o qual forma esqualeno e, na presença de oxigênio molecular, este é transformado em esqualeno 2,3-epóxido. Contrariamente às plantas e algas onde este último é convertido em cicloartenol, nos animais, fungos e tripanosomatídeos, ele se transforma em lanosterol. Embora a sequência de etapas pós lanosterol na via continue a ser clarificado, a análise da composição de esteróis nos *Trypanosomatidae* indica que a biossíntese de esteróis nestes organismos conduz à formação de múltiplos produtos *ergostane-based*, o principal esterol componente de *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, sendo representado por ergosterol e seus 24 derivados metilados e alquilados (URBINA et al., 1998; URBINA et al., 2003; ROBERTS et al.,

2003; ZHOU et al., 2007; LEPESHEVA et al., 2007; LEPESHEVA, WATERMAN, 2007; LEPESHEVA et al., 2011)

Atividades de inibidores da biossíntese de esteróis (IBEs) e fosfolípidios em parasitas como *Trypanosoma cruzi* e as diferentes espécies de *Leishmania*, têm atividade potente e seletiva como agentes quimioterápicos *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 1997), sendo muito eficazes na depleção do ergosterol endógeno ou no acúmulo de intermediários tóxicos (URBINA et al. 1997; de SOUZA e RODRIGUES, 2009; URBINA, 2009).

Entre os IBEs (Figura 7), existem compostos que atuam em diferentes etapas, sendo que os exemplos mais aparentes incluem inibidores da HMG-CoA redutase, que em humanos serve como alvo clínico para estatinas (PUCCETTI et al., 2007) e também estudados para tratamento experimental da doença de Chagas (URBINA et al., 1993), farnesil-difosfato-sintase, o alvo para os bisfosfonatos (MARTIN et al., 2001; KAVANAGH et al., 2006), de esqualeno-sintase, que é inibida por derivados de quinuclidina (URBINA et al. 2004; CAMMERER et al., 2007), esteróis 24-metil-transferase inibida por azasterois (esta enzima é exclusiva de patógenos humanos e não está presente nos seres humanos - URBINA et al., 1996; MAGARACI et al., 2003; NES et al., 2003; GROS et al., 2006), alilaminas (LAZARDI et al., 1990), oxidosqualeno ciclase (BUCKNER et al., 2001) e de esteróis 14 α -demetilase (PETRIKKOS, SKIADA, 2007; ZONIOS, BENNET, 2008).

Entretanto, os mais promissores e mais estudados foram os derivados azólicos, que estão disponíveis comercialmente ou sendo testados contra outras infecções. Estes compostos além de bloquearem a biossíntese de esteróis, a potência é aumentada pelo acúmulo de esteróis metilados tóxicos que levam à uma parada no crescimento de fungos e a morte celular. Azóis danificam as membranas do parasita, afetam divisão, multiplicação e alteram drasticamente a composição de

esteróis (URBINA 1998; LRAJHI et al., 2002; URBINA et al., 2003; LEPESHEVA et al., 2007).

Figura 7. Representação da via de biossíntese de colesterol e ergosterol e seus inibidores conhecidos.

(Adaptado de <http://www.fiocruz.br/chagas/media/figura%2003%20sol2.jpg>)

Alguns triazóis já foram testados experimentalmente e até mesmo clinicamente para o tratamento da doença de Chagas. Este é o caso do Fluconazol, do Itraconazol (LAURIA-PIRES et al., 1988; MOREIRA et al., 1992) e do Cetoconazol (McCABE, 1988; BRENER et al., 1993), porém não tiveram muito sucesso. Os antifúngicos cetoconazol e fluconazol mostraram ser eficazes *in vivo* para o tratamento da leishmaniose, como apresentados em trabalhos feitos por Weinrauch et al. (1987) e Alrajhi et al. (2002), respectivamente. O posaconazol, aprovado em 2006 pelo FDA como terapia de resgate para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas em pacientes imunocomprometidos, apresentou um efeito curativo nas formas aguda e crônica da doença de Chagas (NAGAPPAN, DERESINSKI, 2007; URBINA, DOCAMPO, 2003; URBINA, 2010).

Urbina et al. (2003a) analisaram a atividade de outro derivado triazólico, o Ravuconazol (Bristol-Myers Squibb, Estados Unidos) desenvolvido como um anti-micótico sistêmico. A eficácia do fármaco foi verificada em ensaios *in vitro* e *in vivo* na doença de Chagas murina, com 70% de cura na fase aguda. Todavia, durante a fase crônica, este fármaco não demonstrou atividade anti-parasitária. A TAK-187 (Takeda Chemical Industries, Japão), como os outros derivados azólicos descritos anteriormente, apresentou propriedades farmacocinéticas importantes, como longa meia-vida e grande volume de distribuição no organismo. Além disso, a cura foi possível em 60-100% dos casos de infecção em camundongos, inclusive com cepas resistentes ao benzonidazol, durante as fases aguda (infecções com as cepas CL, Y e Colombiana) e crônica (infecção com a cepa Bertoldo), com 100% de sobrevivência dos animais (URBINA et al., 2003b).

Uma nova geração de derivados azólicos foram desenvolvidos, os bis-triazóis. Eles tem demonstrado grande eficácia e atividade contra *T. cruzi*, agindo

sobre os alvos específicos do metabolismo de ergosterol, principalmente sobre a enzima C14 α -demetilase, impedindo a formação de zimosterol a partir do lanosterol e assim, impedindo a formação do ergosterol (URBINA, 1997). Buckner et al. (2003) demonstraram que o gene da enzima C14 α demetilase é expresso no parasito tanto nos estágios do ciclo de vida no mamífero, quanto no inseto, sendo potencialmente um alvo metabólico muito importante.

Molina et al. (2001) relataram a atividade *in vivo* de D0870 (Zeneca Pharmaceuticals, Reino Unido), inibidor da C-14 alfa-demetilase com ampla atividade anti-micótica, o qual demonstrou excelente ação contra uma variedade de cepas de *T. cruzi*. Em experimentos *in vitro* atuou sobre as formas amastigotas e *in vivo* alcançou uma taxa de cura de 70-100% em camundongos infectados com sete diferentes cepas de *T. cruzi*, incluindo cepas resistentes ao benzoniazol. Na fase crônica, os resultados também foram satisfatórios, com a cura de 30-45% dos animais; ao mesmo tempo não foi constatada eficácia do benzonidazol nessa fase.

Espécies de *Leishmania* têm susceptibilidades diferentes aos inibidores da biossíntese de esteróis, tanto *in vitro* como *in vivo*. Promastigotas de *Leishmania braziliensis*, naturalmente resistentes aos inibidores de C-14 alfa-demetilase, tais como o cetoconazol e D0870, foram sensíveis a estes fármacos, quando utilizado em combinação com a terbinafina, inibidor da esqualeno epoxidase (RANGEL et al., 1997).

Além disso, alquilfosfolipídeos como ilmofosina, miltefosina e edelfosina demonstraram impedir a proliferação de *T. cruzi* e *Leishmania* e alterar a composição dos fosfolipídios e dos esteróis (AZZOUZ et al., 2005; BRAGA et al., 2005; SANTA-RITA et al, 2000; SANTA-RITA et al., 2004; SANTA-RITA et al., 2006).

1.4. Estatinas

Estatinas, os medicamentos atuais mais prescritos, são utilizadas para reduzir os níveis de colesterol humano. Elas são uma das principais classes dos inibidores da biossíntese de esteróis, inibindo a enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutarilCoA) redutase, que catalisa a sua conversão em mevalonato (WIKHE et al., 2007).

As estatinas também podem diferir na capacidade de interagir com outros medicamentos que utilizam a mesma via de metabolização. Recentemente, muitos efeitos pleiotrópicos têm sido relatados, bem como propriedades anti-inflamatórias, melhora na função endotelial e benefícios na hemostasia (FONSECA, 2005).

Muitas pesquisas têm sido realizadas e os resultados indicam o potencial dos inibidores da biossíntese de lipídios como agentes terapêuticos úteis no tratamento de doenças causadas por fungos e protozoários, assim como leishmaniose e doença de Chagas, entre outras (URBINA, 1997).

Florin-Christensen et al. (1990) estudaram os efeitos da lovastatina em culturas de epimasgotas de *Trypanosoma cruzi*. Ela inibiu o crescimento do parasita em uma faixa de concentração entre 10 e 30 mg/mL; estes efeitos são revertidos por 100 µM de esqualeno, mas não por 100 µM de colesterol. Aos 50 µg/mL, ela mata a maioria dos parasitas. Estas concentrações estão abaixo dos níveis tóxicos relatados para mamíferos, sendo assim, esta substância e seus análogos deveriam ser testados como agentes quimioterápicos contra a doença de Chagas.

O efeito antiproliferativo da mevinolina (lovastatina) foi avaliado por Urbina et al. (1993). Estes estudaram o efeito da estatina sobre o protozoário *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e sua capacidade de potencializar a ação de inibidores

específicos da biossíntese de ergosterol (IBEs), tais como o cetoconazol e a terbinafina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados mostraram a ação sinérgica desses IBEs combinados, que atuam em diferentes pontos da via sobre a fase proliferativa de *T. cruzi*. Desse modo, sugere-se que a mevinolina combinada com azóis, como o cetoconazol, possam também ser utilizados no tratamento da doença de Chagas humana.

Macreadie et al. (2006) estudaram os efeitos das duas principais estatinas, a sinvastatina e a atorvastatina, em cinco espécies de *Candida* e *Aspergillus fumigatus*. As estatinas inibiram fortemente o crescimento de todas as espécies, exceto *Candida krusei*. A suplementação de *Candida albicans* e *A. fumigatus* com ergosterol ou colesterol em cultura aeróbia, levou à recuperação substancial da inibição pelas estatinas, sugerindo especificidade das estatinas para a via de síntese do mevalonato. Os resultados sugeriram então, que as estatinas podem ter utilidade como agentes antifúngicos e que a colonização de fungos poderia ser afetada pela terapia de estatina.

Em trabalho realizado por Parquet et al. (2009) a exposição à atorvastatina (AVA) resultou na redução *in vitro* de 22 cepas de *Plasmodium falciparum*, com a concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC₅₀) variando de 2,5 a 10,8 µM. Uma correlação positiva e significativa foi encontrada entre as respostas das cepas à AVA e à mefloquina e nenhuma correlação foi encontrada entre as respostas à AVA e à cloroquina, quinina, monodesetilamodiaquina, lumefantrina, dihidroartemisinina, atovaquona, ou doxiciclina. Estes dados poderiam sugerir que o mecanismo da absorção de AVA e / ou o modo de ação da AVA é diferente das dos outros antimaláricos. A ausência de resistência cruzada *in vitro* entre AVA e cloroquina, quinina, mefloquina, monodesetilamodiaquina, lumefantrina, dihidroartemisinina,

atovaquona e doxiciclina indica que esses medicamentos antimaláricos poderiam ser unidos ao AVA como um tratamento para a malária. Em conclusão, as observações sugerem que a AVA é um bom candidato para estudos sobre o uso das estatinas em associação com fármacos que têm atividades contra o parasita da malária.

A atorvastatina (AVA) foi utilizada também por Souraud et al. (2012) em ensaios com *Plasmodium falciparum* para tratamento de malária cerebral, doença que resulta em sequelas neurológicas a longo prazo e o tratamento é apenas parcialmente eficaz. A estatina mostrou atividade antimalárica *in vitro* e melhorou a atividade da mefloquina e quinina quando combinadas. AVA sozinha no esquema terapêutico não mostrou efeito sobre a sobrevivência dos camundongos, porém a terapia de combinação com a mefloquina levou a um atraso significativo na mortalidade dos animais, diferenças na incidência, tempo para a malária cerebral e nível de parasitemia.

A pravastatina tem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que podem regular os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasita. Em trabalho realizado por Kückelhaus et al. (2011) foi avaliada a influência de um tratamento prolongado com essa estatina sobre a sobrevivência de animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BALB/c, camundongos C57BL6 e hamsters Syrian), incluindo a medição semanal das lesões cutâneas (espessura da pata) e do peso. Os resultados apontaram diferenças entre os grupos tratados, porém mostraram efeitos benéficos da estatina testada sobre a evolução da doença em modelo murino de leishmaniose.

Martín-Navarro et al. (2013) avaliaram a eficácia de cinco diferentes estatinas (simvastatina, pravastatina, atorvastatina, lovastatina e fluvastatina) contra *Acanthamoeba castellanii* Neff em três casos clínicos isolados de infecção

determinada pelo uso de lentes de contato. De acordo com os resultados das atividades amebicidas das estatinas testadas, observou-se que as mais ativas foram a simvastatina, fluvastatina e atorvastatina (a mais ativa delas). Com a cepa *A. castellani* Neff, a pravastatina foi a menos ativa, entretanto a lovastatina também exibiu um nível baixo de atividade contra as cepas clínicas. Devido aos níveis alto a moderado de citotoxicidade encontrados para a sinvastina no IC₉₀, o uso desta estatina pode não ser adequado para um futuro tratamento, ficando então a atorvastatina e a fluvastatina mais adequadas para tal finalidade. O estudo concluiu então, que o uso de estatinas é uma nova opção de tratamento poderoso contra espécies de *Acanthamoeba* em doenças humanas.

Os estudos das estatinas sobre fungos e protozoários, como apresentados anteriormente, têm demonstrado que essa classe de substâncias tem um elevado potencial em termos de ação lítica de suas membranas, uma vez que atuam também de maneira significativa sobre a biossíntese do ergosterol. Entretanto pouco tem sido relatado sobre a forma com que esses medicamentos atuam em modelos *in vivo*, utilizando-se a indução da doença promovida pelo patógeno.

Isso ocorre principalmente com os membros da família *Trypanosomatidae*, responsáveis por doenças de grande gravidade que atingem as populações do Continente Americano. Além disso, a associação desses fármacos com os medicamentos de referência para o tratamento da doença de Chagas e leishmanioses nunca foi avaliada, o que é interessante, pelo fato de essa associação poder promover uma melhora em relação à terapêutica, com possibilidade de redução da dosagem dos medicamentos utilizados para o tratamento e, conseqüentemente os seus efeitos colaterais, os quais são muito elevados e responsáveis, na maioria das vezes, pelo abandono do tratamento pelos usuários.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação das estatinas e suas associações aos medicamentos de referência sobre os agentes etiológicos da doença de Chagas e das leishmanioses tegumentares, tanto em modelos *in vitro* como em modelos *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito das estatinas mevastatina, pravastatina e sinvastatina, além de suas associações com os medicamentos de referência, sobre o desenvolvimento das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* e das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais *in vitro*;

2.2.2. Avaliar os efeitos das estatinas anteriormente indicadas e suas associações com os medicamentos de referência em modelos experimentais de estudos *in vivo*, infectados com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*;

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Proposta de substâncias a serem testadas

As substâncias propostas para a realização dos ensaios foram a sinvastatina (SINV), mevastatina (MEV) e pravastatina (PRA), obtidas da empresa Sigma® (Sigma, USA).

a) Sinvastatina

b) Mevastatina

c) Pravastatina

3.2. Espécies e linhagens a serem utilizadas

No presente trabalho foi utilizado o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, que contém o gene da β -galactosidase e confere alta especificidade e sensibilidade aos ensaios farmacológicos (BUCKNER et al., 1996), além de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*.

3.3. Manutenção do cultivo celular

As células utilizadas para avaliação da citotoxicidade das estatinas foram da linhagem LLMCK2 (fibroblastos) e P388D1 (macrófagos), cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 μ g/mL) e ciprofloxacina (10 μ g/mL). Os cultivos foram mantidos a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ e o meio renovado a cada três dias, assim como parte das células removidas uma vez por semana.

3.4. Avaliação da citotoxicidade das substâncias

A ação citotóxica das substâncias foi avaliada em 48 horas pelo método de MTT, o qual é utilizado para avaliar *in vitro* a atividade metabólica ou viabilidade de células em cultura. O método é baseado na redução do MTT [3-(4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide] a formazam (SIEUWERTS et al., 1995). Em microplacas de 96 poços, tanto células da linhagem LLMCK2 (5×10^5 células/poço), como P388D1 foram cultivadas com meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), 25 UI/mL de penicilina, 25 µg/mL de estreptomicina e 10 µg/mL de ciprofloxacina. As substâncias foram adicionadas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM e a placa incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 48 horas, as células foram incubadas com 10 µL de MTT (5 mg/mL) por 4 horas e então adicionados 90 µL de isopropanol ácido (0,1N). A placa foi mantida a temperatura ambiente até que os cristais formados fossem dissolvidos e a leitura realizada em espectrofotômetro (SUNRISE, Tecan) a 570 nm.

Como controle positivo utilizamos 10 µL de Triton X-100 20% e como controle negativo solução fisiológica com 1,0% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo os ensaios realizados em triplicata.

A citotoxicidade foi determinada pela fórmula:

% citotocixidade = $1 - [(Y - N) / (N - P)] \times 100$, onde:

Y= leitura da densidade óptica dos poços com células e diferentes concentrações das substâncias;

N= leitura da densidade óptica dos poços com células;

P= leitura da densidade óptica dos poços com células e Triton X-100.

A dose citotóxica para 50% das células (IC₅₀) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

3.5. Ensaios biológicos *in vitro*

3.5.1. Sobre as formas promastigotas de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*.

Os parasitas foram cultivados a 22 °C, em meio 199 (Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina. Formas promastigotas (1x10⁷/mL), obtidas do cultivo em fase logarítmica de crescimento foram colocadas em microplacas de 96 poços a 22° C e as concentrações (0,5, 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM) das substâncias adicionadas, sendo as amostras avaliadas em 24 e 48 horas. Após cada período, a avaliação da atividade foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação do MTT (TEIXEIRA et al., 2006).

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$\%AE = [(AE - AEB) / (AC - ACB)] \times 100$, onde:

AE = absorvância dos poços tratados;

AEB = absorvância dos poços contendo meio e substancia;

AC = absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB = absorvância dos poços contendo meio de cultura.

Como controles foram utilizados apenas meio de cultura sem parasitas (controle positivo) e meio de cultura com parasitas e DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias (controle negativo).

3.5.2. Sobre as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*.

Em microplacas de 96 poços foram cultivados macrófagos da linhagem P388D1 (5×10^5 células/poço) em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 µg/mL) e ciprofloxacina (10 µg/mL), por 24 horas a 37°C, em ambiente a 5% de CO₂ e umidade de 95%. Formas promastigotas obtidas do cultivo axênico foram adicionadas na proporção de 10:1 e incubadas por mais 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com meio de cultivo não suplementado por três vezes para retirada dos parasitas que não penetraram nas células e as substâncias em análise adicionadas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM. Após 72 horas, foi retirado o sobrenadante e adicionados 50 µL de tripsina (0,25%) e 50 µL de RPMI 1640 (Sigma) para deslocamento das células, aderidas à placa de cultivo.

Uma amostra de 15 µL de cada poço foi transferida para tubo tipo eppendorf, adicionados 15 µL de corante de ácido nucleico verde fluorescente (SYTO® 9 green - Life Technologies™) e a porcentagem de amastigotas contidos nas células foi estimada determinada por leitura realizada em citômetro de baseado em imagem (Tali®, (Life Technologies™)).

Como controles foram utilizados meio de cultura sem parasitas (controle positivo) e meio de cultura com parasitas e DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias (controle negativo).

3.5.3. Sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Primeiramente, formas epimastigotas da cepa CL Brener foram cultivadas a 28 °C em meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina. As formas epimastigotas (1×10^7 /mL), obtidas do cultivo em fase estacionária foram cultivadas em placas de 96 poços a 28° C com as concentrações das substâncias (0,5, 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM) por 24 e 48 horas. Após este período, 50 µl de solução de CPRG (*chlorophenol red β-D-galactopyranoside*, 400µM em 0.3 % Triton X-100, pH 7.4) foi adicionada e a placa incubada a 37° C por 6h. A absorbância foi lida em 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE), de acordo com a fórmula:

$\%AE = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100$, onde:

AE = absorvância dos poços tratados;

AEB= absorvância dos poços contendo meio e substância;

AC=absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB= absorvância dos poços contendo meio de cultura.

Como controles foram utilizados apenas meio de cultura sem parasitas (controle positivo) e meio de cultura com parasitas e DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias (controle negativo).

3.5.4. Sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi* e o sangue coletado durante o pico parasitêmico, após 13 dias da infecção (pico parasitêmico). As formas tripomastigotas sanguíneas na concentração de 1×10^7 /mL foram adicionadas à microplaca de 96 poços, com as cinco concentrações das estatinas e do benzonidazol (0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μ M) e mantidas a 4°C por 24 horas. Após esse período, a avaliação da atividade foi realizada por contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

3.5.5. Sobre as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Buckner et al. (1996). Em placas de 96 poços, células da linhagem LLCMK2 foram cultivadas (1×10^5 células/mL). Formas tripomastigotas da cepa CL Brener foram adicionadas na proporção de 10:1 e incubadas por 24h, a 37°C, em ambiente de 5% de CO₂. Após 12 horas, os poços foram lavados com meio RPMI-1640 não suplementado para remoção das formas tripomastigotas extracelulares e as substâncias em análise adicionadas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μ M. As placas foram incubadas por 96 horas a 37°C. Após este período, 50 μ L da solução de Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (400 μ M em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) (CPRG; Roche, Indianapolis, Ind.) foi adicionada e a placa incubada por 6h a 37°C. A reação colorimétrica foi quantificada a 570 nm (OD) e os resultados expressos em porcentagem de atividade (AA%) como descrito para as metodologias anteriores.

Para os controles foram utilizados o benzonidazol, nas mesmas concentrações das substâncias avaliadas (controle positivo), e o DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias na mesma proporção (controle negativo).

3.5.6. Associação entre as estatinas e os medicamentos de referência benzonidazol e anfotericina B.

Os ensaios foram realizados de acordo com as metodologias já descritas para as diferentes formas e espécies dos parasitas, porém as estatinas foram associadas ao medicamento de referência. A anfotericina B foi utilizada nos ensaios com *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* e o benzonidazol nos ensaios com *Trypanosoma cruzi*. As concentrações finais das associações entre os medicamentos e as estatinas em estudo foram 128 μM , calculados da seguinte forma:

- (1) 50% da concentração do medicamento de referência (64 μM) e 50% da concentração de cada estatina (64 μM);
- (2) 25% da concentração do medicamento de referência (32 μM) e 75% da concentração de cada estatina (96 μM);
- (3) 12,5% da concentração do medicamento de referência (16 μM) e 87,5% da concentração de cada estatina (112 μM).

3.6. Ensaios biológicos *in vivo*

3.6.1. Sobre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*

Os ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos *Mus musculus* albinos, machos, linhagem BALB/c, pesando de 20 a 23g cada. Estes animais foram infectados experimentalmente com aproximadamente 2×10^6 formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*, inoculadas subcutaneamente na base da cauda. O tratamento com as substâncias propostas iniciou-se após a ocorrência do período pré-patente da doença, com a duração de 20 dias.

Os animais foram divididos em grupos, seguindo o seguinte protocolo:

- **grupo I (grupo controle negativo)** - 5 animais infectados em tratamento;
- **grupo II (grupo controle positivo)** - 5 animais tratados com anfotericina B pela via intraperitoneal;
- **grupo III** - 5 animais tratados pela via intraperitoneal com solução de DMSO a 0,1% em solução fisiológica (solvente utilizado para dissolução das substâncias);
- **grupo IV** - 5 animais tratados com sinvastatina por via intraperitoneal;
- **grupo V** - 5 animais tratados com mevastatina por via intraperitoneal;
- **grupo VI** - 5 animais tratados com pravastatina por via intraperitoneal;
- **grupo VII** - 5 animais tratados com a associação da sinvastatina com anfotericina B;
- **grupo VIII** - 5 animais tratados com a associação da mevastatina com anfotericina B;

- **grupo IX** - 5 animais tratados com a associação da pravastatina com anfotericina B;

Foram utilizadas como doses de tratamento para as estatinas a concentração de 10mg/kg por dia para cada animal. A anfotericina B foi utilizada também na mesma concentração das estatinas para que os resultados pudessem ser comparativos. Nos grupos de associação das estatinas com a anfotericina B foi utilizada a mesma concentração final, porém com 50% de anfotericina B e 50% de estatina.

A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com a variação dos diâmetros das lesões, medidas com ajuda de um paquímetro digital (Mitutoyo, Kawasaki, Japan), em intervalos de 02 dias, até o final do período de tratamento.

3.6.2. Sobre *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios *in vivo* com *T. cruzi* foram realizados em camundongos *Mus musculus* albinos, machos, linhagem Balb/C, pesando de 20 a 23g cada. Estes animais foram infectados experimentalmente com aproximadamente 2×10^4 parasitas, inoculados intraperitonealmente. O tratamento com as substâncias propostas iniciou-se após 48 horas, com a duração de 20 dias. Para o presente experimento foram delineados os seguintes grupos experimentais:

- **grupo I (controle negativo)** - 5 animais infectados sem tratamento;
- **grupo II (controle positivo)** - 5 animais tratados com benzonidazol pela via intraperitoneal;

- **grupo III** - 5 animais tratados pela via intraperitoneal com solução de DMSO a 0,1% em solução fisiológica (solvente utilizado para dissolução das substâncias);
- **grupo IV** - 5 animais tratados com sinvastatina por via intraperitoneal;
- **grupo V** - 5 animais tratados com mevastatina por via intraperitoneal;
- **grupo VI** - 5 animais tratados com pravastatina por via intraperitoneal;
- **grupo VII** - 5 animais tratados com a associação da sinvastatina com benzonidazol;
- **grupo VIII** - 5 animais tratados com a associação da mevastatina com benzonidazol;
- **grupo IX** - 5 animais tratados com a associação da pravastatina com benzonidazol;

Da mesma forma que para o tratamento das leishmanioses, foram utilizadas doses de 10mg/kg por dia para cada animal. O benzonidazol foi utilizado também na mesma concentração. Nos grupos de associação das estatinas com o benzonidazol foi utilizada a mesma concentração final, porém com 50% de benzonidazol e 50% de estatina.

A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com o tempo de sobrevivência e parasitemia dos animais tratados, sendo esta realizada em intervalos de 02 dias, até o final do tratamento.

3.7. Análise estatística

Para análise estatística dos resultados deste trabalho, assim como para os diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos, foi utilizado o programa

GraphPad Prism, 4.02. O método de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunn foi utilizado nos ensaios de citotoxicidade e sobre as formas dos parasitos. Nos ensaios de associação da estatina ao medicamento de referência foi utilizado o método Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni. Para os ensaios *in vivo* também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e teste complementar de Dunns.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade das substâncias

De acordo com a análise dos valores de absorbância encontrados, foram plotados os gráficos de porcentagem de lise celular em função do log das concentrações das estatinas e então obtidos os valores de IC₅₀. Os valores de IC₅₀ indicam a concentração da substância analisada que induz 50% de lise ou morte celular, dessa forma, quanto maior o valor de IC₅₀ menor a sua atividade.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com leitura efetuada em 48 horas. Para a linhagem celular LLCMK2, as porcentagens de lise apresentadas para pravastatina e mevastatina foram baixas ou iguais a zero, com valores de IC₅₀ de 340,3 µM e 351,0 µM, respectivamente. Para a sinvastatina, a porcentagem de lise celular mais alta foi de aproximadamente 35% na concentração de 128,0 µM e o IC₅₀ de 338,9 µM, como mostrados na Tabela 1 e Figura 8.

Tabela 1. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade das estatinas sobre células da linhagem LLCMK2 em 48 horas.

	% de lise ± SD X concentração (µM)					IC ₅₀
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0	µM
Sinvastatina	0,5±0,7	4,6±0,4	12,2±2,5	8,7±7,9	35,0±6,5	338,9
Pravastatina	1,1±1,5	2,3±3,2	0,8±1,1	0,1±0,01	6,5±3,6	340,3
Mevastatina	0,0±0,0	1,3±1,8	1,1±0,7	0,1±0,01	4,5±3,6	351,0

Figura 8. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as células da linhagem LLCMK2 em 48 horas.

A pravastatina e a mevastatina, portanto, não demonstraram atividade citotóxica sobre as células da linhagem LLCMK2 e a sinvastatina, apesar de apresentar valor mais alto de lise celular na concentração de 128,0 µM, não se apresentou citotóxica.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a linhagem celular P388D1. As porcentagens de lise celular obtidas para sinvastatina, pravastatina e mevastatina foram baixas para as concentrações testadas, sendo os valores mais altos na concentração de 128,0 µM. Nessa concentração a sinvastatina apresentou porcentagem de lise de 15% e valor de IC_{50} de $8,7 \times 10^4$ µM, a pravastatina de 16% e IC_{50} não calculado e a mevastatina de 15% e IC_{50} de $3,4 \times 10^4$ µM.

Tabela 2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade das estatinas sobre células da linhagem P388D1 em 48 horas.

Substâncias	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)					IC ₅₀
	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0	μ M
Sinvastatina	3,3 $\pm$ 1,6	10,2 $\pm$ 2,5	3,0 $\pm$ 3,8	9,9 $\pm$ 0,9	15,8 $\pm$ 0,7	87147
Pravastatina	10,9 $\pm$ 2,4	4,9 $\pm$ 1,3	9,1 $\pm$ 1,5	11,0 $\pm$ 2,6	16,7 $\pm$ 0,7	0,0
Mevastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	12,5 $\pm$ 2,5	13,1 $\pm$ 3,1	12,5 $\pm$ 1,0	33969

A Figura 9 apresenta as curvas dose-resposta em função do log das concentrações das estatinas sobre as células da linhagem P388D1.

Figura 9. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as células da linhagem P388D1 em 48 horas.

4.2. Ensaios biológicos *in vitro* sobre *Trypanosoma cruzi*

4.2.1. Sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*

As porcentagens de lise celular das estatinas em estudo e do benzonidazol sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* são apresentadas nas Tabelas 3 (24 horas) e 4 (48 horas).

Tabela 3. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em 24 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	4,1 $\pm$ 1,4	7,2 $\pm$ 4,9	8,8 $\pm$ 2,8	20,5 $\pm$ 0,7	68,2 $\pm$ 2,7
Pravastatina	3,1 $\pm$ 2,1	8,3 $\pm$ 1,4	7,0 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 0,3	12,8 $\pm$ 0,4
Mevastatina	5,2 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 2,1	10,1 $\pm$ 0,6	13,14 $\pm$ 3,5	69,0 $\pm$ 1,2
Benzonidazol	6,2 $\pm$ 1,4	8,4 $\pm$ 2,6	8,8 $\pm$ 4,2	41,8 $\pm$ 1,1	47,6 $\pm$ 0,7

Tabela 4. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em 48 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	6,1 $\pm$ 2,8	4,8 $\pm$ 2,8	9,3 $\pm$ 2,8	13,6 $\pm$ 2,1	87,9 $\pm$ 3,5
Pravastatina	13,5 $\pm$ 3,5	7,2 $\pm$ 1,4	7,1 $\pm$ 2,1	12,8 $\pm$ 0,7	22,2 $\pm$ 1,4
Mevastatina	2,7 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 1,4	5,7 $\pm$ 1,4	7,3 $\pm$ 0,7	87,5 $\pm$ 2,1
Benzonidazol	6,2 $\pm$ 0,7	7,6 $\pm$ 2,1	20,2 $\pm$ 1,4	66,8 $\pm$ 1,4	80,6 $\pm$ 3,2

Em 24 horas, a pravastatina apresentou porcentagens de lise celular baixas em todas as concentrações, com 12% na concentração de 128,0 μM . A sinvastatina e a mevastatina apresentaram comportamentos semelhantes, com porcentagens de lise baixas nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0 e 32,0 μM . Na concentração de 128,0 μM , os valores foram de 68% para a sinvastatina ($\text{IC}_{50}=76,28 \mu\text{M}$) e 69% para a mevastatina ($\text{IC}_{50}=83,23 \mu\text{M}$). O benzonidazol, utilizado como controle positivo, apresentou porcentagens de lise baixas para as concentrações de 0,5; 2,0 e 8,0 μM , aproximadamente 41% para a concentração de 32,0 μM e 47% para a concentração de 128,0 μM ($\text{IC}_{50}=115,4 \mu\text{M}$).

A comparação entre as curvas dose-resposta das três estatinas e o benzonidazol não demonstrou valores estatisticamente significantes quando comparados entre si ($p>0,05$). Levando-se em consideração apenas a concentração de 128,0 μM , tanto a mevastatina como a sinvastatina apresentaram valores de lise superiores ao benzonidazol, com nível de significância para $p<0,0001$, mostrados na Figura 10 (A).

A pravastatina mostrou-se inativa sobre a forma epimastigota do parasita (IC_{50} de $1,3 \times 10^5 \mu\text{M}$) para o tempo de 48 horas, sendo que a sinvastatina e a mevastatina apresentaram, para a concentração de 128,0 μM , 87% de lise parasitária ($\text{IC}_{50}=62,16 \mu\text{M}$ e $70,01 \mu\text{M}$, respectivamente). O benzonidazol apresentou aproximadamente 80% de lise na concentração de 128,0 μM e valor de IC_{50} de 21,86 μM .

Resumidamente, para o tempo de 48 horas a sinvastatina e a mevastatina apresentaram porcentagens de lise celular maiores que o benzonidazol. Entretanto, como observado na Figura 10 (B) não houve diferenças estatisticamente

significantes entre o comportamento das estatinas em relação ao benzonidazol ($p > 0,05$).

Figura 10. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), mevastatina (MEV), pravastatina (PRA) e benzonidazol (BNZ) sobre as formas epimastigota de *T. cruzi* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, sendo significativo quando $p < 0,05$. Em **(A)** e **(B)** temos que as três estatinas e o benzonidazol não apresentaram valores significativos de porcentagem de lise celular, quando comparados entre si, com $p > 0,05$.

4.2.2. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de associação da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol foram realizados nas proporções (m/m) (1) 50:50; (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol, sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em 24 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)			
Substâncias	50 : 50	75 : 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	73,8 $\pm$ 2,1	77,6 $\pm$ 7,0	77,6 $\pm$ 1,4	-
Pravastatina	55,5 $\pm$ 4,1	43,7 $\pm$ 1,0	36,0 $\pm$ 0,03	-
Mevastatina	75,4 $\pm$ 0,7	74,4 $\pm$ 3,2	73,7 $\pm$ 0,5	-
Benzonidazol	-	-	-	47,1 $\pm$ 1,6

Tabela 6. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol, sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em 48 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ g/mL)			
Substâncias	50 : 50	75: 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	82,7 $\pm$ 1,2	87,9 $\pm$ 1,3	89,5 $\pm$ 2,1	-
Pravastatina	77,6 $\pm$ 0,7	71,4 $\pm$ 0,6	50,4 $\pm$ 2,7	-
Mevastatina	79,1 $\pm$ 1,4	82,6 $\pm$ 0,7	86,8 $\pm$ 0,5	-
Benzonidazol	-	-	-	80,7 $\pm$ 0,5

Os valores obtidos para o tempo de 24 horas demonstraram que a associação da sinvastatina com o benzonidazol proporcionou porcentagens de lise celular de aproximadamente 73% na associação (1) e 77% nas associações (2) e (3). As associações da pravastatina apresentaram porcentagens de lise celular de 55% em (1), 43% em (2) e 36% em (3). As associações da mevastatina apresentaram porcentagens de lise semelhantes às encontradas para a sinvastatina, sendo elas de 75% em (1), 74% em (2) e 73% em (3). O valor de porcentagem de lise do benzonidazol referente à concentração de 128,0 μ M foi de 47,0%.

Os resultados obtidos em 48 horas demonstraram que a associação do benzonidazol com a sinvastatina apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 82% na associação (1), 87% em (2) e 89% em (3). A pravastatina apresentou porcentagens de lise celular de 77% em (1), 71% em (2) e 50% em (3) e valor de IC_{50} de 124,4. A mevastatina apresentou porcentagens de lise de 79% em (1), 82% em (2) e 86% em (3). O valor de porcentagem de lise utilizado para o benzonidazol foi de 80%, referente à concentração de 128,0 μ M.

Pelos resultados apresentados na Figura 11 podemos observar uma alta redução do número de parasitas para as associações entre a mevastatina e sinvastatina com o benzonidazol, tendo como concentração final 128,0 μ M.

Figura 11. Dose-resposta em função do log das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benzonidazol nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benzonidazol (BZN) sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, sendo significativo quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4.2.3. Sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As porcentagens de lise das estatinas e do benzonidazol em 24 horas mostraram valores diferentes em relação às formas epimastigotas e estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* em 24 horas.

Substâncias	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	0,0 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 6,1	19,4 $\pm$ 7,2	31,9 $\pm$ 10,9	28,4 $\pm$ 7,2
Pravastatina	0,3 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 8,0	25,5 $\pm$ 4,6	54,2 $\pm$ 4,0	71,7 $\pm$ 5,3
Mevastatina	0,0 $\pm$ 0,0	34,9 $\pm$ 14,6	20,6 $\pm$ 17,8	35,5 $\pm$ 10,3	41,4 $\pm$ 5,1
Benzonidazol	0,0 $\pm$ 0,0	18,5 $\pm$ 5,3	39,0 $\pm$ 8,8	61,2 $\pm$ 8,1	58,3 $\pm$ 6,1

As concentrações de 32,0 μ M e 128,0 μ M apresentaram as maiores porcentagens de lise celular para todas as substâncias testadas, sendo que a pravastatina apresentou valores superiores em relação às outras. A sinvastatina apresentou porcentagens de lise de 26% na concentração de 32,0 μ M e 28% na de 128,0 μ M (IC_{50} =976,2 μ M); a mevastatina de 35% na concentração de 32,0 μ M e 41% na de 128,0 μ M (IC_{50} =320,1 μ M); a pravastatina de 54% na de 32,0 μ M e 71% na de 128,0 μ M (IC_{50} =30,70 μ M) e o benzonidazol de 39% na concentração de 32,0 μ M e 58% na de 128,0 μ M (IC_{50} =28,09 μ M).

A Figura 12 apresenta as curvas dose-resposta em função do log das concentrações das estatinas sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Figura 12. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, mevastatina, pravastatina e benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* em 24 horas. Teste estatístico Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunn, sendo significativo quando $p < 0,05$. Para as formas tripomastigotas as três estatinas e o benzonidazol não apresentaram valores significativos quando comparados entre si, com $p > 0,05$.

Apesar da diferença entre os menores e os maiores valores de porcentagens de lise, comparando-se as estatinas entre si e em relação ao benzonidazol, não houve diferenças estatísticas significantes de acordo com os testes estatísticos aplicados, com $p > 0,05$.

4.2.4. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Os valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol em tripomastigotas de *T. cruzi* são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol puro, sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* na concentração de 128,0 μ M.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)			
Substâncias	50 : 50	75: 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	24,2 $\pm$ 5,5	42,5 $\pm$ 22,0	45,4 $\pm$ 13,4	-
Pravastatina	77,6 $\pm$ 4,0	78,2 $\pm$ 3,0	82,3 $\pm$ 4,0	-
Mevastatina	26,1 $\pm$ 7,1	60,1 $\pm$ 2,1	71,7 $\pm$ 13,4	-
Benzonidazol	-	-	-	58,3 $\pm$ 6,1

Os ensaios foram realizados nas seguintes proporções de (1) 50:50; (2) 75:25; (3) 87,5:12,5. Os resultados mostraram que a associação da sinvastatina com o benzonidazol apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 24% na associação (1), 42% em (2), 45% em (3). A associação da pravastatina apresentou porcentagens de lise celular de 77% em (1), 78% em (2), 82% em (3). Para a associação da mevastatina com o benzonidazol foram observadas porcentagens de lise semelhantes às encontradas para a sinvastatina, sendo elas de 26% em (1), 60% em (2), 71% em (3). O valor de porcentagem de lise do benzonidazol referente à concentração de 128,0 μ M foi de 58% (Figura 13).

Figura 13. Respostas das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benzonidazol nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benzonidazol (BZN) sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Teste estatístico Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, sendo significativo quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***). Apenas as porcentagens de lise da associação da pravastatina em (1), (2) e (3) apresentaram valores estatisticamente significantes.

De acordo com os testes estatísticos realizados, Apenas as porcentagens de lise da associação da pravastatina em (1), (2) e (3) apresentaram valores estatisticamente significantes, com $p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

4.2.5. Sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*

A Tabela 9 apresenta as porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 9. Valores de porcentagens de lise celular e IC₅₀ da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e benzonidazol sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*.

Substâncias	% de lise ± SD X concentração (µM)				
	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	8,7±0,7	19,9±0,7	21,5±4,9	20,6±1,9	44,3±2,9
Pravastatina	8,5±0,6	10,8±2,4	12,7±0,5	24,1±1,2	37,8±2,8
Mevastatina	8,4±1,4	9,6±0,7	23,2±2,8	29,9±0,7	46,0±2,8
Benzonidazol	4,0±1,3	8,9±0,3	12,4±0,9	16,1±1,4	28,6±2,4

As três estatinas apresentaram porcentagens de lise maiores que o benzonidazol em todas as concentrações testadas 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 µM. Na concentração de 128,0 µM, foram obtidos os valores mais elevados de atividade, sendo que a sinvastatina apresentou 44% de porcentagem de lise (IC₅₀=482,8 µM); a pravastatina 37% (IC₅₀=488,7 µM) e a mevastatina 46% (IC₅₀=194,1 µM), enquanto o benzonidazol apresentou porcentagem de lise mais baixa, de 28% (IC₅₀=1,657 mM) (Figura 14).

Figura 14. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), mevastatina (MEV), pravastatina (PRA) e benzonidazol (BZN) sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*. O teste estatístico de Kruskal-Wallis, com avaliação complementar de Dunns, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa para as curvas dose-resposta obtidas ($p > 0,05$).

Apesar da diferença nas porcentagens de lise entre as estatinas e o benzonidazol, de acordo com os testes estatísticos empregados, estas não foram significativas, com $p > 0,05$, e nem demonstraram atividade efetiva contra a forma do parasito.

4.2.6. Associação entre as estatinas e o benzonidazol sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*

A sinvastatina, pravastatina e mevastatina foram associadas ao benzonidazol e os valores expressos em porcentagens de lise celular, apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com o benzonidazol, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e do benzonidazol puro, sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)			
Substâncias	50 : 50	75: 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	18,1 $\pm$ 0,7	25,8 $\pm$ 2,8	31,0 $\pm$ 1,4	-
Pravastatina	18,5 $\pm$ 0,8	23,2 $\pm$ 0,5	29,6 $\pm$ 0,6	-
Mevastatina	14,3 $\pm$ 4,2	38,1 $\pm$ 1,6	44,2 $\pm$ 2,8	-
Benzonidazol	-	-	-	28,6 $\pm$ 2,2

Dadas as proporções das estatinas em relação ao benzonidazol (1) 50:50, (2) 75:25, (3) 87,5:12,5; temos que a associação da sinvastatina com o benzonidazol apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 18% na associação (1), 25% em (2), 31% em (3). A associação da pravastatina apresentou porcentagens de lise celular de 18% em (1), 23% em (2), 29% em (3) e para a associação da mevastatina foram observados valores de porcentagens de lise de 14% em (1), 38% em (2), 44% em (3). Para o benzonidazol, o valor de porcentagem de lise foi de 28%, referente à concentração de 128,0 μ M (Figura 15).

Figura 15. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+BZN), mevastatina (MEV+BZN) e pravastatina (PRA+BZN) com o benznidazol, nas proporções (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e do benznidazol (BZN), sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*. A avaliação pelo método estatístico Two-Way ANOVA, com avaliação complementar de Bonferroni mostrou que a MEV+BZN na combinação (2) e (3) apresentaram resultados estatisticamente significantes com $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,0001^{****}$, respectivamente.

Apesar de não observada uma capacidade elevada de lise das formas amastigotas pelas estatinas associadas ao benznidazol, vimos que a mevastatina teve o melhor desempenho entre as três estatinas, de forma semelhante ao já observado para as demais formas do parasito.

4.3. Ensaios biológicos *in vitro* sobre *Leishmania braziliensis*

4.3.1. Sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis*

A Tabela 11 apresenta os valores de porcentagem de lise celular obtidos sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em 24 horas e a Tabela 12 os valores em 48 horas.

Tabela 11. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em 24 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	11,4 $\pm$ 1,4	33,9 $\pm$ 2,3
Pravastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,2	9,7 $\pm$ 0,2
Mevastatina	0,0 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,3	13,8 $\pm$ 0,7
Anfotericina B	5,3 $\pm$ 7,5	82,1 $\pm$ 0,0	84,2 $\pm$ 0,1	84,8 $\pm$ 0,1	84,7 $\pm$ 0,4

Tabela 12. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em 48 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	28,6 $\pm$ 1,7	31,1 $\pm$ 0,5	34,7 $\pm$ 0,6	39,4 $\pm$ 1,4	68,8 $\pm$ 1,5
Pravastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 2,4
Mevastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,7	8,9 $\pm$ 1,4
Anfotericina B	0,0 $\pm$ 0,0	75,9 $\pm$ 8,5	84,9 $\pm$ 1,0	86,3 $\pm$ 1,9	87,8 $\pm$ 2,6

A mevastatina e a pravastatina apresentaram porcentagens de lise celular baixas ou iguais a zero em ambos os tempos e a sinvastatina apresentou porcentagens de aproximadamente 34% em 24 horas ($IC_{50}=232,4\mu M$) e 69% em 48 horas ($IC_{50}=35,66\mu M$), na concentração de 128,0 μM .

Os ensaios com a anfotericina B foram realizados nas mesmas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM e apresentaram porcentagens de lise celular em torno de 84%, exceto para a concentração de 0,5 μM , em 24 horas ($IC_{50}=1,227\mu M$). Em 48 horas, as porcentagens de lise foram de 84% em 8,0 μM , 85% em 32,0 μM e 87% em 128,0 μM ($IC_{50}=1,483\mu M$).

Os valores das porcentagens de lise celular em relação às concentrações das estatinas são mostrados na Figura 15. As análises estatísticas demonstram que os valores das porcentagens de lise das três estatinas em relação à anfotericina B não apresentam valores de atividade biológica significativos para o tempo de 24 horas. Situação semelhante pode ser observada para o tempo de 48 horas.

Figura 16. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA), mevastatina (MEV) e anfotericina B (ANF) sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, Em **(A)** temos que as três estatinas não apresentaram valores significativos de porcentagem de lise celular, quando comparados com a anfotericina B. Situação semelhante pode ser observada em **(B)**.

4.3.2. Associação entre as estatinas e a anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis*

A associação das estatinas com a anfotericina B foi realizada na concentração final 128,0 μM , nas proporções (1) 50:50; (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5. Os valores de porcentagem de lise obtidos para formas promastigotas de *L. braziliensis* em 24 horas são apresentados na tabela 13 e em 48 horas na Tabela 14.

Tabela 13. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em 24 horas.

% de lise $\pm$ SD X concentração (μM)				
Substâncias	50 : 50	75 : 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	82,1 $\pm$ 1,2	81,0 $\pm$ 0,3	82,5 $\pm$ 0,6	-
Pravastatina	80,1 $\pm$ 1,4	80,8 $\pm$ 1,1	83,1 $\pm$ 1,2	-
Mevastatina	75,6 $\pm$ 2,2	80,7 $\pm$ 1,7	80,8 $\pm$ 0,7	-
Anfotericina B	-	-	-	79,3 $\pm$ 0,2

Tabela 14. Valores das porcentagens de lise celular e das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em 48 horas.

% de lise $\pm$ SD X concentração (μM)				
Substâncias	50 : 50	75: 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	76,3 $\pm$ 1,8	74,4 $\pm$ 1,8	76,6 $\pm$ 1,4	-
Pravastatina	79,6 $\pm$ 0,9	82,8 $\pm$ 0,9	82,8 $\pm$ 0,9	-
Mevastatina	75,6 $\pm$ 2,2	80,7 $\pm$ 1,7	80,8 $\pm$ 0,7	-
Anfotericina B	-	-	-	81,4 $\pm$ 0,2

A associação da sinvastatina com a anfotericina B apresentou porcentagens de lise celular de aproximadamente 82% nas associações (1) e (3) e 80% em (2). A pravastatina apresentou porcentagens de lise celular de 81% em (1) e (2) e 82% em (3). A mevastatina apresentou porcentagem de lise mais baixa na associação (1), aproximadamente 75% e em (2) e (3) semelhante às duas estatinas anteriores, de 80%.

O valor da porcentagem de lise da anfotericina B pura utilizado como referência foi de 79%, na concentração de 128,0 μ M.

A figura 17 (A) apresenta a comparação das porcentagens de lise celular das três associações das estatinas com a anfotericina B e a anfotericina B pura em 24 horas. De acordo com os testes estatísticos realizados, temos que a associação da mevastatina em (1) e as associações da sinvastatina e da pravastatina em (3) foram significantes quando comparadas à anfotericina B pura, com $p < 0,05$.

Os resultados obtidos em 48 horas mostraram que a associação da anfotericina B com a sinvastatina apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 76% nas associações (1) e (3) e 74% em (2). Em associação com a pravastatina, as porcentagens de lise celular foram de 79% em (1) e 82% em (2) e (3). A mevastatina apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 75% em (1) e 80% em (2) e (3).

A figura 17 (B) mostra a comparação das porcentagens de lise das três associações das estatinas com a anfotericina B, cujo valor de referência da anfotericina B pura foi de 81% na concentração de 128,0 μ M. De acordo com os testes estatísticos realizados, temos que as associações da sinvastatina, da pravastatina e da mevastatina não apresentaram resultados de avaliação biológica significantes, apesar de resultados próximos ao controle positivo.

Figura 17. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+ANF), mevastatina (MEV+ANF) e pravastatina (PRA+ANF) com a anfotericina B (ANF), nas proporções de (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e anfotericina B pura sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, não havendo resultado de avaliação biológica significativa, apesar de resultados próximos ao controle positivo.

4.3.3. Sobre as formas amastigotas de *L. braziliensis*

Os ensaios realizados com a sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* não apresentaram porcentagens de lise parasitária, assim como suas associações à anfotericina B. Desse modo, não foi possível a construção dos gráficos e consequentes cálculos da concentração inibitória mínima (IC₅₀) das substâncias.

4.4. Ensaio biológico *in vitro* sobre *Leishmania major*

4.4.1. Sobre as formas promastigotas de *L. major*

Os resultados obtidos de porcentagem de lise celular nos ensaios com as formas promastigotas de *L. major* foram semelhantes aos obtidos para *L. braziliensis*, como apresentados nas Tabelas 17 para 24 horas e Tabela 18 para 48 horas.

Tabela 15. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. major* em 24 horas

	% de lise ± SD X concentração (µM)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	12,1±1,0	15,6±3,3	20,7±0,0	26,6±2,3	45,4±3,3
Pravastatina	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,9±0,0	1,8±0,3
Mevastatina	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,0
Anfotericina B	22,9±0,6	88,1±0,2	89,4±0,2	91,3±0,7	91,7±1,0

Tabela 16. Valores de porcentagens de lise celular da sinvastatina, pravastatina, mevastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. major* em 48 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)				
Substâncias	0,5	2,0	8,0	32,0	128,0
Sinvastatina	9,4 $\pm$ 2,7	19,5 $\pm$ 1,2	21,0 $\pm$ 2,7	28,1 $\pm$ 1,2	47,4 $\pm$ 3,0
Pravastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0
Mevastatina	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 0,4
Anfotericina B	5,2 $\pm$ 0,3	74,5 $\pm$ 1,7	85,6 $\pm$ 1,4	88,9 $\pm$ 1,4	89,9 $\pm$ 0,5

A pravastatina e a mevastatina também não apresentaram atividade significativa sobre as formas promastigotas. A sinvastatina apresentou as maiores porcentagens de lise na concentração de 128,0 μ M, sendo aproximadamente 45% em 24 horas (IC_{50} =310,8 μ M) e 47% em 48 horas (IC_{50} =239,3 μ M).

A anfotericina B, utilizada como medicamento de referência, apresentou porcentagens de lise mais altas do que as três estatinas em todas as concentrações testadas e em ambos os tempos. Os maiores valores foram encontrados para a concentração de 128,0 μ M, sendo de aproximadamente 93% em 24 horas (IC_{50} =0,8540 μ M) e 89% em 48 horas (IC_{50} =1,351 μ M).

A Figura 18 apresenta as curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina, mevastatina, pravastatina e anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. major* em (A) 24 horas e (B) 48 horas.

Figura 18. Curvas dose-resposta em função do log das concentrações de sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA), mevastatina (MEV) e anfotericina B (ANF) sobre as formas promastigotas de *L. major* em **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Teste estatístico de Kruskal-Wallis, com teste complementar de Dunns, não sendo encontrados resultados significativos em ambas as situações.

Os testes estatísticos mostraram que os valores de porcentagem de lise das estatinas comparadas à anfotericina B não demonstraram resultados significativos para as estatinas avaliadas, em 24 horas. A mesma situação pôde ser observada para o tempo de 48 horas.

4.4.2. Associação entre as estatinas e a anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. major*

Os ensaios de associação das estatinas com a anfotericina B em promastigotas de *L. major* foram realizados nas mesmas proporções de (1) 50:50; (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e os resultados apresentados nas tabelas 19 (24 horas) e 20 (48 horas).

Tabela 17. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de *L. major* em 24 horas.

	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)			
Substâncias	50 : 50	75 : 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	70,3 $\pm$ 1,1	73,5 $\pm$ 1,3	77,3 $\pm$ 1,4	-
Pravastatina	69,3 $\pm$ 1,1	72,9 $\pm$ 6,5	76,5 $\pm$ 1,1	-
Mevastatina	88,7 $\pm$ 1,2	87,4 $\pm$ 1,2	88,4 $\pm$ 1,6	-
Anfotericina B	-	-	-	90,4 $\pm$ 0,2

Tabela 18. Valores das porcentagens de lise celular das associações da sinvastatina, pravastatina e mevastatina com a anfotericina B, nas proporções de 50:50; 75:25 e 87,5:12,5 e da anfotericina B pura, sobre as formas promastigotas de *L. major* em 48 horas.

Substâncias	% de lise $\pm$ SD X concentração (μ M)			
	50 : 50	75: 25	87,5 : 12,5	0 : 100
Sinvastatina	68,1 $\pm$ 1,1	69,7 $\pm$ 2,0	77,7 $\pm$ 1,4	-
Pravastatina	62,7 $\pm$ 1,4	72,5 $\pm$ 1,9	73,1 $\pm$ 1,16	-
Mevastatina	87,8 $\pm$ 1,0	87,4 $\pm$ 1,2	88,5 $\pm$ 1,9	-
Anfotericina B	-	-	-	85,5 $\pm$ 0,7

Em 24 horas, a associação da sinvastatina com a anfotericina B apresentou porcentagens de lise celular de aproximadamente 70% na associação (1), 73% em (2) e 77% em (3). A pravastatina apresentou porcentagens de lise semelhantes à sinvastatina de 69% em (1), 73% em (2) e 76% em (3). A mevastatina apresentou porcentagens de lise mais altas em relação às anteriores, sendo 88% em (1) e (3) e 87% em (3).

Os resultados obtidos em 48 horas mostraram que a associação da anfotericina B com a sinvastatina apresentou porcentagens de lise de aproximadamente 68% na associação (1), 69% em (2) e 77% em (3). A associação da pravastatina apresentou porcentagens de lise celular de 62% em (1), 72% em (2) e 73% em (3) e da mevastatina apresentou porcentagens de lise também maiores em relação às anteriores, sendo 87% em (1) e (2) e 88% em (3).

A figura 19 (A e B) apresenta a comparação das porcentagens de lise das três associações das estatinas com a anfotericina B. Em 24 horas (A) o valor da

porcentagem de lise da anfotericina B foi de 90% e em 48 horas (B) de 85%, referente à concentração de 128,0 μ M.

Os valores analisados pelos testes estatísticos mostraram, tanto em 24 como em 48 horas, que todas as associações não apresentaram valores significativos quando comparadas à anfotericina B.

Figura 19. Dose-resposta em função do log das concentrações das associações de sinvastatina (SIN+ANF), mevastatina (MEV+ANF) e pravastatina (PRA+ANF) com a anfotericina B (ANF), nas proporções de (1) 50:50, (2) 75:25 e (3) 87,5:12,5 e anfotericina B pura sobre as formas promastigotas de *L. major*. Teste estatístico Two-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni, não havendo resultado de avaliação biológica significativa, apesar de resultados próximos ao controle positivo.

4.4.3. Sobre as formas amastigotas de *L. major*

Da mesma forma que para *L. braziliensis*, os ensaios realizados com a sinvastatina, pravastatina e mevastatina sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* não apresentaram porcentagens de lise parasitária, assim como suas associações à anfotericina B. Assim, não foi possível a construção dos gráficos e consequentes cálculos da concentração inibitória mínima (IC₅₀) das substâncias.

4.5. Ensaios biológicos *in vivo*

4.5.1. Ensaio *in vivo* para *Trypanosoma cruzi*

As estatinas sinvastatina, mevastatina e pravastatina e suas associações com o benzonidazol foram avaliadas em camundongos BALB/c infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi* (2x10⁴ formas tripomastigotas). O tratamento foi realizado na dosagem de 10mg/kg por dia intraperitonealmente, durante 20 dias e o benzonidazol usado como controle positivo, utilizando-se o mesmo esquema terapêutico.

A mevastatina apresentou redução da parasitemia em relação ao controle positivo e às outras estatinas testadas, sendo que de acordo com as avaliações das curvas parasitêmicas, houve diferença significativa ao final do tratamento, ocorrendo uma redução de aproximadamente 40% dos parasitas em relação ao controle negativo e de 60% em relação ao benzonidazol (BZN) (Figura 20). Da mesma forma, as associações da sinvastatina e da mevastatina com o benzonidazol (Figura 21).

Figura 20. Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV) na concentração de 10mg/kg, durante 20 dias. Controle positivo animais tratados com benzonidazol (BZN) e controle negativo (CN) tratados com solução de DMSO 3,5%.

Figura 21. Comportamento parasitário de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com as associações da sinvastatina (SIN+BZN), pravastatina (PRA+BZN) e mevastatina (MEV+BZN) com o benzonidazol na concentração de 10mg/kg durante 20 dias. Controle positivo animais tratados com benzonidazol (BZN) e controle negativo (NC) tratados com solução de DMSO 3,5%.

4.5.2. Ensaio *in vivo* para *Leishmania braziliensis*

Os resultados referentes às avaliações dos diâmetros médios das lesões leishmanióticas, determinadas pela infecção experimental em camundongos BALB/c são apresentados nas Figuras 22 e 23. Os animais foram infectados com $2,0 \times 10^4$ formas promastigotas de *L. braziliensis*, obtidas de cultivo axênico e tratados com as estatinas e suas associações com a anfotericina B.

Figura 22. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. braziliensis* e submetidos ao tratamento com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%.

Figura 23. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. braziliensis* e submetidos ao tratamento com as associações de sinvastatina (SIN+ANF), pravastatina (PRA+ANF) e mevastatina (MEV+ANF), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%.

O tratamento foi realizado na dosagem de 10mg/kg por dia intraperitonealmente, durante 20 dias e a anfotericina B usada como controle positivo, utilizando-se o mesmo esquema terapêutico.

Considerando-se as estatinas puras e suas associações ao medicamento de referência (anfotericina B), verificou-se que não houve variação entre os diferentes grupos avaliados, tanto em relação ao aspecto visual das lesões, quanto de seus diâmetros (Figuras 24, 25, 26 e 27).

Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método One-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni. E não demonstraram redução estatisticamente significativa em relação aos controles positivo (anfotericina B) e negativo (sem tratamento), com $p > 0,05$.

Figura 24. Aspecto das lesões iniciais de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias).

Figura 25. Aspecto das lesões iniciais de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF.

Figura 26. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 20 dias de tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias).

Figura 27. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. braziliensis* após 20 dias de tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF.

4.5.3. Ensaio *in vivo* para *Leishmania major*

As estatinas sinvastatina, pravastatina, mevastatina e suas associações com a anfotericina B foram testadas em camundongos BALB/c infectados com $2,0 \times 10^4$ formas promastigotas de *L. major*. O tratamento foi realizado na dosagem de 10mg/kg por dia intraperitonealmente, durante 20 dias e a anfotericina B usada como controle positivo, utilizando-se o mesmo esquema terapêutico. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. major* e submetidos ao tratamento com sinvastatina (SIN), pravastatina (PRA) e mevastatina (MEV), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%.

Figura 29. Variação do diâmetro das lesões em camundongos BALB/c, infectados por *L. major* e submetidos ao tratamento com as associações de sinvastatina (SIN+ANF), pravastatina (PRA+ANF) e mevastatina (MEV+ANF), durante 20 dias, pela via intraperitoneal. Controle positivo: animais tratados com anfotericina B; controle negativo: animais tratados com solução de DMSO 3,5%.

Da mesma forma que para *L. braziliensis*, as estatinas puras e suas associações ao medicamento de referência (anfotericina B) não apresentaram variação entre os diferentes grupos avaliados, tanto em relação ao aspecto visual das lesões, quanto de seus diâmetros (Figuras 30, 31, 32 e 33).

Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método One-Way ANOVA, com teste complementar de Bonferroni. Apesar da mevastatina associada à anfotericina B ter apresentado redução da lesão leishmaniótica, de acordo com os testes empregados não houve redução estatisticamente significativa em relação aos controles positivo (anfotericina B) e negativo (sem tratamento) das estatinas, nem de suas associações, com $p > 0,05$.

Figura 30. Aspecto inicial das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias).

Figura 31. Aspecto inicial das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 30 dias de infecção, com formação dos nódulos e início do tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF.

Figura 32. Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 20 dias de tratamento, de acordo com os grupos: 1a - controle negativo (sem tratamento); 1b - controle positivo (tratado com anfotericina); 1c - tratado com DMSO (solvente das substâncias).

Figura 33: Aspecto das lesões de camundongos *Mus musculus* infectados por *L. major* após 20 dias de tratamento, de acordo os grupos: 1a - MEV; 1b - MEV+ANF; 1c - PRAV; 1d - PRAV+ANF; 1e - SINV; 1f - SINV+ANF.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Dada a importância que a doença de Chagas e as leishmanioses possuem no contexto mundial e relacionando com o aumento da incidência parasitária em diversos países do mundo, muitas pesquisas têm sido realizadas e progressos têm sido alcançados, no entanto, os tratamentos ainda apresentam muitos problemas. Os medicamentos utilizados no tratamento clínico da doença não são sempre eficazes e apresentam muitos agravantes, entre eles, efeitos colaterais severos devido à toxicidade.

Benzonidazol (ROCHAGAN®/ROCHE) e nifurtimox (LAMPIT®/BAYER) surgiram no final da década de 1960 para o tratamento da fase aguda da infecção chagásica, porém com índices de cura muito baixos na fase crônica da doença. Os dois fármacos são ainda utilizados como principais antiparasitários para o tratamento da doença, embora o nifurtimox tenha deixado de ser utilizado no Brasil, estando atualmente fora do mercado.

O emprego desses medicamentos em esquemas de duração prolongada (30 a 60 dias) causa efeitos colaterais indesejáveis (COURA & CASTRO, 2002), incluindo toxicidade cardíaca e renal, além de não curarem a maioria dos pacientes com doença crônica (MAYA et al, 1997; VELOSO et al., 2001).

Os medicamentos de escolha hoje para leishmaniose cutânea e visceral incluem antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina ou antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), isetionato de pentamidina e a anfotericina B (MUNG'ONG'O et al., 2008; VERONESI, FOCACCIA, 2002). Estes fármacos têm inconvenientes semelhantes aos utilizados para a doença de Chagas.

Os antimoniais pentavalentes são considerados como principais fármacos no tratamento da leishmaniose, porém o mecanismo de ação desses fármacos ainda não está bem esclarecido. O glucantime é utilizado na terapia das leishmanioses há mais de 40 anos, sendo a droga em uso no Brasil. Apesar da eficiência, os antimoniais são altamente tóxicos e podem não ser efetivos em manifestações severas de formas mucocutâneas (VERONESI, FOCCACIA, 1999). Estes compostos são hepatotóxicos, nefrotóxicos, afetam a função cardíaca e podem causar resistência, como tem sido publicado recentemente na literatura (AYRES et al., 2007).

A anfotericina B requer um período maior de terapia e frequentemente induzem efeitos tóxicos e colaterais também, tais como febre, calafrios e náuseas. Surge como segunda opção no tratamento das leishmanioses viscerais e tegumentares em pacientes que não respondem aos antimoniais (CROFT, COOMBS, 2003). A ação da anfotericina B é potencializada quando incorporada a lipossomos, porém essas formulações lipídicas são caras para o uso rotineiro em países subdesenvolvidos (MURRAY, 2005).

A pentamidina tem ação inferior aos antimoniais e apresenta maior toxicidade. Um avanço mais recente foi o tratamento oral de leishmaniose visceral com miltefosina (CROFT, COOMBS, 2003), além de se mostrar eficiente no tratamento de leishmaniose cutânea (SOTO et al., 2001), e leishmanioses caninas (CROFT & COOMBS, 2003). Apesar do mecanismo de ação da miltefosina ainda ser desconhecido, já foi proposta sua atuação no processo de morte celular programada, determinada pela expressão de fosfatidilserina e incorporação de iodeto de propídio, o que finda na fragmentação de DNA (MARINHO et al., 2011).

Devido à baixa eficácia e os efeitos colaterais apresentados, a busca por um medicamento mais eficaz, capaz de tratar, eliminar os agentes causadores e apresentar o mínimo de efeitos colaterais ao paciente é muito importante e vem sendo ampliada (LUIZE et al., 2005). Dessa forma, a linha de pesquisa desenvolvida nesse trabalho buscou avaliar substâncias que pudessem auxiliar no tratamento clínico destas enfermidades.

A cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* utilizada é uma cepa padrão para pesquisa com diversas peculiaridades interessantes como infectividade em animais, resposta aos tratamentos existentes e marcadores genéticos estáveis. O clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi* é originado a partir da cepa CL Brener modificada geneticamente, que possui o gene LacZ da bactéria *Escherichia coli* e catalisa uma reação colorimétrica com o clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG). O CPRG quando clivado pela enzima β -galactosidase produz um produto púrpura solúvel em água e mensurável por espectrofotometria. Por isso a utilização dessa linha do parasita no presente trabalho.

As espécies de *Leishmania* utilizadas foram *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*, que causam respectivamente, a leishmaniose cutânea e a mucocutânea. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, enquanto a mucocutânea é uma forma mais temida por produzir lesões destrutivas, podendo causar desfiguramento facial.

Estudos têm demonstrado que protozoários parasitas, como o *T. cruzi* e as diferentes espécies do gênero *Leishmania* exigem a síntese de determinados esteróis endógenos (ergosterol e análogos), que atuam como fatores de crescimento essenciais para a sua sobrevivência (DOCAMPO, SCHMUNIS, 1997; URBINA, 2002). Estes parasitas são altamente suscetíveis, *in vivo* e *in vitro*, a inibidores da

biossíntese de esteróis, tais como antifúngicos azólicos, derivados de quinuclidina, allilaminas, estatinas e azasteróis (DOCAMPO, SCHMUNIS, 1997; URBINA, DOCAMPO, 2003). Na verdade, a biossíntese dos esteróis é uma das principais vias de intervenção no desenvolvimento de anti-tripanosomatídeos (SEALEY-CARDONA, 2007).

Dessa forma, vários trabalhos já foram realizados sobre a ação de estatinas em várias espécies de protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Acanthamoeba*, além de espécies de fungos, e os resultados têm demonstrado que essa classe de substâncias tem um elevado potencial em termos de ação lítica de suas membranas, uma vez que atuam também de maneira significativa sobre a biossíntese do ergosterol (Urbina, 2009, Vanden Bossche et al., 1995, Vera-Cruz et al., 2003, Viotti et al., 2009, Wikhe, et al., 2007).

Tendo em vista que *Trypanosoma cruzi* e parasitos do gênero *Leishmania*, possuem o ergosterol como importante componente de suas membranas plasmáticas, avaliamos um grupo de substâncias que fazem parte dos inibidores da biossíntese de esteróis (colesterol e ergosterol), com o intuito de verificar se essas substâncias pudessem atuar sobre os lipídeos de membrana desses parasitas e, conseqüentemente, promoverem a morte dos protozoários em suas diferentes formas evolutivas. O grupo de inibidores da biossíntese dos esteróis empregado foi o das estatinas, fármacos empregados no tratamento de elevados níveis de colesterol, LDL-colesterol e VLDL-colesterol no sangue.

A visão deste trabalho foi voltada à avaliação das estatinas puras e de suas associações com o benzonidazol, fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas e com a anfotericina B, medicamento de referência no tratamento das leishmanioses, partindo do pressuposto que a substituição do benzonidazol /

anfotericina B ou a diminuição de suas doses em combinação com as estatinas pudessem auxiliar no tratamento e diminuir os efeitos colaterais provocados pela medicação em uso atualmente.

A sinvastatina, a pravastatina e a mevastatina foram as estatinas de escolha do trabalho. Devido ao uso comercial dessas substâncias, o ensaio de citotoxicidade não foi proposto inicialmente, porém achamos importante sua realização para assegurar que as substâncias não possuíam realmente efeitos citotóxicos para as células, podendo assim interferir nos resultados. O ensaio foi realizado com duas linhagens celulares, células LLCMK2 (linhagem de fibroblastos de rim de macaco) e células P388D1 (linhagem de macrófagos).

O teste de citotoxicidade foi realizado para o tempo de 48 horas, tempo máximo de contato das substâncias com as variadas formas evolutivas dos parasitas. Os valores de porcentagem de lise celular obtidos para a pravastatina e a mevastatina foram muito baixos ou iguais a zero, para as cinco concentrações testadas (0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM) e a sinvastatina apresentou aproximadamente 35% de porcentagem de lise na concentração mais elevada, comprovando então que as estatinas não possuíam efeito citotóxico para as células.

Os avaliação das estatinas sobre *Trypanosoma cruzi in vitro* foram realizados em suas três formas evolutivas, epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Em formas epimastigotas, a sinvastatina e a mevastatina apresentaram atividades semelhantes, com porcentagens de lise celular mais elevadas que as do benzonidazol, fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas. Da mesma forma, suas associações com o benzonidazol mostraram resultados semelhantes, onde a porcentagem de lise celular aumentou com a diminuição da concentração de benzonidazol, ao contrário da pravastatina. Dessa forma, observamos resultados

positivos na utilização destas duas estatinas, tanto em sua forma pura, quanto como coadjuvante associada ao benzonidazol.

Os ensaios com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram resultados diferentes dos realizados em formas epimastigotas. A pravastatina mostrou porcentagens de lise superiores às encontradas para as outras duas estatinas e para o benzonidazol. Sua associação também apresentou melhores resultados, porém as três estatinas apresentaram porcentagens de lise mais elevadas que as do benzonidazol com a diminuição na concentração deste. Assim, como para as formas epimastigotas, as estatinas puras e suas associações ao benzonidazol mostraram resultados satisfatórios.

Como para as formas anteriormente descritas, nos ensaios com amastigotas intracelulares, as estatinas também mostraram resultados positivos. Apesar de a mevastatina ter apresentado uma porcentagem de lise celular um pouco maior que as outras estatinas, consideramos os resultados obtidos semelhantes ou superiores aos obtidos para o benzonidazol. As associações das três estatinas com o benzonidazol também demonstraram que a porcentagem de lise parasitária aumentou com a diminuição da concentração do medicamento de referência.

Nos ensaios *in vivo* com *T. cruzi*, camundongos BALB/c foram infectados com formas epimastigotas do parasita e o tratamento realizado durante 20 dias. A concentração das estatinas utilizada foi de 10mg/kg por dia, concentração essa prescrita para o tratamento usual utilizando esses fármacos. O benzonidazol foi preparado na mesma concentração, assim como sua associação às estatinas, a título de comparação de suas atividades em relação à parasitemia dos animais.

As estatinas e suas associações ao benzonidazol mostraram resultados positivos em alguns casos, como no tratamento com mevastatina onde houve

redução da parasitemia em relação ao controle positivo e às outras estatinas testadas. De acordo com as avaliações das curvas parasitêmicas, houve diferença significativa ao final do tratamento, ocorrendo uma redução de aproximadamente 40% dos parasitas em relação ao controle negativo e de 60% em relação ao benzonidazol. Da mesma forma, as associações da sinvastatina e da mevastatina com o benzonidazol, sendo os animais observados ainda durante um mês após os 20 dias de tratamento sem sinais de debilidade.

Para os ensaios *in vitro* com as formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* foi utilizado o método colorimétrico do MTT, baseado na redução do MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), um tetrazol amarelo, a formazan púrpura, sendo extremamente utilizado para medição *in vitro* de atividade metabólica ou viabilidade de culturas celulares (SIEUWERTS et al., 1995).

Os testes foram realizados colocando-se as formas promastigotas dos parasitas em contato com as substâncias estudadas por 24 e 48 horas, nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; 32,0 e 128,0 μM e seguindo-se com o protocolo descrito por Muelas-Serrano et al. (2000). Os valores de porcentagem de lise celular obtidos para *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major* foram bem semelhantes, sendo que as três estatinas não apresentaram atividade comparadas à anfotericina B, medicamento de referência no tratamento da doença, tanto em 24 como em 48 horas.

As associações das estatinas com a anfotericina B também não apresentaram valores de lise parasitária estatisticamente significantes, tanto em *L. braziliensis* como em *L. major*, porém as porcentagens foram bem próximas às obtidas para o controle positivo (anfotericina B).

Para *L. braziliensis* as associações das três estatinas apresentaram valores próximos entre si e comparados à anfotericina B, tanto em 24 como em 48 horas. Para *L. major*, as associações da sinvastatina e da pravastatina apresentaram valores de lise celular próximos entre si e menores que o da anfotericina B, já a mevastatina apresentou valores próximos ou comparáveis ao da anfotericina B, tanto em 24 como em 48 horas.

Nos ensaios *in vivo* com *L. braziliensis* e *L. major*, camundongos BALB/c foram infectados com formas promastigotas do parasita e o tratamento realizado durante 20 dias, na concentração de 10mg/kg por dia de cada estatina, de anfotericina B e das associações, como descrito para *T. cruzi*.

As três estatinas e suas associações ao medicamento de referência, anfotericina B, não mostraram resultados significantes. Em animais infectados com *L. braziliensis*, a pravastatina e a mevastatina apresentaram valores dos diâmetros médios das lesões próximos aos tratados com anfotericina B (controle positivo) e aos sem tratamento (controle negativo). A sinvastatina apresentou valores superiores.

As associações das estatinas com a anfotericina B também não apresentaram valores significantes, onde os animais tratados com sinvastatina apresentaram valores de diâmetro médio das lesões próximos aos do controle positivo (anfotericina B) e negativo (sem tratamento), enquanto as associações da pravastatina e da mevastatina apresentaram valores superiores.

Em animais infectados com *L. major*, o tratamento com sinvastatina, pravastatina e mevastatina apresentaram valores dos diâmetros médios das lesões próximos entre si e pouco menores que os tratados com anfotericina B (controle positivo) e os sem tratamento (controle negativo). As associações da pravastatina e

da sinvastatina apresentaram valores próximos aos dos controles (positivo e negativo) e a associação da mevastatina valor inferior.

De acordo com as análises apresentadas, as estatinas demonstraram efeitos antiproliferativos contra *T. cruzi*, puras e associadas, mas não demonstraram o mesmo efeito contra *L. braziliensis* e *L. major*, apesar de encontrarmos resultados próximos ao controle positivo quando associadas à anfotericina B. Esses resultados apresentam similaridade a dados obtidos da literatura com estatinas e com outros inibidores da síntese de esteróis (ATOR et al., 1992, URBINA et al., 1997, GOAD et al., 1985, BEACH et al., 1989, RANGAL et al., 1996, URBINA et al., 1988, MOLINA et al., 2000).

Esses efeitos antiproliferativos, ou atividade das substâncias, mostraram diferenças em relação às estatinas e em relação às formas evolutivas dos parasitas, tanto em *T. cruzi*, como em *L. braziliensis* e *L. major*. As possíveis razões para tais fatos são que a sinvastatina, pravastatina e mevastatina, apesar de fazerem parte do grupo das estatinas possuem diferenças estruturais entre si, o que poderia agir de forma mais favorável ou não, de acordo com a estrutura da membrana dos parasitas. Esses por sua vez, possuem esteróis que diferem entre os membros da família *Trypanosomatidae*, ou seja, os esteróis presentes em *T. cruzi* são diferentes dos presentes em *L. major* e *L. braziliensis*.

Em espécies de *Leishmania* os esteróis baseados em ergostano são mais abundantes em ambas as formas, amastigotas e promastigotas, sendo o ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol predominante (HEATH et al., 2001), embora o ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (MORITA et al., 2000), principal esterol de fungos, está frequentemente presente em menor quantidade. Os esteróis estigmastano (PAUL et al., 2001, PEROZZO et al., 2002) somam cerca de 5% do total de esteróis em promastigotas

de *Leishmania*, mas na forma amastigota de algumas espécies eles podem alcançar 20%, sugerindo assim que os esteróis C29 podem conferir benefício ao parasita, quando eles se encontram dentro dos macrófagos (GOAD et al., 1989).

Levando em consideração esses dados da literatura, podemos sugerir que a falta de efetividade total das estatinas em formas amastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* e em ensaios *in vivo* tenham relação com o benefício conferido a essa forma do parasita no interior dos macrófagos.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* possuem ergosterol e ergosta-5,7-dien-3 β -ol, que compreendem aproximadamente 40% dos esteróis totais e 30% de stigmasta-5,7-dien-3 β -ol (WALLER et al., 2000) e stigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol (PEROZZO et al., 2002), entre outros, em contraste com amastigotas de *Leishmania* (PAUL et al., 2001, LIENDO et al., 1999). Além dos esteróis C28 e C29, *Leishmania* sp. e *T. cruzi* apresentam quantidades variáveis de colesterol (geralmente mais que 10% do total de esteróis) derivadas do meio de cultura ou do hospedeiro animal [GOAD et al., 1989, BEACH et al., 1986, LIENDO et al., 1999].

Como descrito por Lorente et al. (2004), novos compostos baseados em inibidores da biossíntese de esteróis (azasteróis) mostraram atividade contra formas sanguíneas de *T. brucei rhodesiensis*. Em formas procíclicas (formas encontradas no inseto vetor) de *T. brucei rhodesiensis*, os parasitas possuem o ergosterol como principal esterol presente, além de toda a maquinaria biossintética requerida para produção desses compostos. Entretanto, no estágio de tripomastigota em mamíferos, o parasita possui baixa densidade de receptores de lipoproteína e adquire todos os esteróis (como o colesterol) do hospedeiro (COPPENS et al., 2000).

Em trabalhos anteriores, *L. amazonensis* (VANNIER-SANTOS et al., 1995) e *T. cruzi* (LAZARDI et al., 1990, LAZARDI et al., 1991) foram incubados com inibidores da biossíntese de ergosterol, como terbinafina, cetoconazol e 22,26-azasterol e apresentaram mudanças em suas mitocôndrias. A presença dessas mudanças sugere que a presença de ergosterol ou 5-dehidroepisterol é essencial para a preservação da estrutura normal da membrana mitocondrial nesses parasitas. Em epimastigotas de *T. cruzi*, foi relatada uma grande concentração de esterol endógeno e exógeno na mitocôndria, sugerindo que o ergosterol e/ou outros esteróis 24-alquilados são essenciais e que a diminuição da disponibilidade de tais esteróis afetam as funções mitocondriais.

O ensaio *in vivo* com animais infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* mostrou resultado positivo de decréscimo da parasitemia, mesmo sendo o tratamento realizado por apenas por 20 dias. Outra possibilidade de explicar uma evolução melhor da doença, tanto na doença de Chagas experimental como nas leishmanioses, é o efeito das estatinas que influenciam nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasita (LIAO, 2002, CHOW, 2009).

Modelos murinos de leishmaniose apresentam diferentes respostas imunológicas dependentes da espécie de hospedeiro. Geralmente camundongos BALB/c susceptíveis a *Leishmania major* apresentam a doença disseminada, o que leva a morte em poucos meses (KÜCKELHAUS et al., 2011). Infecções murinas com *Leishmania amazonensis* mostraram-se similares à doença em humanos (AWASTHI et al., 2004).

Em trabalho realizado por Kückelhaus et al. (2011), a pravastatina aumentou a sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*, além do retardo no aparecimento das lesões cutâneas e diminuição destas. Os

animais foram tratados com a dose de 20mg/kg/dia, durante 90 dias. A partir desses dados podemos sugerir um tratamento mais longo também para as espécies de *Leishmania* utilizadas nesse trabalho, além de suas associações à anfotericina.

A depleção de esteróis essenciais dos parasitas da família Trypanossomatidae é provavelmente a causa principal de várias alterações em suas estruturas o que leva à inibição do crescimento e consequente lise celular, embora outros efeitos não possam ser excluídos (LORENTE et al., 2004).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A utilização das estatinas e de suas associações ao benzonidazol sobre as formas evolutivas de *T. cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram boa atividade antiparasitária, com valores de porcentagem de lise mais altos ou comparados aos encontrados para o benzonidazol.
- A utilização das estatinas sobre as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major* em ensaios *in vitro* não mostrou atividade antiparasitária em relação à anfotericina B. Já suas associações apesar de não apresentarem valores significativos, ficaram próximos aos encontrados para o medicamento de referência. Nos ensaios *in vivo* as estatinas e suas associações não demonstraram atividade antiparasitária.

Dessa forma, as estatinas podem ser candidatos promissores a novos agentes terapêuticos no tratamento da doença de Chagas, visto que os resultados obtidos foram positivos *in vitro* e *in vivo*.

Novas investigações ainda preveem avaliação dessas substâncias sobre a morfologia e ultraestrutura dos parasitas, avaliação sobre a quantificação de ergosterol presente nas membranas, além de um tratamento mais prolongado nos ensaios *in vivo* para verificação de uma possível queda maior na parasitemia dos animais.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Bulkestra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Alisson AA. 9,000-years record of Chagas disease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004; 101: 2034-2039.

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; 346(12): 891–895.

Alvar VARJ, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(2): 334-59.

Ator MA, Schmidt SJ, Adams JL, Dolle RE, Kruse L. I, Frey CL, Barone JM. 1992. Synthesis, specificity, and antifungal activity of inhibitors of the *Candida albicans* 24-sterol methyltransferase. J. Med. Chem. 35:100–106.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. The Indian Journal of Medical Research. 2004; 119: 238–258.

Azzouz S, Maache M, Garcia RG, OSUNA A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. Jan 2005; 96(1): 60-5.

Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. May. 2007; 102 (2): 215-20.

Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. Br Med Bull. 2012; 104: 175-96.

Beach DH, Goad LJ, Holz GG. Effects of ketoconazole in sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem Biophys Res Commun 1986;136: 851–6.

Beach DH, Goad LJ, Berman JD, Ellenberger TE, Beverley SM, Holz GG. Effects of a squalene-2,3-epoxidase inhibitor on propagation and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes and amastigotes. In: Hart DT, editor. Leishmaniasis. New York, USA: Plenum; 1989.

Benveniste, P. Sterol biosynthesis. Annual review of plant physiology. 1986; 37(1): 275-308.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. Curr Opin Infect Dis. 2008; 21: 476-482.

Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, Silber AA. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. Journal of Cellular and Molecular Medicine. England. 2010. In press.

Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, De Souza W. Effects of inhibitors of Delta24(25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Microscopy and Microanalysis. Dec 2005; 11(6): 506-15.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: 2000.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. 2006; 2.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annual Review of Microbiology. 1973; 27: 347-382.

Brener Z, Cançado JR, Galvão LM, Da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME et al. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88: 149-153.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 55-56 p.

Brito MM, Pires MQ, Pacheco RS. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. *Kinetoplastide Biology and Disease*, 2003; 2(1):17

Bryceson ADM. Mechanism of disease in leishmanioses. Symposium of the British Society for Parasitology. 1975; 13: 85-100.

Bryceson ADM. Leishmaniasis. In Cook GC. *Manson's Tropical Diseases*. WB Saunders London. 1996; 1213-1245.

Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40: 2592-2597.

Buckner FS, Griffin JH, Wilson AJ, Voorhis WCV. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antim Agents Chemother.* 2001; 45: 1210-1215.

Buckner FS, Joubert BM, Boyle SM, Eastman RT, Verlinde CLMJ, Matsuda SPT. Cloning and analysis of *Trypanosoma cruzi* lanosterol 14 α -demetilase. *Mol Bioch Parasitol.* 2003; 132: 75-81.

Cammerer SB, Jimenez C, Jones S, Gros L, Lorente SO, Rodrigues C, Rodrigues JC, Caldera A, Ruiz Perez LM, da Souza W, Kaiser M, Brun R, Urbina JA, Gonzalez Pacanowska D, Gilbert IH. Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(11): 4049-4061.

Carrero-Lérida J, Pérez-Moreno G, Castilho-Acosta VM, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowskda D. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology.* 2009; 39 (3): 307-314.

Caldas I S, Talvani A, Caldas S, Carneiro C M, Lana M, Guedes PMM, Bahia MT. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load

but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitology Research*. Germany. 2008; 103: 413-421.

Cançado JR. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (eds.). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.399-405.

Carlier Y, Dias JC, Luquetti AO, Hontebeyrie M, Torrico F, Truyens C. Trypanosomíase americana ou maladie de Chagas. *Enciclopedia Médico-Chirurgicale*. 2002; 8: 505-520.

Carvalho FL, Aires DLS, Segunda ZF, de Azevedo CMPS, Corrêa RGCF, de Aquino DMC, Caldas AJM. Perfil epidemiológico dos indivíduos HIV positivo e infecção HIV-*Leishmania* em um serviço de referência em São Luís, MA, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2013; 18(5):1305-1312.

Castro SL, Soeiro MN. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>>. Acesso em: 29 nov. 2009.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909; 1:159–218 [in Portuguese].

Chieffi PP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: CLB Balieiro Editores; 2000.

Chow S.C. Immunomodulation by statins: mechanisms and potential impact on autoimmune diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2009; 57: 243–251.

Claborn DM. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. *J Glob Infect Dis*. May-Aug 2010; 2(2): 127–134.

Coppens I, Courtoy PJ. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:129–156.

Coura JR, Castro SL A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Brazil. 2002; 97: 3-24.

Coura JR, Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(1): 3-24.

Coura JR, Cançado JR. A história da terapêutica da doença de Chagas. Ministério da Saúde – Fiocruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=126>. Acesso em: 25/07/2009.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 3140.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010; 465: S6-S7.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends in Parasitology. 2003; 19: 502-508.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb A. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan; 19(1): 111-26.

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Rev. 2006; 123(3):357-388.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; pii:295394

De Souza W, Rodrigues JC. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. Interdiscip. Perspect Infect Dis. 2009; 642502.

Deane MP. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz 1979; A6A7.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol. 2003; 97(Supl. 1): 3-15.

Dias JC, Amato Neto V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(2): 68-72.

Dias E, Freitas Filho L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1945; 38: 427-436.

Dixon H, Ginger CD, Williamson J. Trypanosome sterols and their metabolic origins. Comparative biochemistry and Physiology. 1972; 41 (1): 1-18.

Docampo R, Schmunis G A. Sterol biosynthesis inhibitors: potential chemotherapeutics against Chagas disease. Parasitol. Today. 1993; 13: 129-130.

Estani SS. Efficacy of chemotherapy with benzonidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. United States. 1998; 59: 526-9.

Fagundes LJM. Estudo de esteróis e lipídeos totais em *Leptomonas pessoai* cultivada a 28°C e 37°C. M. S. thesis, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 1974.

Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Garin C, Isola E, Brenner RR, Rasmussen L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. Biochemical and Biophysical Research Communications. Feb 1990; 166 (3): 1441-5.

Fonseca FAH. Farmacocinética das estatinas. Arquivo Brasileiro de Cardiologia. 2005; 85(5): 9-14.

Frézard F, Demicheli C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. Expert Opin Drug Deliv. 2010 Dec; 7(12): 1343-58.

Furlaneto, L. Transformação genética de *Trypanosoma cruzi* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. 2006. Dissertação de doutorado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Galina I. Lepesheva and Michael R. Waterman. Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Curr Top Med Chem . 2011; 11(16): 2060–2071.

Garcia ES, Dvorak JA. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1982; 31: 59-262.

Gil LHS, Basano SA, Souza AA, Silva MGS, Barata I, Ishikawa EA, Camargo LMA et al. Recent observations on the sand fly (Diptera: *Psychodidae*) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davis* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 751-5.

Goad LJ, Keithley JS, Berman JD, Beach DH, Holz GG. The sterols of *Leishmania* promastigotes and amastigotes: possible implications for chemotherapy. In: Hart DT, editor. Leishmaniasis. New York, USA: Plenum; 1989. p. 495–501.

Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease what has been achieved? What remains to be done why regard to diagnosis and follow up studies?. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 115-121.

Gravelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996; 34: 257-72.

Goad LJ, Holz GG, Beach DH. Effect of the allylamine antifungal drug SF86-327 on the growth and sterol synthesis of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. *Biochem Pharmacol* 1985;34:3785–8.

Gros L, Castillo-Acosta VM, Jiménez C, Sealey-Cardona M, Vargas S, Manuel Estévez A, Yardley V, Rattray L, Croft SL, Ruiz-Perez LM, Urbina JA, Gilbert IH, González-Pacanowska D. New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. *Antimicrob, Agents Chemother.* 2006; 50(8): 2595–2601.

Haines, T. H. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog Lipid Res.* 2001; 40(4): 299-324.

Halevy S, Avivi L. Sterols of *trypanosomidae*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 1966; 60: 439-444.

Heath RJ, White SW, Rock CO. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res* 2001;40:467–97.

Irajhi 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; 346(12): 891-895.

Jansen-Franken AM. Ecologia da doença de Chagas. Fundação Oswaldo Cruz. 2013. Acesso em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=141>

Kavanagh KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, Rogers MJ, Russell RG, Oppermann U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(20):7829–3784.

Korn ED, Brand Tvon, Tobie EJ. The sterols of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 1969; 30(4):601610.

Kückelhaus CS, Kückelhaus SA, Muniz-Junqueira MI. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. Exp Parasitol. 2011 Mar; 127(3):658-64.

Lainson R, Shaw J J. Epidemiology and ecology of leishmaniosis in Latin-America. Nature. 1978; 273: 595-600.

Lainson R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections (9ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Revista Paraense de Medicina 1997; 11(1): 29-40.

Lauria-Pires L, Castro CN, Emanuel A, Prata A. Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1988; 21: 79.

Lazardi K, Urbina JA, de Souza. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34: 2097-2105.

Lazardi K, Urbina J A, Desouza W. Ultrastructural alterations induced by ICI-195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 1991. 35:736–740.

Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, Hill GC, Villalta F, Waterman MR. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. Chem Biol. 2007; 14(11):1283–1293.

Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, Hill GC, Villalta F, Waterman MR. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for

antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chem Biol.* 2007; 14(11):1283–1293.

Lepesheva GI, Villalta F, Waterman MR. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14alpha-demethylase (CYP51). *Adv Parasitol.* 2011; 75: 65-87.

Lepesheva GI, Park HW, Hargrove TY, Vanhollebeke B, Wawrzak Z, Harp J M, Sundaramoorthy M, Nes WD, Pays E, Chaudhuri M, Villalta F, Waterman MR. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14alpha-demethylase and implications for selective treatment of human infections. *J Biol Chem.* 2010; 285(3): 1773-80.

Lorente SO, Rodrigues JCF, Jime'nez Jime'nez C, Joyce-Menekse M, Rodrigues C, Croft SL, Yardley V, Luca-Fradley K de, Ruiz-Pe'rez LM, Urbina J, de Souza W, Pacanowska DG, Gilbert IH. Novel Azasterols as Potential Agents for Treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* Aug. 2004; 48(8): 2937–2950.

Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection *International Journal of Cardiology.* 2002; 86: 5–18.

Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104:81–91.

Luize PS, Tiuman TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez DAG, Mello JCP, Nakamura C V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005; 41.

Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI. Growth inhibition of *Candida species* and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiology Letters.* Sep 2006; 262(1): 9-13.

Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, Rodrigues JC, Braga MV, Yardley V, de Luca-Fradley K, Croft SL, de Souza W, Ruiz-Perez LM, Urbina J, Gonzalez Pacanowska D, Gilbert IH. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. J Med Chem. 2003; 46(22):4714–4727.

Magill AJ, Grogl M, Gasser RA Jr, Sun W, Oster CN. Visceral infection caused by *Leishmanmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. N. Engl. J. Med. 1993; 328: 383-7.

Magill AJ. Epidemiology of the leishmaniasis. Dermatoepidemiology. 1995;13:505–21.

Marsella R, Gopegui RR. Leishmaniasis, a re-emerging zoonosis. International Journal of Dermatology. Philadelphia. Nov 1998; 37(11): 801-14.

Marinho FA, Gonçalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, D`avila-Levy C M, Santos AL, Branquinho MH. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106 (4): 507-509.

Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, Bailey BN, Kendrick H et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. J Med Chem. 2001; 44: 909-916.

Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, Machin RP, López-Arencibia A, García-Castellano JM, Fuentes I de, Loftus B, Maciver SK, Valladares B, Piñero JE. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl–coenzyme A reductase and application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* Infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. January 2013; 57(1): 375–381.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. 2007; 1(2): e114.

Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tllez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., Amsterdam, 1997; 86: 101-10.

McCabe R. Failure of Ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. J Infect Dis. 1988; 158: 1408-1409.

Medina-lobes MD. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1998; 21: 151-153.

Mendonça S. Leishmaniose. Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ. 2009. Acesso em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>

Migone LE. Un caso de kala-azar a Assuncion. Bull Soc Path Exot. 1913; 6: 118-20.

Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção *Leishmania*-HIV. Brasília, 2004

Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the triazole derivative SHH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:150–5.

Molina J, Brener Z, Romanha AJ, Urbina JA. In vivo activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. May 2001; 47(5): 720-1.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin American and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (1): 17-30.

Moreira AAB, Souza HBWT, Amato Neto V, Matsubara L, Pinto PLS, Tolezano JE et al. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *T. cruzi*. Rev Inst Med trop São Paulo. 1992; 34: 177-180.

Morita YS, Paul KS, Englund PT. Specialized fatty acid synthesis in African trypanosomes: myristate for GPI anchors. Science. 2000; 288:140–3.

Muelas S, Suarez M, Perez R, Rodriguez H, Ochoa C, Escario JÁ, Gomez-Barrio A. In vitro and in vivo assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Mem.Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2002; 97(2): 269-272.

Mung'Ong' SG, Mugoyela VK, Hooper M, Croft S, Fairlamb AH. Activity of Novel Tryptophan Analogs against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. 2008; 11: 57-62

Nagappan V, Deresinski S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. Clin Infect Dis. 2007; 45:1610–1617.

Nes WD. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. Phytochemistry. 2003; 64(1):75–95.

Olivier L.M, Krisans SK. Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. Biochimica et Biophysica Acta. 2000; 1529(1-3): 89-102.

Orsini M, Canela JR, Disch J, Maciel F, Greco D, Toledo Junior A, et al. High frequency of asymptomatic *Leishmania spp.* infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, In press 2012.

Paul KS, Jiang D, Morita YS, et al. Fatty acid synthesis in African trypanosomes: a solution to the myristate mystery. Trends Parasitol. 2001;17: 381–7.

Pearson RD, Lareau SM, Jeronimo SM. Leishmaniasis at the end of the millennium. Curr. Infect. Dis. Rep. 1999; 1: 448-52.

Pellegrino J. Transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Primeiras comprovações sorológicas em doadores e candidatos a doadores. Revista Brasileira de Medicina. Brasil. 1949; 6: 297-301.

Peña-Díaz J, Montalvetti A, Flores CL. Mitochondrial localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the *Trypanosomatidae*. Molecular Biology of the Cell. 2004; 15(3): 1356-1363.

Perozzo R, Kuo M, Bir Singh Sidhu A, et al. Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl ACP reductase. J Biol Chem. 2002; 15:15.

Petrikkos G, Skiada A. Recent advances in antifungal chemotherapy. Int J Antimicrob Agents. 2007; 30:108–117.

Pintado V, Lopez-Velez R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001; 19(7): 353-357.

Puccetti L, Acampa M, Auteri A. Pharmacogenetics of statins therapy. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2007; 2(3):228–236.

Parquet V, Briolant S, Torrentino-Madamet M, Henry M, Almeras L, Amalvict R, Baret E, Fusaï T, Rogier C, Pradines B. Atorvastatin is a promising partner for antimalarial drugs in treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Mar 2009; 53(6): 2248-52. Epub 23

Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. Dermatol Clin. 2011 Jan; 29(1): 53-62.

Pessoa SM. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Rassi A, Rassi A Jr, Rassi SG, et al. Doença de Chagas. In: Lopes AC, Ed. Tratado de clínica médica, (2ed). São Paulo. Editora Roca, 2009. 4123-4134p.

Rey, Luis. Parasitologia .2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV coinfection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol. 2003; 97(1):17-28.

Rangal H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 2785–91.

Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, Urbina JA. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azolesusceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Dec 1996; 40(12): 2785-91. Erratum in: Antimicrob Agents Chemother. Feb. 1997; 41(2): 496.

Rassi A, Rassi Jr A, et al. Doença de Chagas. In: Lopes AC.. Tratado de clínica médica. (2 ed). São Paulo: Editora Roca, 2009. 4123-34p.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010; 375: 1388–402.

Rassi Jr A, Rassi A, de Rezende JM. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin N Am. 2012; 26: 275–291.

Rebêlo JMM. Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde) São Luis: Universidade Federal do Maranhão/ Ministério da Saúde; 1999.

Reiche EMV, Jankevicius JV. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 1997; 29: 29-40.

Roberts CW, McLeodm R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126(2): 129–142.

Rodríguez-Bonfante C, Amro A, García M, Mejías Wohlert LE, Guilln P, García RA.; Alvarez N, Días M, Cárdenas E, Castillo S, Bonfante-Garrido R, Bonfante-Cabarcas R. Epidemiology of Chagas disease in Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: triatominae infestation and human seroprevalence. *Cadernos de saúde pública.* 2007; 23: 1133-1140.

Santa-Rita RM, Barbosa HS, de Castro SL. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research.* Germany. Dec. 2006; 100(1): 187-90. Epub Jul 20 2006.

Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy.* Oct 2004; 54(4);, p. 704-10.. Epub 25 Aug 2004.

Santa-Rita RM, Barbosa HS, Meirelles MN, de Castro SL. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* Mar. 2000; 75(2): 219-28.

Santos RV, Coimbra JRCEA. Saúde e Povos Indígenas Rio de Janeiro: 1994. Ed. FIOCRUZ; 1994.

Schaller H. The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(3): 163-75.

Schroepfer Jr GJ. Sterol biosynthesis. *Annu Rev Biochem.*1981; 50: 585-621.

Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S, Ruiz-Pérez LM, Brun R, Ian H, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(6): 2123–2129.

Shikanai-Yassuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Barreto ACP, Higaki Y, Moreira AAB, Funayama G, Barone AA., Duarte A, Odone V, Cerri GC, Sato M, Posi D, Shiroma M. Doença de chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e respostas à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo.* 1991; 35: 16-27.

Sousa-Gomes ML, Maia-Elkhoury ANS, Pelissari DM, Lima Junior FEF, Sena JM, Cechinel MP. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2011; 20(4): 519-526.

Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin American. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(1): 93-101.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(1): 75-85.

Sieuwerds AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC-50-values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995; 33: 813-823.

Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, Fisher C, Voss A, Berman J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: E57-E61.

Soto J, Berman J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(1): S34-40.

Souraud JB, Briolant S, Dormoi J, Joel Mosnier J, Savini H, Baret E, Amalvict R, Soulard R, Rogier C, Pradines B. Atorvastatin treatment is effective when used in combination with mefloquine in an experimental cerebral malaria murine model. *Malaria Journal.* 2012; 11:13.

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch C.A. Chagas disease. Review. Postgrad. Med. J. 2006; 82: 788-798.

Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected na non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg. 2004, 70:201-209.

Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, Andrade Jr, HF, Antoniazzi MM, Jared C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. Toxicon. 2008 May; 52: 13–21.

Trocha PJ, Sprinson DB. Location and regulation of early enzymes of sterol biosynthesis in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1976; 174(1): 45-51.

Urbina JA, Lazard K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. Mevilonin (Lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against of *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo studies. Antimicrob agents Chemother. 1993; 37: 580-591.

Urbina JA, Vivas J, Lazard K, Molina J, Payares G, Piras MM, Piras R. Antiproliferative effects of delta 24 (25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. Chemotherapy. 1996. 42: 294-307.

Urbina JA. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology. 1997; 114: S91-9.

Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(7):1771–1777.

Urbina JA. Chemotherapy of Chagas disease. Curr. Pharm. Des. 2002 8: 287-295.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003; 19 (11):495–501.

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 1:39–48.

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the agent causative of Chagas disease. *Intern J Antimicrob Agents.* 2003. 21: 27-38.

Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2379-2387.

Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1): 311-8.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2010; 115(1–2):55–68.

Vanden Bossche H, Koymans L, Moereels H. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacol.* 1995; 67: 79-100.

Vannier-Santos M A, Urbina JA, Martiny A, Neves A, Desouza W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1995; 42: 337–346.

Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJO, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro,* 2001; 96: 1005-1011.

Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AC, Ramos-Garcia C, Armendáriz-Borunda J. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of animal model to study parasite tropism. *Parasitology Research*. Germany. 2003; 89: 480-486.

Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu. 1999; 2(2).

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Mar. 2009; 7(2): 157-63.

Waller RF, Reed MB, Cowman AF, et al. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J*. 2000; 19: 1794–802.

Weinrauch L, Livshin R, el-On J. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol*. 1987; 117(5):666–668.

WHO. World Health Organization. Chagas disease intervention development and implementation research: transfer to the WHO regional Office for Americas. 2001; 66. Disponível em: www.who.int/tdr/publications/new66/chags.htm. Acesso em janeiro de 2007.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis Control. 2007. Disponível em <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

WHO. World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series n°. 905, Geneva. 2002; 96 pp.

WHO. World Health Organization. Technical Report Series. Control of the Leishmaniasis, 2010.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet n°. 340. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010; 85(34): 334-36. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>

WHO. World Health Organization WHO report on neglected tropical diseases Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases._Geneva. 2010. Disponível em: http://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/en/

Wikhe K, Westermeyer C, Macreadie IG. Biological consequences of statins in *Candida* species and possible implications for human health. Biochemical Society Transactions. Dec 2007; 35(6): 1529-32.

Wong RP, Davis TM. Statins as potential antimalarial drugs: low relative potency and lack of synergy with conventional antimalarial drugs. Antimicrob Agents Chemother. Mar 2009; 53(5): 2212-4.

Zhou W, Cross GA, Nes WD. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. J Lipid Res. 2007; 48(3):665– 673.

Zonios DI, Bennet JE. Update on azole antifungals. Semin Respir Crit Care Med. 2008; 29:198– 210.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.558.53.3), intitulado "Estatinas como Coadjuvantes nos Tratamentos da Doença de Chagas e Leishmanioses", de autoria de **Kelly Cristina Rodrigues**, e de **Sérgio de Albuquerque** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06/10/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.558.53.3), entitled: "Estatinas como Coadjuvantes nos Tratamentos da Doença de Chagas e Leishmanioses", by **Kelly Cristina Rodrigues** and **Sérgio de Albuquerque**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 06, 2011.

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011.

Presidente da CEUA

Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretaria da CEUA

Maria Angélica Depiro