

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

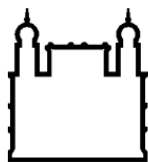
**Atividade da 2'-hidroxiflavanona em *Leishmania amazonensis*  
sensível e resistente ao antimônio e sua associação com fármacos  
de referência para o tratamento da leishmaniose**

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Rio de Janeiro

2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

**Atividade da 2'-Hidroxi-flavanona em *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao antimônio e sua associação com fármacos de referência para o tratamento da Leishmaniose**

Orientador: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Rio de Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Luiza Gervazoni Ferreira de

Atividade da 2'-Hidroxi-flavanona em *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao antimônio e sua associação com fármacos de referência para o tratamento da Leishmaniose / Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2016.

xiii, 66 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 56-66

1. Leishmaniose. 2. 2'-hidroxi-flavanona. 3. Quimioterapia. I. Título.

CDD 616.9364

**Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira**

**Atividade da 2'-Hidroxi-flavanona em *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao antimônio e sua associação com fármacos de referência para o tratamento da Leishmaniose**

**Orientador: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral**

**Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**Examinadores:**

---

**Dra. Solange Lisboa de Castro**

**FIOCRUZ**

---

**Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva**

**UERJ**

---

**Dra. Paula Mello de Luca**

**FIOCRUZ**

**Suplentes:**

---

**Dra. Márcia Cristina Paes**

**UERJ**

---

**Dra. Claudia Mansini d'Ávila Levy**

**FIOCRUZ**

**Rio de Janeiro**

**2016**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, sob orientação do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

## **Dedicatória**

Mais leve que o ar  
Tão doce de olhar  
Que nem um Adeus pode apagar  
(Caetano Veloso)

## Agradecimentos

Aos meus pais que tanto lutaram para que eu tivesse uma vida cheia de oportunidade e que pudesse aproveitá-las. Pelo amor e apoio em todas minhas escolhas.

Às amigas tão queridas Alessandra, Erika, Iane e Nathália por fazerem meus dias mais engraçados e felizes. Por todo amor, apoio, amizade e companheirismo.

Às amigas Maria Fernanda e Ingrid, pela amizade sincera nesses muitos anos de encontros e desencontros.

Aos queridos amigos do LBqT por esses 6 anos de convivência, respeito, amizade e felicidade. Por aprenderem a conviver com as minhas cantorias e maluquices e todo o bullying praticado no laboratório.

Às Dras. Leonor e Marilene por terem me recebido de braços abertos, sempre muito atenciosas e queridas, me elogiando e incentivando. É sempre uma honra ter vocês por perto e conhecer cada dia mais a jornada de vocês e me inspirar cada vez mais a seguir esse caminho. São grandes exemplos que eu levarei a vida toda.

Ao Valter e ao Edézio que foram essenciais na minha entrada e jornada no mestrado, pelo grande carinho, sempre dispostos a ajudar nos experimentos, nos estudos, sendo grandes exemplos nessa carreira tão difícil.

À Gabizinha que tanto me ajudou nessa reta final nos experimentos, se tornando uma grande amiga e companheira, em quem eu vejo um futuro brilhante e me orgulho de ter podido fazer parte desse grande começo. Você vai longe, tenho certeza.

À Giovanna, Yago e Job, meus irmãos científicos, por toda paciência, amizade e pela ajuda nas horas de correria.

À Thais e a Juliana pelo incentivo e amizade sincera, força nas horas difíceis, fofocas nas horas fáceis, roubos de comida e apertões, mas principalmente pela alegria.

À Mariela, que mesmo de longe, acompanhou de perto todos os perrengues sucessos, sendo amiga fiel, incentivadora, exemplo de dedicação e respeito, além da alegria e lição de vida altruísta.

À Capes, CNPq, FAPERJ e IOC/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

À pós-graduação pela oportunidade e apoio.

Aos membros da banca pela honra de poder aprender com cada sugestão e correção que possam trazer à dissertação.

Ao Dr. Caio não só pela revisão da dissertação, mas por todo o carinho e atenção nesses anos todos. Por incentivar e compartilhar o gosto por imuno e se preocupar mesmo eu não sendo sua aluna.

Por fim, mas não menos importante, ao meu orientador Elmo por sempre depositar sua confiança em mim. Pelo apoio nos momentos mais difíceis. Pelos ensinamentos, esporros, elogios e por embarcar nas minhas ideias. Por ser um orientador/pai, proporcionando o

conhecimento dos limites de ambos, onde cresce a cada dia mais o respeito, a confiança e o carinho.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Atividade da 2'-hidroxiflavanona em *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao antimônio e sua associação com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose

#### Dissertação de Mestrado

Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira

## Resumo

A leishmaniose é uma doença que merece atenção, devido à grande variedade de manifestações clínicas associadas e a sua elevada incidência anual. A pesquisa de novos medicamentos a partir de fontes naturais tem sido bem sucedida na detecção de compostos para o tratamento de algumas doenças parasitárias. Compostos puros obtidos de plantas possuem significativa atividade antiprotozoários. A 2'-hidroxiflavanona, é um flavonoide da classe das flavanonas, atualmente conhecido por sua atividade em células tumorais. Neste estudo, avaliou-se as propriedades ADMET *in silico* e a atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* da 2'-hidroxiflavanona, seu efeito em combinação com fármacos de referência e em células resistentes ao antimônio. Promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de 2'-hidroxiflavanona (3-96  $\mu\text{M}$ ) por 3 e 24 h, demonstrando uma inibição de forma dose-dependente, com um  $\text{IC}_{50}$  de 21,59 e 20,96  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para investigar dano mitocondrial, promastigotas foram tratadas com 2'-hidroxiflavanona durante 24 h, incubadas com JC-1, e observou-se uma diminuição acentuada no potencial de membrana mitocondrial. Sabe-se que dano mitocondrial pode levar a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os níveis de ROS aumentaram 1,76 vezes em relação ao controle quando tratadas com 96  $\mu\text{M}$ . A pré-incubação de promastigotas de *L. amazonensis* com enzimas e moléculas antioxidantes não protegem as células da inibição promovida pela 2'-hidroxiflavanona. Para avaliar atividade anti-mastigota, macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram incubados com diferentes concentrações de 2'-hidroxiflavanona durante 72 h, mostrando um decréscimo dose-dependente no índice de infecção com um  $\text{IC}_{50}$  de 3,38  $\mu\text{M}$ . A toxicidade para os macrófagos também foi testada, apresentando um índice de seletividade de 21,31. A 2'-hidroxiflavanona demonstrou não violar as Regras de Lipinski demonstrando boas propriedades ADMET na avaliação *in silico*. No estudo *in vivo* a 2'-hidroxiflavanona demonstrou ser capaz de diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária em comparação ao controle e o fármaco de referência. A associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência demonstrou ter um efeito aditivo. *L. amazonensis* resistentes ao antimônio foram testadas com concentrações de 2'-hidroxiflavanona (3- 96 $\mu\text{M}$ ) exibindo um  $\text{IC}_{50}$  de 24,84 $\mu\text{M}$ , perto do  $\text{IC}_{50}$  de células sensíveis ao antimônio. Juntos, os resultados *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, sua associação e efeito em células resistentes, sugerem a 2'-hidroxiflavanona como uma boa possibilidade à quimioterapia da leishmaniose.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **2'- Hidroxiflavanona activity in *Leishmania amazonensis* antimony sensitive and resistant and it's association with reference drugs for the treatment of Leishmaniasis**

**Luiza Gervazoni Ferreira de Oliveira**

### **Abstract**

Leishmaniasis is a disease that deserves attention due to the wide variety of associated clinical manifestations and its high annual incidence. The search for new drugs from natural sources has been successful in detecting compounds for the treatment of certain parasitic diseases. Pure compounds obtained from plants have significant antiprotozoal activity. The 2'-hydroxyflavanone is a flavonoid class of the flavanones, currently known for their activity in tumor cells. This study evaluated the ADMET property *in silico* the leishmanicidal activity *in vitro* and *in vivo* of 2'-hydroxyflavanone, its effect in combination with reference drugs and parasites resistant to antimony. Promastigotes were treated with different concentrations of 2'-hydroxyflavanone (3-96  $\mu\text{M}$ ) for 3 and 24 h, demonstrating a dose-dependent manner inhibition with an  $\text{IC}_{50}$  of 21.59  $\mu\text{M}$  and 20.96  $\mu\text{M}$ , respectively. To investigate mitochondrial damage, promastigotes were treated with 2'-hydroxyflavanone for 24 hours, incubated with JC-1, and there was a marked decrease in mitochondrial membrane potential. It is known that mitochondrial damage can lead to an increase in reactive oxygen species (ROS). ROS levels increased 1.76 times compared to the control when treated with 96  $\mu\text{M}$ . *L. amazonensis* promastigote preincubation with enzyme and antioxidant molecules did not protect cells promoted inhibition by 2'-hydroxyflavanone. To assess the activity antiamastigota, macrophages infected with *L. amazonensis* were incubated with different concentrations of 2'-hidroxiflavanona for 72 h, showing a dose-dependent decrease in the rate of infection with an  $\text{IC}_{50}$  of 3.38  $\mu\text{M}$ . The toxicity for macrophages was also tested, with a selectivity index of 21.31. The 2'-hydroxyflavanone demonstrated not violate Lipinsks Rules demonstrating good ADMET properties evaluation *in silico*. In the *in vivo* study 2'-hydroxyflavanone has been shown to decrease lesion size and the parasitic load in comparison to the control and the reference drug. The association of 2'-hydroxyflavanone with reference drugs have demonstrated an additive effect. *L. amazonensis* antimony resistant were tested at concentrations of 2'-hydroxyflavanone (3- 96  $\mu\text{M}$ ) exhibiting an  $\text{IC}_{50}$  of 24.84  $\mu\text{M}$  near the  $\text{IC}_{50}$  of sensitive antimony and potassium tartrate cells. Together, the results *in vitro*, *in silico* and *in vivo*, and their association made in resistant cells, suggest the 2'-hydroxyflavanone as a good chance to chemotherapy of leishmaniasis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1	Leishmaniose .....	1
1.1.1	Agente etiológico, transmissão e ciclo biológico.....	1
1.1.2	Manifestações clínicas .....	5
1.1.2.1	Leishmaniose Cutânea (LC).....	6
1.1.2.2	Leishmaniose Mucosa (LM) .....	6
1.1.2.3	Leishmaniose Cutâneo-difusa (LCD).....	8
1.1.2.4	Leishmaniose Visceral ou Calazar (LV) .....	9
1.1.2.5	Leishmaniose Dérmica pós-calazar (LDPC).....	9
1.1.3	Epidemiologia .....	10
1.1.4	Tratamento .....	12
1.1.4.1	Antimoniais pentavalentes.....	12
1.1.4.2	Anfotericina B.....	13
1.1.4.3	Pentamidina .....	14
1.1.4.4	Miltefosina.....	15
1.1.4.5	Paramomicina.....	15
1.1.5	Novas alternativas quimioterápicas.....	16
1.1.5.1	Produtos naturais e Flavonóides .....	17
1.1.5.1.1	2'-hidroxiflavanona .....	18
1.1.5.2	Terapia Combinada .....	19
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>21</b>
2.1	Objetivo Geral .....	21
2.2	Objetivos específicos .....	21
<b>3</b>	<b>Metodologia .....</b>	<b>22</b>
3.1	Reagentes .....	22
3.2	Manutenção de Parasitos.....	22
3.3	Animais.....	22
3.4	Ensaio <i>in vitro</i> .....	23
3.4.1	Atividade antipromastigota da 2'-hidroxiflavanona.....	23
3.4.2	Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	23
3.4.3	Mensuração de espécies reativa de oxigênio (ROS) .....	23
3.4.4	Estudo do efeito de antioxidantes no tratamento com 2'-hidroxiflavanona .....	24
3.4.5	Atividade anti-mastigota da 2'-hidroxiflavanona.....	24
3.4.6	Avaliação da citotoxicidade da 2'-hidroxiflavanona .....	25
3.4.7	Efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	25

3.4.8	Análise Isobolográfica .....	26
3.4.9	Efeito da 2'-hidroxiflavanona em <i>Leishmania amazonensis</i> tartarato de antimônio e potássio-resistentes (SbIII) .....	26
3.5	Ensaio <i>in silico</i> da 2'-hidroxiflavona .....	26
3.6	Ensaio <i>in vivo</i> .....	27
3.6.1	Atividade <i>in vivo</i> da 2'-hidroxiflavanona .....	27
3.6.2	Quantificação da carga parasitária .....	27
3.6.3	Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos .....	28
3.7	Análises estatísticas .....	28
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>29</b>
4.1	Ensaio <i>in vitro</i> e mecanismo de ação .....	29
4.1.1	Atividade antipromastigota da 2'-hidroxiflavanona .....	29
4.1.2	Determinação do Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	30
4.1.3	Mensuração de espécies reativa de oxigênio (ROS) .....	31
4.1.4	Estudo do efeito de antioxidantes no tratamento com 2'-hidroxiflavanona .....	33
4.1.5	Atividade antiastigota da 2'-hidroxiflavanona .....	34
4.1.6	Avaliação da citotoxicidade da 2'-hidroxiflavanona .....	35
4.2	Ensaio <i>in silico</i> .....	38
4.3	Ensaio <i>in vivo</i> .....	40
4.4	Efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	43
4.5	Efeito da 2'-hidroxiflavanona em <i>Leishmania amazonensis</i> tartarato de antimônio e potássio-resistentes .....	47
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>56</b>

## Lista de figuras

Figura 1.1 Taxonomia da família Trypanosomatidae.....	2
Figura 1.2: Esquema das formas de Leishmania.....	3
Figura 1.3: (a) Lutzomyia, Novo Mundo; (b) Phlebotomus, Velho Mundo.....	3
Figura 1.4: Ciclo biológico da Leishmania.....	4
Figura 1.5: Manifestações clínicas da Leishmaniose cutânea .....	8
Figura 1.6: Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.....	9
Figura 1.7 Distribuição da Leishmaniose Visceral ao redor do mundo .....	11
Figura 1.8 Estrutura básica de um flavonóide e seus subgrupos.....	18
Figura 1.9 Estrutura química da 2'-hidroxiflavanona.....	19
Figura 4.1 Efeito da 2'-hidroxiflavanona na proliferação celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	29
Figura 4.2 Efeito da 2'-hidroxiflavanona na proliferação celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	30
Figura 4.3 Avaliação do Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em <i>L. amazonensis</i> tratada com 2'-hidroxiflavanona.....	31
Figura 4.4 Formação de espécies reativas de oxigênio.....	32
Figura 4.5 Formação de espécies reativas de oxigênio.....	33
Figura 4.6 Correlação linear .....	33
Figura 4.7 Efeito de enzimas antioxidantes em <i>L. amazonensis</i> tratadas com 2'-hidroxiflavanona. ....	34
Figura 4.8 Atividade anti-mastigota da 2'-hidroxiflavanona .....	35
Figura 4.9 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em macrófagos peritoneais murinos .....	36
Figura 4.10 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	37
Figura 4.11 Efeito in vivo da 2'-hidroxiflavanona.....	41
Figura 4.12 Isobogramas gerados a partir dos valores de $IC_{50}$ e $IC_{90}$ obtidos da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose.....	45
Figura 4.13 Isobogramas gerados a partir do valor de $FICI_{50}$ e $FICI_{90}$ obtidos a partir da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose .....	46
Figura 4.14 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em células Tartarato de antimônio e potássio – resistentes.....	47

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.1: Principais espécies e distribuição relacionados às manifestações clínicas da Leishmaniose .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabela 1.2 Taxa de novos casos da Leishmaniose Tegumentar no Brasil por região de 2008 a 2012.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabela 1.3 Taxa de novos casos da Leishmaniose Visceral no Brasil por região de 2008 a 2012.</b>	<b>12</b>
<b>Tabela 4.1: Índice de seletividade da 2'-hidroxiflavanona .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 4.2: Propriedades ADMET da 2'-hidroxiflavanona .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 4.3: Regra dos 5 de Lipinski da 2'-hidroxiflavanona .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 4.4 Resultados dos testes Hematológicos e Bioquímicos.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 4.5 IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona e dos fármacos de referência.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4.6 FICI<sub>50</sub> e FICI<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona em combinação com os fármacos de referência .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4.7 Média do somatório de FICI<sub>50</sub> e FICI<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona em combinação com fármacos de referência.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 4.8 Comparação entre IC<sub>50</sub> de células -sensíveis e -resistentes tratadas com 2'-hidroxiflavanona por 24horas .....</b>	<b>47</b>

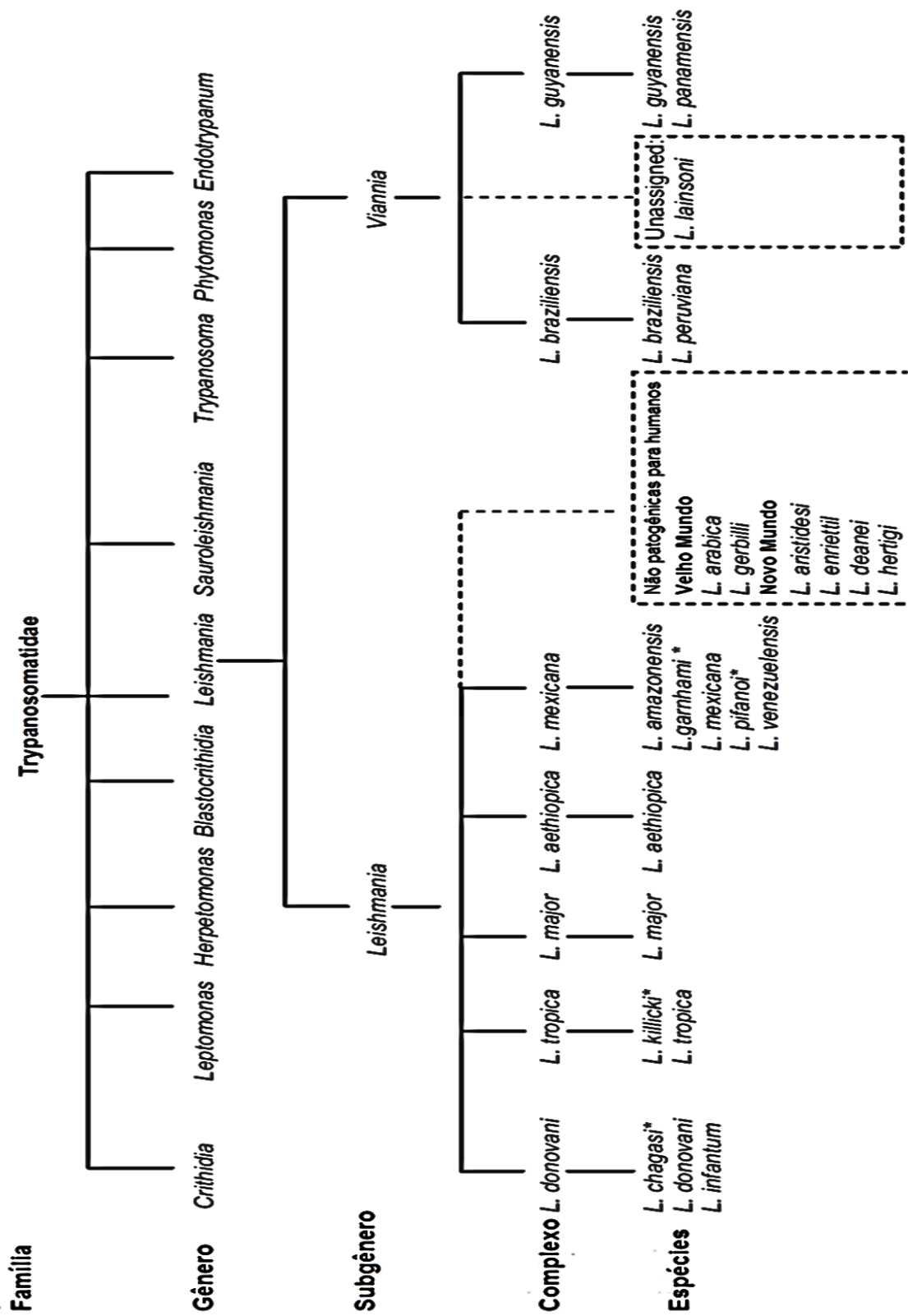
# 1 Introdução

## 1.1 Leishmaniose

### 1.1.1 Agente etiológico, transmissão e ciclo biológico

Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença negligenciada, a leishmaniose é causada por mais de 20 espécies conhecidas de parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes a família Trypanosomatidae, classe Kinetoplastida (Alvar e cols, 2012). Esta ordem é caracterizada pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, que contém parte do DNA mitocondrial do parasito compactado em mini e maxicírculos (Stuart e cols, 2008). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros onde estão classificadas as espécies causadoras das leishmanioses (Figura 1.1): o subgênero *Leishmania*, descrito por Ross em 1903, e o subgênero *Viannia*, descrito por Lainson e Shaw em 1987 (Lainson, 2010). Além da leishmaniose, outros parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae como o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma brucei*, são estudados por causarem doenças como a doença de Chagas e a tripanossomíase africana (conhecida popularmente como doença do sono), respectivamente (Nagle e cols, 2014).

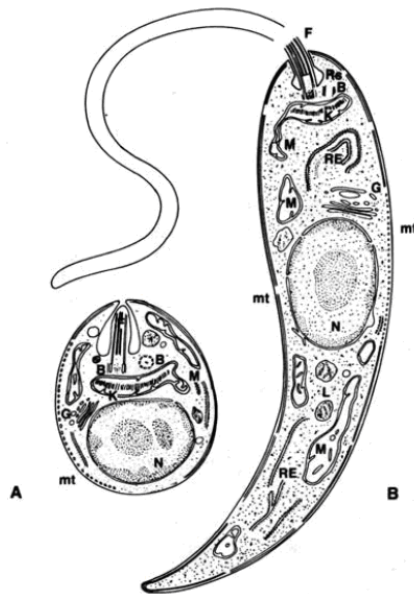
O ciclo biológico de *Leishmania* spp. é heteroxênico, dividido em dois hospedeiros, um invertebrado e outro vertebrado (Jain e Jain, 2013). Dentre os hospedeiros vertebrados estão os humanos, roedores, cães e marsupiais. Os hospedeiros invertebrados são os flebotomíneos, insetos hematófagos, vetores da doença. Os parasitos do gênero *Leishmania* se apresentam então sob duas formas: a forma promastigota, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, caracterizada por uma forma alongada, medindo cerca de 12 x 2µm, cinetoplasto anterior ao núcleo e um único flagelo livre localizado na bolsa flagelar, na posição anterior da célula. E a amastigota, forma intracelular, encontrada principalmente nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado, medindo cerca de 2-4 µm, caracterizada por uma forma arredondada e pelo flagelo interiorizado (Vannier-Santos e cols, 2002; Neves, 2005). (Figura 1.2).



\* Status de espécies está em discussão. *L. chagasi* no Novo Mundo é a mesma espécie de *L. infantum*

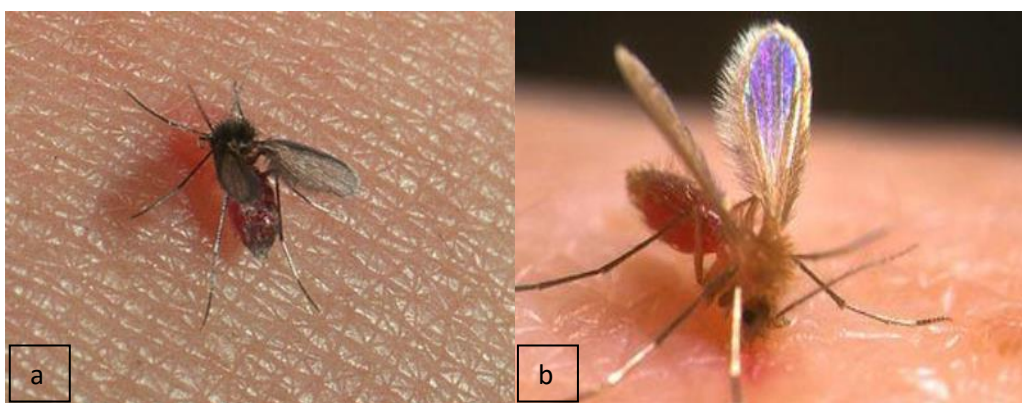
Figura 1.1 Taxonomia da família Trypanosomatidae. Ênfase no gênero *Leishmania* e seus subgêneros. OMS, 2010





**Figura 1.2:** Esquema das formas de *Leishmania*: (A) Amastigota; (B) Promastigota; (Rey, 2005)

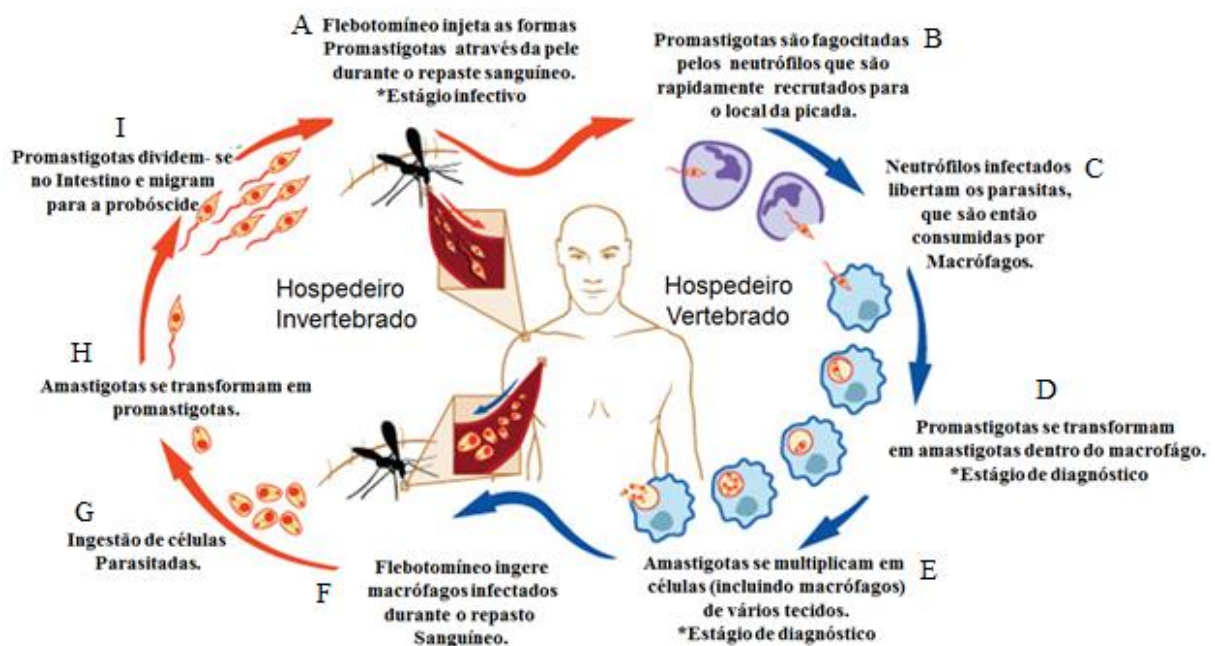
O vetor responsável pela transmissão da doença, o flebotomíneo, pertence à subfamília Phlebotominae, família Psychodidae, ordem Diptera. Popularmente são chamados de mosquito palha ou birigui, variando de acordo com a região. Esses insetos possuem de 2 a 3mm de tamanho e a transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada, pois só a fêmea é hematófaga. São conhecidos dois gêneros de flebotomíneos que transmitem *Leishmania* para humanos: *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Figura 1.3a e 1.3b, respectivamente) (Shukla e cols, 2010).



**Figura 1.3:** (a) *Lutzomyia* sp, Novo Mundo; (b) *Phlebotomus* sp, Velho Mundo.

Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>

A transmissão da doença se inicia quando a fêmea do inseto vetor, infectada, realiza seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, inoculando na pele formas promastigotas que, por sua vez, serão fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos (Figura 1.4 A - C). Dentro dos macrófagos infectados, as promastigotas são encontradas nos vacúolos parasitóforos, onde se diferenciam em amastigotas (D). Já diferenciadas, as amastigotas se multiplicarão por divisão binária o que provocará a lise da célula hospedeira, propagando assim a infecção para as células adjacentes (E) (Sacks e cols, 2001; Vannier-Santos e cols, 2002). A continuação do ciclo se dá quando outro flebotomíneo, realizando seu repasto, suga o sangue do hospedeiro vertebrado contendo células infectadas com amastigotas (F - G). Conforme a migração dessa mistura para o intestino do flebótomo, as células infectadas vão sofrendo lise, liberando as formas amastigotas que se diferenciam em promastigotas, inicialmente procíclicas (forma não infectiva) (H). Estas se multiplicam de maneira logarítmica e se diferenciam em promastigotas metacíclicas (forma infectiva) quando alcançam a fase estacionária. As promastigotas metacíclicas então migram para a probóscide do inseto, podendo causar outra infecção no próximo repasto, reiniciando assim o ciclo biológico do parasito (I).



**Figura 1.4: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.** A-I; B-E: etapas que ocorrem no hospedeiro vertebrado; F-A: etapas que ocorrem no hospedeiro invertebrado (Adaptado de <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>)

A metaciclógênese é um processo onde a promastigota procíclica passa por transformações morfológicas de tamanho e forma, além do comprimento do flagelo. Outras

alterações são o aumento da expressão de LPGs (lipofosfoglicanos, moléculas presentes na superfície de *Leishmania*), além do aumento da expressão da gp63, metaloprotease também encontrada na superfície do parasito. Essa transformação a torna mais apta para que possa escapar do sistema imune do hospedeiro e obter sucesso na infecção (Muskus e Marin Vila, 2002).

Ainda nos primeiros estágios da infecção em hospedeiros vertebrados os neutrófilos parecem desempenhar um papel de extrema importância. Por serem células da resposta inata do sistema imune, são as primeiras a chegarem ao sítio de infecção, sendo então, uma das primeiras células parasitadas ainda na pele. Estes neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados por macrófagos e células dendríticas, impedindo o disparo do sistema imune e facilitando a infecção dessas células (Ribeiro-Gomes e cols, 2012; Feijó e cols, 2015). Ribeiro-Gomes e cols. (2015) sugerem ainda que não só os neutrófilos são importantes para a manutenção da infecção, mas também as células dendríticas (DCs). Estudos em infecção de *L. major* demonstram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por DCs é capaz de desativar via sinalização a capacidade das DCs de apresentarem antígenos, impedindo assim o reconhecimento da infecção nos seus primeiros estágios. Esta desativação ajuda a “esconder” o início da infecção, retardando o acionamento do sistema imune e prejudicando a resposta adquirida. Esse processo de evasão vem sendo chamado de “Coelho de Tróia”.

Estudos em modelo murino sugerem que a infecção por leishmania pode desencadear tanto uma resposta imune do tipo Th1, quanto do tipo Th2, sendo a primeira relacionada a resistência/resolução à doença e a segunda, com a susceptibilidade/progressão (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014). As principais células efetoras são os próprios macrófagos infectados que, uma vez ativados por células T CD4<sup>+</sup> Th1, através da produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , passam a sintetizar subprodutos tóxicos como o óxido nítrico, que é capaz de eliminar as amastigotas. Já a resposta Th2 se dá pela produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que desativam os macrófagos e ativam a produção de anticorpos, que não são suficientemente efetores no controle da doença (Piscopo e Mallia, 2006).

### **1.1.2 Manifestações clínicas**

As leishmanioses são conhecidas por desencadear uma variedade de manifestações clínicas, que vão de pequenas lesões cutâneas a problemas sistêmicos fatais. Esta variedade é subdividida em dois grupos: a leishmaniose tegumentar, que acomete a pele e as mucosas; e a leishmaniose visceral - forma mais grave da doença, podendo levar ao óbito - que acomete as

vísceras, principalmente o baço, fígado e a medula óssea. A leishmaniose tegumentar pode ser subdividida em: cutânea, mucosa e cutâneo-difusa (Neuber, 2008). Cada manifestação clínica está diretamente relacionada a alguns fatores importantes como a espécie do parasito inoculado e também a resposta imune do hospedeiro (Nagle e cols, 2014) (Tabela 1.1).

#### 1.1.2.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

Forma mais comum da doença, se inicia com o desenvolvimento de uma pápula avermelhada (de 5-10 mm inicialmente) no local da inoculação. Geralmente a lesão encontra-se exposta no corpo (rosto, braços e pernas) e pode evoluir para placas eritematosas, nódulos, chegando a úlceras com borda levantada e granulações grosseiras (David e Craft, 2009). A evolução das lesões da LC está diretamente relacionada com a espécie e o sistema imune do hospedeiro. Seu período de incubação é de 2 semanas podendo chegar a 3 meses. Considerada auto resolutive, a LC pode levar de 3 meses a 2 anos para alcançar a cura espontânea (> 90% dos casos). (Piscopo e Malila, 2006; Goto e Lindoso, 2010).

As principais espécies causadoras da LC são: *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, do velho mundo; *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, do novo mundo (Murray e cols, 2005; Goto e Lindoso, 2010). Pulimood e cols. (2012), demonstra, ainda, *L. donovani* encontrada em biópsias de lesões crônicas de LC no Sri Lanka.

#### 1.1.2.2 Leishmaniose Mucosa (LM)

Caracterizada por causar lesões destrutivas em mucosas, a LM pode ser observada em meses ou até anos após o surgimento de uma lesão de LC (Nagle e cols, 2014). Os sintomas iniciais são inflamação nasal, febre, hepatomegalia e linfadenopatia. A lesão provocada pela LM começa com pequenas ulcerações podendo chegar a uma perfuração lenta, porém completa de todo o septo. A lesão pode ainda se estender para a face, palato, laringe e faringe, atingindo toda a mucosa oronasofaríngea. Embora a LM também não seja letal, assim como a LC, há uma preocupação maior em seus casos. Mesmo não havendo ameaça direta à vida, as lesões causadas pela LM podem levar a problemas secundários como infecções, problemas odontológicos e até mesmo alimentares, deixando o paciente em sérios riscos.

A espécie predominantemente causadora da LM é a *L. (V) braziliensis* porém, outras espécies podem desencadeá-la, como a *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (Goto e Lindoso, 2010).

Tabela 1.1: Principais espécies e distribuição relacionados às manifestações clínicas da leishmaniose

Espécies	Manifestação Clínica	Epidemiologia
<i>L. donovani</i>	Leishmaniose Visceral	Índia, Bangladesh, Nepal, África. 300 mil novos casos por ano, com a Índia tendo os maiores índices. 40 mil mortes anualmente.
<i>L. infantum</i>	Leishmaniose Visceral	Região do Mediterrâneo, América do Sul e Central. Reservatório animal primário: cão.
<i>L. siamensis</i>	Leishmaniose Visceral	Tailândia
<i>L. donovani</i>	Leishmaniose Dérmica pós Calazar	Leste da África (Sudão), Bangladesh, e Nepal. Ocorre em 50-60% de sudaneses e 10-20% de pacientes indianos com 0,5 - 7 anos de infecção.
<i>L. aethiopica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. turanica</i>	Leishmaniose Cutânea	Sul da Europa, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e África. 0.7 a 1.2 milhões de casos por ano com Um significativo número de indivíduos infectados residindo no Afeganistão, Argélia, Irã, Síria e Etiópia.
<i>L. amazonensis</i> <i>L. aristedesi</i> <i>L. brasiliensis</i> <i>L. colombiense</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. shawi</i> <i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniose Cutânea	América do Sul e Central. Significativo número de indivíduos infectados Residindo no Brasil, Colômbia, Costa Rica e Peru. Pacientes infectados incluem militares, Pessoas que fizeram viagens internacionais e migrantes de áreas endêmicas.
<i>L. aethiopica</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>	Leishmaniose Mucosa	Etiópia e América do Sul e Central.

Tabela traduzida e adaptada de Nagle e cols, 2014 correlacionando espécie, manifestações clínicas e epidemiologia da Leishmaniose;

### 1.1.2.3 Leishmaniose Cutâneo-Difusa (LCD)

Considerada uma manifestação rara da LC, é caracterizada por nódulos disseminados não ulcerativos, lesões ricas em parasitos e uma resposta celular parasito-específica ineficaz do sistema imune. As lesões da LCD se encontram localizadas frequentemente nas mãos, rosto e pés, podendo ser encontrada também nas nádegas (Bari, 2012).

As espécies relacionadas com a LCD são *L. mexicana* e *L. amazonensis* no novo mundo e *L. aethiopica* no velho mundo. No Brasil, a espécie associada à LCD é a *L. amazonensis*. Evidências apontam que *L. amazonensis* é capaz de interferir no sistema imune, impedindo algumas resposta celulares à infecção, levando a uma anergia celular, propiciando então a evolução da LCD (Goto e Lindoso, 2010; Ministério da Saúde, 2007). Embora haja certa anergia na resposta mediada por células, o sistema imune é capaz de ativar a resposta secretória, produzindo altos níveis de anticorpos e citocinas do tipo Th2, como a IL-10. Com essa desorganização imune a resposta ao tratamento é precária, quase nula, levando as lesões a serem recidivas (Bari, 2012; Ministério da Saúde, 2007).



**Figura 1.5: Manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar:** A- Cutânea localizada; B- Mucosa; C- Cutâneo-difusa (Ministério da Saúde, 2006; OMS, 2009)

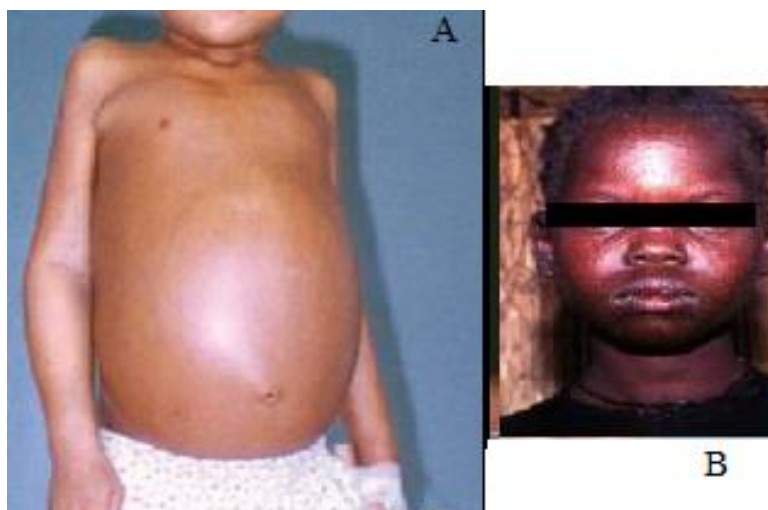
#### 1.1.2.4 Leishmaniose Visceral ou Calazar (LV)

Manifestação de evolução crônica, a LV é responsável pelo acometimento sistêmico, levando o paciente ao óbito em 90% dos casos. É conhecida como calazar, esplenomegalia tropical ou febre de dum dum (Ministério da saúde, 2014). As manifestações clínicas geralmente aparecem de 2 a 6 meses após a infecção e o paciente pode apresentar febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia e perda de peso (Nagle e cols, 2014).

As espécies envolvidas na LV pertencem ao complexo donovani, sendo *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo, e *L. infantum* (Syn. *L. chagasi*) no novo mundo (Lukes, 2007).

#### 1.1.2.5 Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC)

Manifestação do ponto de vista mundial rara, tida como uma sequela ou recidiva de uma LV causada por *L. donovani*, que teve sucesso em sua cura. Estima-se que na Índia ela ocorra em 20% dos pacientes curados de LV, ocorrendo cerca de 1 a 2 anos após o tratamento, podendo persistir a 20 anos (Bari, 2012). A LDPC se apresenta como máculas/pápulas eritematosas que geralmente surgem pelo rosto, podendo chegar ao corpo todo. Por serem lesões tegumentares, parasitos são encontrados nas lesões, transformando o paciente em um reservatório passível de transmissão da doença. Excepcionalmente pode ocorrer em pacientes que não apresentam LV em seu histórico (Griesven e Diro, 2012).



**Figura 1.6: Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral:** A- Leishmaniose visceral ou calazar; B- leishmaniose dérmica Pós-Calazar (Ministério da Saúde, 2006; OMS, 2009);

### 1.1.3 Epidemiologia

As doenças tropicais negligenciadas, DTNs, são um grupo diverso de doenças transmissíveis em condições tropicais e subtropicais, afetando 149 países e mais de um bilhão de pessoas (OMS, 2016). Os mais afetados pertencem a populações que vivem na pobreza, com ínfimas condições sanitárias e em contato com vetores ou reservatórios. Dentre as DTNs podemos destacar a leishmaniose, doença de Chagas, dengue, doença do sono ou tripanossomíase africana, malária, esquistossomose, filariose entre outras.

Considerada uma das doenças mais negligenciadas, a leishmaniose está presente em 98 países, existindo o risco de endemia nos 5 continentes, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas e 300 milhões de pessoas em risco. (DNDi, 2013; OMS, 2016). Estima-se um número de 60.000 casos totais para leishmaniose visceral e 300.000 casos para leishmaniose cutânea e mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar e cols, 2012). Comparada com a LV, a LC é mais amplamente distribuída pelo mundo, tendo 70 a 75% de sua distribuição concentrada em 10 países sendo eles, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (Alvar e cols, 2012). Na Figura 1.7 podemos ver a endemicidade da leishmaniose no mundo.

Na América Latina, 90 % dos casos reportados entre 1979 e 2009 ocorreram no Brasil. A incidência anual das leishmanioses no país é de 1,58 (visceral) e 11,86 (cutânea) a cada 100.000, sendo que, somente 45.402 de 700.000 casos, foram hospitalizados (Mistro e cols, 2016). Na Tabela 1.2 e 1.3 podemos observar os dados do período entre 2008 e 2012 de novos casos notificados de leishmaniose tegumentar e visceral, respectivamente, fornecidos pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2012).

Comparando as tabelas, observamos que a incidência principal da leishmaniose está concentrada nas regiões Norte e Nordeste, sendo a primeira de maior incidência de LT e a segunda, de LV. Observando ainda os dados do Ministério da Saúde por Estado, podemos observar que em cada região, a incidência maior de LV e LT não se sobrepõe em sua maioria. Na Região Norte, por exemplo, a maior incidência de LT é no Acre, enquanto LV é em Tocantins. Na Região Nordeste, LT tem sua alta no Maranhão enquanto a LV, no Piauí. Já na Região Sudeste, a LT é mais incidente no Espírito Santo enquanto a LV é mais incidente em Minas Gerais. Na região Centro-Oeste, a LT está concentrada no Mato Grosso, enquanto a LV está no Mato Grosso do Sul. A única região que vemos uma sobreposição de maior incidência tanto da LT quanto da LV é na região Sul, onde a maior incidência das leishmanioses é encontrada no Paraná (Ministério da Saúde, 2012).



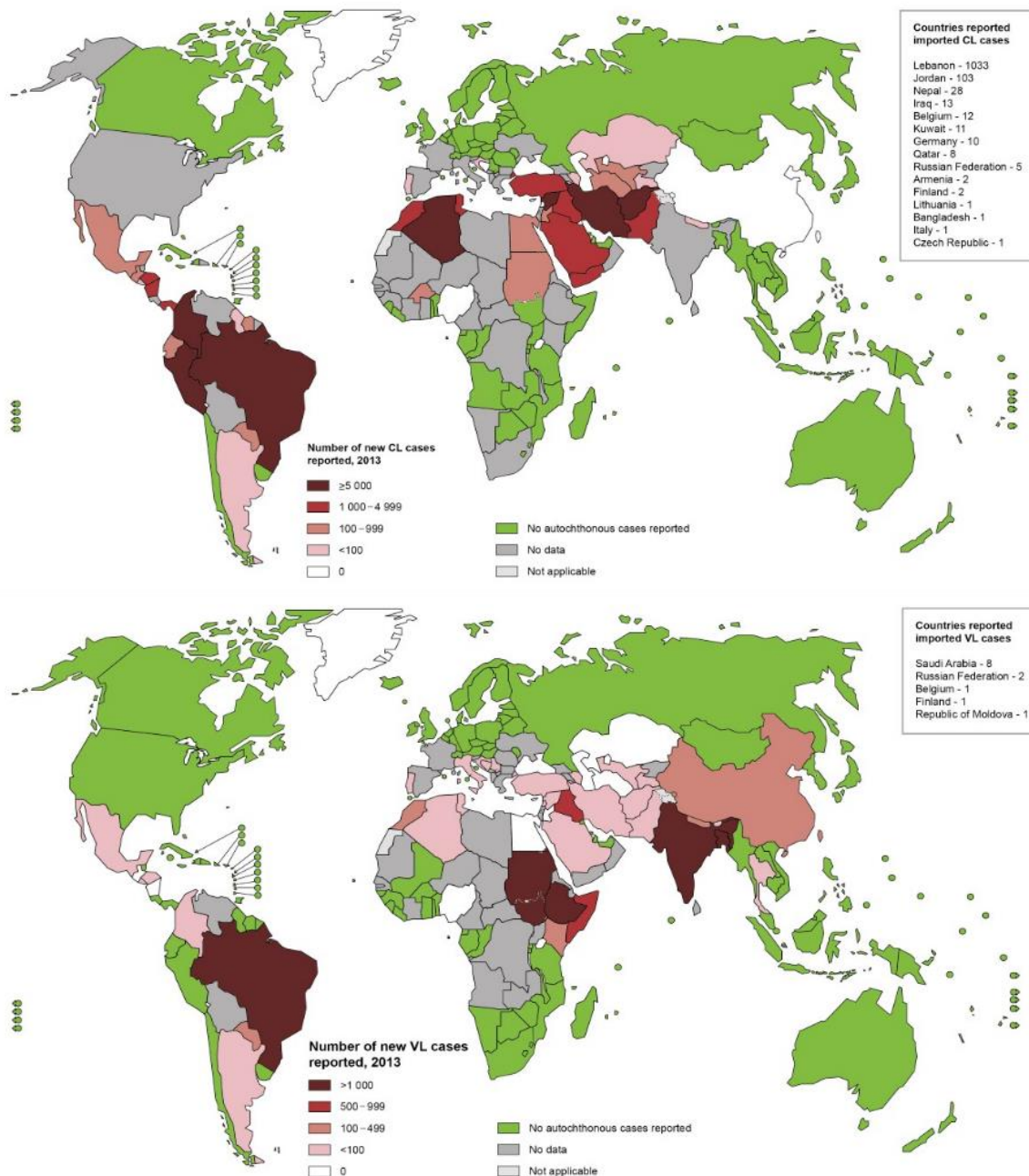


Figura 1.7 Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo. A-leishmaniose tegumentar; B-Leishmaniose visceral (Adaptado de OMS, 2013)

Tabela 1.2 Taxa de novos casos da leishmaniose tegumentar no Brasil por região de 2008 a 2012.

Casos novos por Ano segundo Região						
Período: 2008-2012						
Região	2008	2009	2010	2011	2012	Total
TOTAL	20.172	21.784	22.110	21.311	23.004	108.381
Região Norte	8.666	8.237	7.168	8.612	9.983	42.666
Região Nordeste	6.184	6.937	9.042	7.935	8.124	38.222
Região Centro-Oeste	3.018	4.530	3.118	2.281	3.123	16.070
Região Sudeste	1.648	1.637	2.534	2.149	1.348	9.316
Região Sul	656	443	248	334	426	2.107

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS):  
 Até 1997: Boletins de notificação semanal  
 A partir de 1998: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

Tabela retirada de Ministério da Saúde, 2012 (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#morb.>)

**Tabela 1.3 Taxa de novos casos da leishmaniose visceral no Brasil por região de 2008 a 2012.**

Casos novos por Ano segundo Região						
Período: 2008-2012						
Região	2008	2009	2010	2011	2012	Total
<b>TOTAL</b>	<b>3.380</b>	<b>3.555</b>	<b>3.430</b>	<b>3.814</b>	<b>3.058</b>	<b>17.237</b>
Região Norte	811	722	671	866	601	3.671
Região Nordeste	1.463	1.797	1.723	1.904	1.460	8.347
Região Sudeste	765	746	723	686	597	3.517
Região Sul	3	10	7	4	5	29
Região Centro-Oeste	338	280	306	354	395	1.673

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS):  
 Até 1997: Boletins de notificação semanal  
 A partir de 1998: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

Tabela retirada de Ministério da Saúde, 2012 (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#morb.>)

## 1.1.4 Tratamento

O controle da leishmaniose se baseia principalmente em medidas profiláticas de combate ao vetor e no tratamento do indivíduo acometido com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial. Este tratamento varia de acordo com a espécie de *Leishmania*, com a manifestação clínica e com as práticas regionais (Frézard et al, 2009).

O principal tratamento disponível contra a leishmaniose está no mercado há mais de 70 anos. Entretanto, há diversos problemas relacionados a este tratamento, como baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade de administração, alto custo, co-morbidade e a crescente resistência dos parasitos (Croft & Coombs, 2003; Goto e Lindoso, 2010). Devido a esta problemática, o desenvolvimento de novos fármacos e a busca por potenciais alvos no parasita torna-se essencial.

### 1.1.4.1 Antimoniais pentavalentes

O primeiro uso dos antimoniais contra a leishmaniose datam do início do século XX, em sua forma trivalente, pelo médico e pesquisador do Instituto de Patologia Experimental de Manguinhos, atual Instituto Oswaldo Cruz (Vianna, 1912). Desde então, as modificações em sua estrutura para redução de efeitos colaterais resultaram em duas formulações, na forma pentavalente, utilizadas atualmente como fármacos de primeira escolha: estibogliconato de sódio (Pentostam®, não comercializado no Brasil) e antimoniato de meglumina (Glucantime®), sem diferenças significativas de atividade entre essas formulações. Seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido. Entretanto, sabe-se que sua forma ativa é o antimonial trivalente ( $Sb^{3+}$ ), resultante da redução da sua forma pentavalente. Especula-se que esta redução aconteça dentro dos macrófagos, através da participação ativa de compostos

tiol da célula hospedeira (Haldar e cols, 2011; Mohapatra, 2014). Nas formas amastigotas, inibe a atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. (Frézard e cols., 2009).

Apesar de serem utilizados como primeira linha de tratamento, há crescentes relatos de casos de resistência do parasito aos antimoniais, principalmente no Sudão, Quênia e Índia (Manual do Ministério da Saúde, 2014). Inicialmente, a dosagem de antimonial indicada era de 10mg/kg durante 6 a 10 dias, com uma taxa de cura maior que 90%. Entretanto, após a primeira falha do tratamento ocorrer na Índia em 1980, altas doses e esquemas de tratamento prolongados (20mg/kg por 30 dias) foram gradualmente introduzidos. A inadequação do tratamento em termos de dose e duração levou a Índia a uma resistência generalizada, resultando no abandono deste fármaco no país. Alguns mecanismos de resistência foram descritos, como a inibição da conversão de  $Sb^{5+}$  para  $Sb^{3+}$  através de enzimas intracelulares como a ACR2 (arsenato redutase) ou a TDR1 (redutase dependente de tiol); a diminuição da expressão da enzima AQP1 (aquaporina 1), que leva a consequente diminuição da captação do fármaco para dentro da célula e o aumento dos níveis de tiol do parasito (cisteína e poliaminas, por exemplo), que ao se conjugar com o antimônio, forma o complexo tiol-antimônio. Este complexo pode ser excluído da célula ou captado por uma organela intracelular (Kaur e Rajput, 2014).

Os antimoniais são medicamentos injetáveis, que devem ser administrados via endovenosa ou intramuscular, diariamente, por longos períodos. Devido a essa premissa, é necessária a hospitalização do paciente, acarretando desconforto e elevando o custo do tratamento. Além disso, os vários efeitos colaterais, como náusea, dor abdominal, mialgia, nefrotoxicidade, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, levam à redução ou abandono do tratamento (Gasser e cols, 1994; Sundar e cols, 1998).

#### **1.1.4.2 Anfotericina B**

A anfotericina B é um antifúngico poliênico também utilizado no tratamento da leishmaniose. É a segunda opção de tratamento para pacientes que não responderam ao tratamento por antimônio e utilizada como tratamento de primeira escolha em países em que seu uso já é regulamentado por lei, como na Índia. No Brasil, a anfotericina constitui a primeira linha de tratamento para gestantes e pacientes co-infectados com HIV (Ministério da Saúde 2011c, Goto & Lindoso, 2010). No mercado, além da formulação clássica, estão disponíveis as seguintes formulações nanoestruturadas: anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009), que proporcionam níveis

plasmáticos mais elevados do fármaco e menor toxicidade aos pacientes (BRASIL,2014). Seu mecanismo de ação seletivo baseia-se na sua afinidade pelo ergosterol, esterol encontrado na membrana de *Leishmania* e ausente em membranas de células de mamíferos, levando à formação de poros na membrana dos parasitos, ocasionando à morte.

Uma das maiores problemáticas relacionada a administração da Anfotericina B são os efeitos colaterais, pois também possui afinidade com o colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos, acarretando em efeitos tóxicos para o paciente (Alves Ribeiro, 2011). Outros efeitos colaterais que culminam em grande evasão do tratamento, é a nefrotoxicidade, hipocalemia e miocardite (OMS, 2010).

Não são comuns relatos de resistência do parasito à anfotericina B. Entretanto, há relatos de que indivíduos co-infectados com HIV têm alto índice de recidiva após o tratamento, o que pode acarretar em uma eventual resistência. Os transportadores ou fatores de membrana envolvidos nesse mecanismo ainda precisam ser investigados. Entretanto, um mecanismo proposto é a ativação da cascata de triparredoxina para prevenir o dano oxidativo causado pelo fármaco (Kaur e Rajput, 2014).

Assim como os antimoniais, a administração da anfotericina B, feita por infusão venosa profunda, requer hospitalização prolongada e um acompanhamento rigoroso (Mishra e cols, 2007).

#### **1.1.4.3 Pentamidina**

A pentamidina é uma poliamina sintética derivada da amidina e constitui como uma opção de tratamento aos pacientes resistentes aos antimoniais acometidos por LV. Comercialmente, é encontrada sob duas formulações: Isotionato (di- $\beta$ -hidroxietilsulfonato) de pentamidina e mesilato (di- $\beta$ -hidroximetilsulfonato) de pentamidina. No Brasil, somente o isotionato é comercializado (Ministério da Saúde, 2014).

Apesar de seu mecanismo de ação contra *Leishmania* ainda não ser bem descrito, sabe-se que esta inibe uma enzima importante na síntese de poliaminas no parasito, a S-adenosil-L-metionina descarboxilase, e diminui o potencial da membrana mitocondrial do parasita. (Kaur e Rajput, 2014). Alguns estudos também propõem a inibição da topoisomerase II, culminando na morte por apoptose (Singh e Dey 2007).

Alguns casos de parasitos resistentes a este fármaco foram relatados (Bray et al., 2003), e alguns mecanismos de resistência foram propostos, como bombas de efluxo de drogas, como a PRP1, que estão presentes e foram bem caracterizadas em cepas resistentes de *Leishmania infantum*. Outro mecanismo é a redução do potencial da membrana mitocondrial de cepas

resistentes de *Leishmania* sp., através da alteração das vias biossintéticas de poliaminas, que diminuem a absorção da pentamidina pelo parasito (Kaur e Rajput, 2014).

Como todo fármaco para o tratamento da leishmaniose até o momento, a pentamidina apresenta efeitos colaterais que prejudicam e aumentam a evasão do tratamento pelos pacientes. Alguns destes efeitos são a dor, enduração, náuseas, vômitos, tontura, dentre outros e sua administração é via intramuscular profunda (Ministério da Saúde, 2010).

#### **1.1.4.4 Miltefosina**

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), inicialmente desenvolvida para o tratamento do câncer (Unger e cols., 1989), é o primeiro fármaco efetiva por via oral no tratamento contra a leishmaniose. Licenciada em alguns países como a Índia, Sudão e EUA, se tornou a primeira opção nessas localidades para o tratamento contra a LV (Dorlo e cols, 2012). Porém, em alguns países, principalmente no Brasil, a miltefosina ainda está em fase de testes, não sendo permitido o seu uso.

Como mecanismo de ação, embora não totalmente elucidado, propõe-se que ocorra a ligação da droga a membrana plasmática do parasito, com sua subsequente internalização através de duas proteínas de membrana, levando a alteração do metabolismo lipídico do parasita e resultando em apoptose do mesmo (Mohapatra, 2014). É o primeiro fármaco de administração por via oral aprovado como tratamento contra a leishmaniose visceral, com alta prescrição na Índia, Alemanha e Colômbia (Moreira e cols, 2014). Apesar dos bons resultados obtidos no tratamento contra LV, já foram relatados casos de resistência do parasito (Pandey e cols, 2012). O mecanismo de resistência proposto é a inativação dos genes responsáveis pela internalização do fármaco (Mohapatra e cols, 2014).

Um dos potenciais efeitos adversos mais graves é a teratogenicidade. Portanto, este tratamento não abrange mulheres grávidas (Croft e Yardley, 2002). Além disso, a miltefosina desencadeia efeitos colaterais adversos durante o tratamento, como náuseas, vômitos, enjoos, dores de cabeça e diarreia.

#### **1.1.4.5 Paramomicina**

A paramomicina é um aminoglicosídeo antibiótico com atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Ela tem sido utilizada por aplicação tópica e parenteral no tratamento da LC no Novo e Velho Mundo (Goto & Lindoso, 2010). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a síntese

proteica e alterar a fluidez e a permeabilidade de membrana. Estudos *in vitro* apontam que ela induz a perda do potencial de membrana mitocondrial em *L. donovani*, sugerindo que a mitocôndria seja a organela alvo deste fármaco (Maltezou, 2010).

Outros fármacos, como azóis (fluconazol, cetoconazol e itraconazol), inicialmente desenvolvidos para o tratamento de infecções fúngicas, têm sido usados como medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses tegumentares (Goto e Lindoso, 2010).

Até hoje não existe nenhuma vacina eficaz contra qualquer tipo de leishmaniose. Somente uma vacina é registrada contra leishmaniose canina, e ainda passa por estudos. A dificuldade da produção de uma vacina eficaz está tanto no tipo de manifestação clínica e na espécie causadora, quanto na resposta imune de cada hospedeiro. Além disso, as vacinas seriam eficazes na prevenção, mas não no combate à resistência.

As primeiras pesquisas de vacina eram feitas com parasitos mortos porem nunca foram eficazes. Ao longo dos anos as pesquisas foram buscando novos alvos como proteínas recombinantes, antígenos de promastigotas, vacinas de DNA, formulações lipossomais e histonas entre outras estratégias, mas nenhuma mostrou uma eficácia requerida para se tornar uma vacina (Nagill e Kaur, 2011).

### **1.1.5 Novas alternativas quimioterápicas**

Devido à falta de uma vacina ou um tratamento que combine eficiência e baixo custo, o foco das pesquisas em leishmaniose vem sendo redirecionado nos últimos anos. Um dos maiores agravantes é o fato da maioria das áreas endêmicas serem regiões pobres ou em desenvolvimento. Essas regiões são marcadas por falta de saneamento, políticas de saúde ineficazes ou inexistentes e falta de educação, o que dificulta em muito a realização de medidas profiláticas. Além disso, o custo da quimioterapia e a necessidade de hospitais ou lugares especializados para sua administração, inacessíveis nessas áreas, dificultam ainda mais a cura e a erradicação da doença (Ndjonka e cols, 2013).

Assim, a busca por novos fármacos e novos alvos se acentua cada vez mais, tendo em evidencia, nos últimos anos, a busca por produtos naturais e também o estudo de associação entre fármacos já utilizados.

Destaca-se também no âmbito atual da quimioterapia, a busca por novas formulações de fármacos conhecidos, como o aperfeiçoamento obtido com a anfotericina B lipossomal (Singodia e cols, 2012), a quercetina encapsulada em nanopartículas de ouro (Das e cols, 2013), a paramomicina em microsferas de albumina (Khan e cols, 2013), dentre outros.

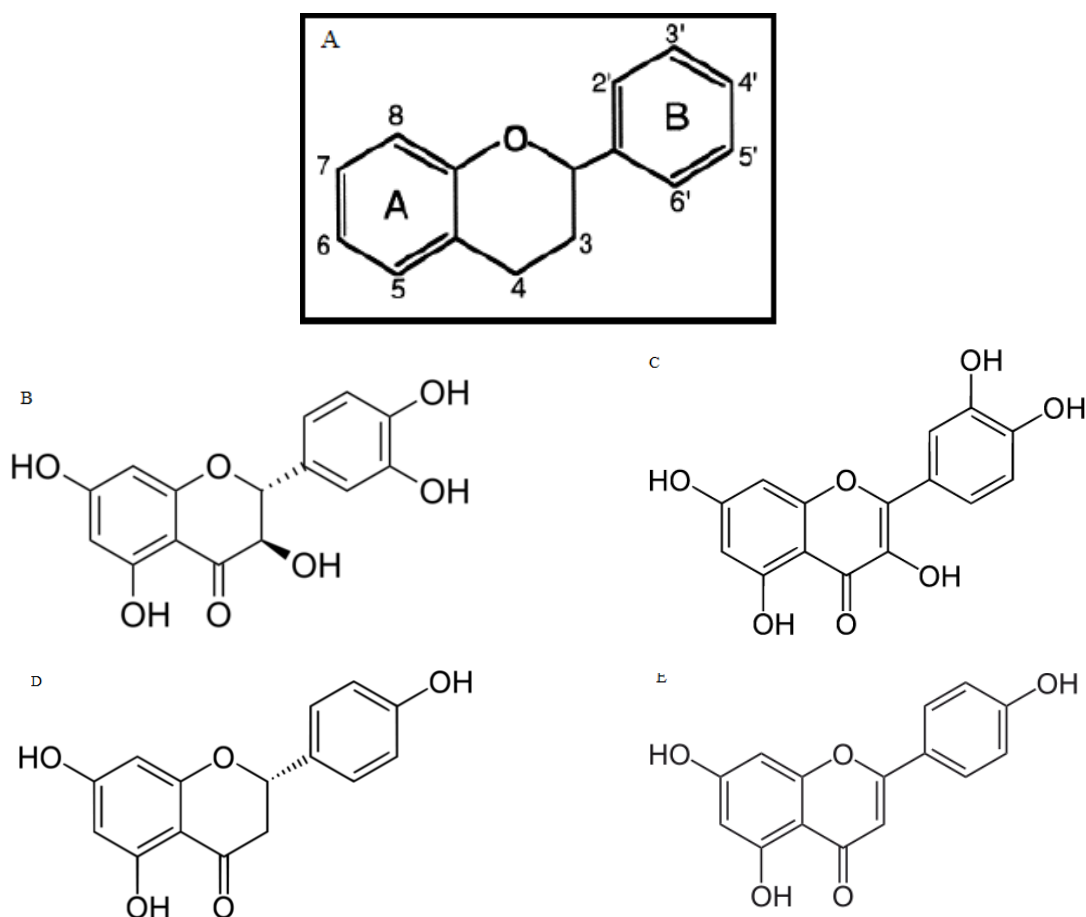
### *1.1.5.1 Produtos naturais e flavonóides*

Produtos naturais são uma fonte inesgotável de agentes quimioterápicos, principalmente aqueles usados para doenças infecciosas. No período entre 1981 e 2002 mais de 162 substâncias anti-infecciosas foram aprovadas para uso e 99 delas são de origem natural. Entre esses produtos podemos destacar chalconas, flavonóides, lignanas, alcalóides, entre outros (Salem e Werbovetz, 2006).

Segundo Schmidt, 2012a e 2012b, mais de 900 metabólitos secundários extraídos de plantas possuem atividade antiprotozoária descrita. Dentre esses metabólitos estão neolignanas, cumarinas, lapachol, xantonas, flavonóides, lignanas, quinolinas e quinonas, dentre outros, tendo alguns, atividade leishmanicida já descrita (Lazarin-Bidóia e cols, 2013; Ribeiro e cols, 2013; Paloque e cols, 2012).

Os flavonoides são um complexo de metabólitos secundários presentes na composição de frutas, vegetais, vinho, chá e café e são classificados como: flavona, flavononas, flavonoides, flavonóis, antocianinas, isoflavonoides e chalconas (Hoensech e Oertel, 2012; Czaplínska e cols, 2012; Lehane e Saliba, 2008). São compostos polifenólicos, caracterizados por um núcleo flavana e dois anéis aromáticos ligados por 3 átomos de carbono em sua composição (Hoensech e Oertel, 2012). Na Figura 1.8 observamos a estrutura básica de um flavonoide e seus subgrupos.

Este grupo desempenha várias funções tais quais, ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antivirais e antineoplásicas (Machado e cols, 2008). Sabe-se que alguns flavonoides, paradoxalmente possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, causando danos mitocondriais. (Fonseca-Silva e cols, 2011; Inácio e cols, 2014; Verchooten e cols, 2012).



**Figura 1.8 Estrutura básica de um flavonoide e seus subgrupos.** A- Esqueleto flavonoide destacando os anéis aromáticos A e B e o núcleo flavan no meio; B a E - Exemplos de compostos dos subgrupos: B- Flavanol (Taxifolina); C- Flavanol (Quercetina); D- Flavanona (Narigenina); E- Flavona (Apigenina);

#### 1.1.5.1.1 2'-hidroxiflavanona

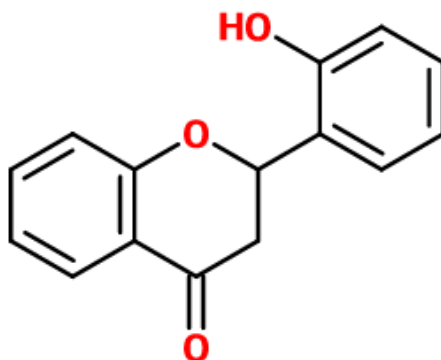
As flavanonas são encontradas em grande concentração em sementes e cascas de frutas, principalmente as cítricas, e são conhecidas por apresentarem atividade contra diversos tipos de câncer. Alguns exemplos são a narigenina, conhecida por induzir apoptose em células cancerígenas e a hesperidina (Shin et al, 2012). A quercetina é uma flavanona conhecida por inibir a viabilidade celular de glioma humano, induzindo o aumento de espécies reativas de oxigênio, além de sua atividade contra *Leishmania amazonensis*, também por aumento de ROS (Fonseca-Silva e cols, 2011).

A 2'-hidroxiflavanona é uma flavanona, classe dos flavonoides, encontrada em frutas cítricas, principalmente em laranjas e dentre as hidroxiflavanonas existentes, tem recebido atenção especial (Figura 1.8)

Tem sido descrito o efeito da 2'-hidroxiflavanona em diversas células cancerígenas. Em carcinoma renal, ela foi capaz de inibir a proliferação, a vascularização do tumor e a



diferenciação de mutantes marcadores do tumor (Nagaprashantha et al, 2011). Em células de câncer de cólon, a 2'-hidroxiflavanona foi capaz de induzir apoptose através da ERG-1 e de diversas caspases (Shin et al, 2012). A 2'-hidroxiflavanona também foi capaz de inibir a metástase de células de câncer de pulmão, reduzindo a capacidade de invasão da célula tumoral, além de reduzir sua migração e adesão (Hsiao et al, 2007).



**Figura 1.9** Estrutura química da 2'-hidroxiflavanona

#### ***1.1.5.2 Terapia Combinada***

Além da busca por produtos naturais leishmanicidas, uma alternativa que vem sendo estudada para o tratamento da leishmaniose é a combinação dos fármacos conhecidos, como anfotericina B lipossomal/miltefosina, e paramomicina/miltefosina (Meheus e cols, 2011; Miranda-Verastegui, 2009) ou destes com possíveis novas moléculas e substâncias que possam potencializar seu efeito (Banerjee e cols, 2011). Uma combinação eficaz que vem sendo utilizada como primeira escolha desde 2010 para leishmaniose visceral na África é a associação da paramomicina com o estibugluconato de sódio (Portifólio DNDi, 2016). Incentivado pelo DNDi, o ensaio clínico foi feito e chegou-se a um protocolo de tratamento com doses de 20mg/kg/dia do estibugluconato de sódio e 15 mg/kg/dia de paramomicina, os dois por via intramuscular. O tempo de tratamento diminuiu para 17 dias, além da diminuição do custo da terapia. Já registrada na Uganda e no Quênia, a combinação está em fase de implementação também para o Sudão e a Etiópia.

A combinação de fármacos pode resultar como efeito sinérgico, efeito aditivo ou efeito antagônico. No efeito aditivo, o efeito final é a soma dos efeitos dos fármacos envolvidos. No efeito sinérgico, o efeito final é maior que a soma dos efeitos dos fármacos, podendo haver uma

potencialização do efeito de um com ajuda do outro. Já no efeito antagônico, o efeito de um dos fármacos é diminuído sendo inativado ou mesmo eliminado.

O efeito sinérgico pode se dar de várias formas: pela mesma via bioquímica, onde fármacos com mecanismos de ação similares podem ser mais efetivas; o aumento da penetração do fármaco na membrana celular causada pela atividade da outra molécula; a inibição simultânea de alvos diferentes; potencialização do efeito de um dos fármacos sem o seu respectivo efeito colateral (Johnson e cols, 2004). Ao mesmo tempo pode existir um efeito antagônico como a competição por um mesmo sitio de ação do fármaco com mecanismos similares, a adsorção de um fármaco inibir a entrada da outra na membrana, o efeito de um fármaco deixar a célula menos suscetível a outro fármaco, sendo o último não efetivo.

Dessa forma, sabendo-se da grande importância das leishmanioses no Brasil e no mundo sob o ponto de vista clínico e de saúde pública, para a qual ainda não há vacina licenciada e o tratamento atual é insatisfatório, com altas taxas de toxidez e ineficácia, o objetivo desse projeto é estudar os efeitos da 2'-hidroxiflavanona sob *L. amazonensis*, bem como seu mecanismo de ação e associação com fármacos de referência.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da 2'-hidroxiflavanona em ambas as formas de *L. amazonensis* bem como seu mecanismo de ação, sua associação com fármacos de referência e seu efeito sob promastigotas resistentes ao tartarato de antimônio e potássio.

### 2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito da 2'-hidroxiflavanona na proliferação celular das promastigotas de *L. amazonensis*;

Verificar o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas tratadas com 2'-hidroxiflavanona;

Observar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas promastigotas;

Avaliar o efeito de antioxidantes e enzimas no tratamento destes parasitos com 2'-hidroxiflavanona;

Investigar o efeito da 2'-hidroxiflavanona na forma amastigota de *L. amazonensis* e investigar sua citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos;

Analisar as propriedades ADMET *in silico* da 2'-hidroxiflavanona;

Avaliar o efeito *in vivo* da 2'-hidroxiflavanona em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, bem como parâmetros bioquímicos e hematológicos;

Avaliar o efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com anfotericina B, antimônio e miltefosina na forma promastigota de *L. amazonensis*;

Elucidar o efeito da 2'-hidroxiflavanona em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao tartarato de antimônio e potássio;

## 3 Metodologia

### 3.1 Reagentes

A 2'-hidroxiflavanona foi obtida comercialmente da Sigma Aldrich (St Louis, EUA), solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em meio de cultura, alcançando um volume final de 0,2% (v/v). O H2DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína) foi obtido da Invitrogen Molecular Probes (Eugene, EUA). O FCCP (carbonil cianeto 4-trifluorometoxi fenil hidrazona), o JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboanina), a NAC (N-acetil-cisteína), a GSH (glutathiona reduzida), a GSSG (glutathiona oxidada), o tartarato de antimônio e potássio ( $Sb^{3+}$ ), a miltefosina, a anfotericina B e a resazurina também foram obtidos a Sigma Aldrich. Todos os outros reagentes foram adquiridos da Merck (São Paulo, Brasil). A água destilada deionizada foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore Corp) e utilizada na preparação das soluções. O antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), utilizado como fármaco de referência no experimento *in vivo*, foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ).

### 3.2 Manutenção de Parasitos

As promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa MHOM/BR/77/LTB0016, foram cultivadas em meio Schneider pH7.2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich). Foram feitos repiques a cada 3 ou 4 dias para manutenção dos parasitos e estes foram armazenados em estufa de 26° C BOD (*Biochemical Oxygen Demand*)

### 3.3 Animais

Os animais utilizados para os experimentos *in vitro* (Suiço Webster) e *in vivo* (BALB/c) foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL/FIOCRUZ-RJ). Todos os protocolos usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (LW-07/10).

### 3.4 Ensaio *in vitro*

#### 3.4.1 Atividade antipromastigota da 2'-hidroxiflavanona

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados com concentrações crescentes de 2'-hidroxiflavanona (0 a  $96 \mu\text{M}$ ) por 24 horas em tubos falcon, em um volume final de 1 mL. Posteriormente,  $5 \times 10^6$  parasitos/mL foram incubados com diferentes concentrações (0 a  $96 \mu\text{M}$ ) de 2'-hidroxiflavanona por 3 horas. O número de células viáveis em ambos foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer e os valores de  $\text{IC}_{50}$  das curvas foram determinados por regressão não linear realizada no GraphPad Prism 5.0.

#### 3.4.2 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Após as etapas descritas no item 3.4.1 (por 24 horas), promastigotas foram lavadas com solução salina balanceada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*) e ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$ /mL. Após o ajuste, promastigotas foram incubadas por 10 minutos a  $26^\circ\text{C}$  com  $10 \mu\text{g/mL}$  de JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboquinona), um indicador fluorescente permeável que se acumula sob a forma agregada na mitocôndria funcional, fluorescendo em vermelho (590 nm). Quando há despolarização da membrana mitocondrial, o JC-1 permanece no citoplasma sob a forma monomérica, fluorescendo em verde (530 nm). A análise foi realizada em espectrofluorímetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices, Silicon Valley, USA), em placas pretas de 96 poços, usando os comprimentos de onda de 480nm para excitação e 530/590nm para emissão. O controle positivo utilizado foi o FCCP (carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilidrazona), um desacoplador do transporte de elétrons e conseqüentemente do potencial de membrana mitocondrial. A despolarização foi analisada pela razão 590/530 e comparada com o controle.

#### 3.4.3 Mensuração de espécies reativa de oxigênio (ROS)

Após as etapas descritas no item 3.4.1 (por 3 e 24 horas), para determinar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), promastigotas foram lavadas com solução salina balanceada de Hank (HBSS) e ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$ /mL. Após o ajuste, promastigotas foram incubadas por 30 minutos, a  $26^\circ\text{C}$  com  $20 \mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína - Invitrogen, Eugene, USA), em placas pretas de 96 poços, com volume final de  $200 \mu\text{L}$ /poço. O H<sub>2</sub>DCFDA, na presença de ROS, passa por reações de clivagem e oxidação, sendo convertido para DCF (2',7'-diclorofluoresceína), sua forma

fluorescente. A análise foi realizada em espectrofluorímetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices, Silicon Valley, USA) usando os comprimentos de onda de 507nm para excitação e 530nm para emissão. O controle positivo utilizado foi o sistema glicose/glicose oxidase (60mM + 20U/ml).

#### **3.4.4 Estudo do efeito de antioxidantes no tratamento com 2'-hidroxiflavanona**

Para estudar o efeito das espécies reativas de oxigênio na morte promovida em promastigotas de *L. amazonensis* pela 2'-hidroxiflavanona, foram utilizadas moléculas e enzimas antioxidantes. Promastigotas ( $5 \times 10^6$ ) foram incubadas com antioxidantes e tratadas ou não com 2'-hidroxiflavanona (96  $\mu$ M) por 24 horas em tubos falcon com volume final de 1mL. Foram utilizadas as moléculas NAC (N-acetilcisteína), GSH (glutathiona reduzida) e GSSG (glutathiona oxidada), na concentração de 300  $\mu$ M. Também foram utilizadas enzimas antioxidantes como CAT (Catalase) PEG-CAT (Polietilenoglicol catalase), na concentração de 500 Unidades/mL. Após 24 horas, o número de células viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer.

#### **3.4.5 Atividade anti-amastigota da 2'-hidroxiflavanona**

Para avaliar a função do composto na forma amastigota de *L. amazonensis*, macrófagos peritoneais de camundongos Suíço Webster foram obtidos por lavagem peritoneal com 5 mL de meio RPMI gelado (Sigma, Sant Louis, USA). A concentração de macrófagos foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL e plaqueadas em câmaras LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, USA). Após 1 hora, os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1 (3 promastigotas para 1 macrófago) e incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a infecção as lâminas foram tratadas com diferentes concentrações de 2'-hidroxiflavanona (0 a 12 $\mu$ M) por 72 horas. Passado o período de incubação, as lâminas foram submetidas à coloração pelo corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e a atividade anti-amastigota foi avaliada por contagem em microscópio óptico. O número mínimo estabelecido para contagem foi de 200 macrófagos por amostra e os resultados foram expressos em índice de infecção (IF = %células infectadas X (número de amastigotas/número total de macrófagos)). O IC<sub>50</sub> da 2'-hidroxiflavanona foi determinado por regressão não linear realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

### **3.4.6 Avaliação da citotoxicidade da 2'-hidroxiflavanona**

A citotoxicidade da 2'-hidroxiflavanona foi avaliada em macrófagos peritoneais murinos de camundongos Suíços fluorimetricamente, utilizando resazurina. Esse ensaio consiste na conversão de resazurina, forma não fluorescente, solúvel e de cor azulada, em resorufina, que a medida que vai sendo reduzida pela atividade mitocondrial, vai fluorescer em rosa. Assim, quanto mais rosado o poço, maior é a viabilidade celular. Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem peritoneal com 5 mL de meio RPMI gelado (Sigma, Sant Louis, USA). A concentração de macrófagos foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL e plaqueadas em placas de 96 poços. Após 1 hora, os macrófagos foram incubados em triplicata com concentrações crescentes de 2'-hidroxiflavanona ( $3 \mu\text{M}$  –  $192 \mu\text{M}$ ) por 72 horas em placa de 96 poços. Após esse período de tempo, foi adicionado em cada poço 20% do volume total do reagente Alamar Blue. A placa foi incubada por 3 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ , e após esse tempo, a viabilidade foi mensurada em espectrofluorímetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices, Silicon Valley, USA) com comprimentos de onda 560nm de excitação e 590nm de emissão.

### **3.4.7 Efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência em promastigotas de *L. amazonensis***

Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em seu respectivo meio em placas de 96 poços e mantidas em estufa a  $26^\circ\text{C}$ , na ausência e na presença de diferentes concentrações de tartarato de antimônio e potássio ( $\text{Sb}^{3+}$ ), anfotericina B, ou miltefosina. Após 72 horas a viabilidade das promastigotas foi avaliada pelo método de resazurina. O cálculo do  $\text{IC}_{50}$  foi determinado por análise de regressão logarítmica utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Após a determinação do  $\text{IC}_{50}$  de cada curva, foi determinada uma concentração máxima para cada composto. O efeito combinatório foi determinado pelo método de isoblograma modificado (Mesquita e cols, 2013; Trinconi e cols, 2014; Seifert e Croft, 2006; Fivelman e cols, 2004;) onde promastigotas foram incubadas com os compostos sozinhos e combinados, respeitando as proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 que foram diluídas em série (base 2). As curvas sigmoidais de regressão foram utilizadas para determinar o  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$ . Para cada razão, um valor de  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$  foi calculado para cada associação.

### 3.4.8 Análise isobolográfica

A associação entre os fármacos acima descritos e a 2'-hidroxiflavanona foi analisada utilizando-se o isoblograma (Greco e cols, 1995). O IC<sub>50</sub> dos fármacos sozinho, o IC<sub>50</sub> da 2'-hidroxiflavanona e o IC<sub>50</sub> das respectivas combinações foram utilizados para a construção do gráfico de isoblograma onde foi obtida a linha de aditividade. O índice da concentração inibitória fracional (FICI) foi calculado de acordo com a equação:

$$FICI_{50/90} = IC_{50/90} (A+B) / IC_{50/90} (A)$$

Os valores obtidos foram utilizados para analisarmos o tipo de efeito obtido na associação FICI ≤ 0.5 – sinergismo; 0.5 < FICI < 4 – aditivo; FICI ≥ 4 – antagonismo (Odds, 2003).

### 3.4.9 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em *Leishmania amazonensis* resistentes ao tartarato de antimônio e potássio.

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) foram cultivadas em seu respectivo meio, acrescidas ou não de tartarato de antimônio e potássio, de maneira progressiva a cada passagem, até chegar a 10 vezes o IC<sub>50</sub> do antimonial previamente determinado por uma curva de diferentes concentrações de tartarato de antimônio e potássio. Os parasitos foram mantidos em estufa de 26°C. Após atingir o valor de 10 vezes o IC<sub>50</sub>, foi determinada sua resistência a partir de uma curva com várias concentrações de antimônio por 72h. Após esse período, a viabilidade foi mensurada pela redução da resazurina em espectrofluorímetro como descrito anteriormente. Confirmada a resistência, promastigotas sensíveis e resistentes ao tartarato de antimônio e potássio (1x10<sup>6</sup>/mL) foram incubadas com concentrações de 2'-hidroxiflavanona (3 a 96µM) por 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer.

### 3.5 Ensaio *in silico* da 2'-hidroxiflavanona

O ensaio *in silico* para propriedades ADMET (Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) foi realizado pela plataforma pkCSM (*predicting small-molecule pharmacokinetic properties*), um banco de dados que reúne resultados de um conjunto de



moléculas que ajudam a prever parâmetros e valores de referência satisfatórios que ajudam a classificar um candidato a fármaco pela sua capacidade de absorção por via oral e farmacocinética (Pires e cols, 2015 – disponível em <http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsml>). Em adição, foram avaliados os descritores moleculares de Lipinski (Lipinski, 2001; Lipinski, 2004), parâmetros físico-químicos, nomeados como “Regra dos 5” também associados a probabilidade de um candidato a fármaco ter uma boa disponibilidade oral. Os parâmetros são: número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA), número de doadores de ligação de hidrogênio, coeficiente de partição octanol/água (clogP), peso molecular do candidato e número de rotações.

### **3.6 Ensaio *in vivo***

#### **3.6.1 Atividade *in vivo* da 2'-hidroxiflavanona**

O ensaio *in vivo* foi realizado baseando-se no protocolo estabelecido por Inácio e colaboradores (2013). Camundongos BALB/c (5/grupo) foram infectados via intradérmica com promastigotas de *L. amazonensis* ( $2 \times 10^6$  células/10 $\mu$ L) na orelha direita. Após 7 dias de infecção, foi iniciado o tratamento oral (através de sonda orogástrica) com 50 mg/kg/dia de 2'-hidroxiflavanona ou injeção intraperitoneal (no quadrante inferior direito do abdômen) de 100mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina (fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose). A 2'-hidroxiflavanona foi administrada solubilizada no veículo de suspensão oral OraPlus (Perrigo). O controle recebeu somente o veículo OraPlus. O tratamento foi realizado diariamente por 39 dias. A progressão da doença foi avaliada pela espessura da orelha infectada, mensurada através de paquímetro (Mitutoyo, São Paulo, Brasil), duas vezes por semana. Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (Nº de Licença: LW-7/10).

#### **3.6.2 Quantificação da carga parasitária**

A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (LDA). Ao final do experimento, no 45º dia, a orelha lesionada de cada camundongo foi retirada, pesada e macerada em meio Schneider, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino, 200U/mL penicilina e 200 $\mu$ g/mL estreptomicina. As células em suspensão foram ajustadas para a concentração de 10mg de tecido/mL e foram diluídas em série de 1:2 em placa de 96 poços,

resultando um volume final de 200 $\mu$ L por poço. As culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 7 dias em microscópio óptico, para registro da última diluição que continha promastigotas para estimar a carga parasitária expressa em parasitos/mg de tecido, conforme descrito por Inácio e colaboradores (2013).

### **3.6.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Para avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos, foi coletado 1 mL de sangue de cada camundongo, pelo método de punção cardíaca. Após a coleta, o sangue foi dividido em microtubos contendo EDTA para análises hematológicas e microtubos para análises bioquímicas. Os parâmetros hematológicos testados foram: número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), contagem de leucócitos e Plaquetas. Os parâmetros bioquímicos foram: creatinina, alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Todos os parâmetros foram testados pela Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fiocruz.

### **3.7 Análises estatísticas**

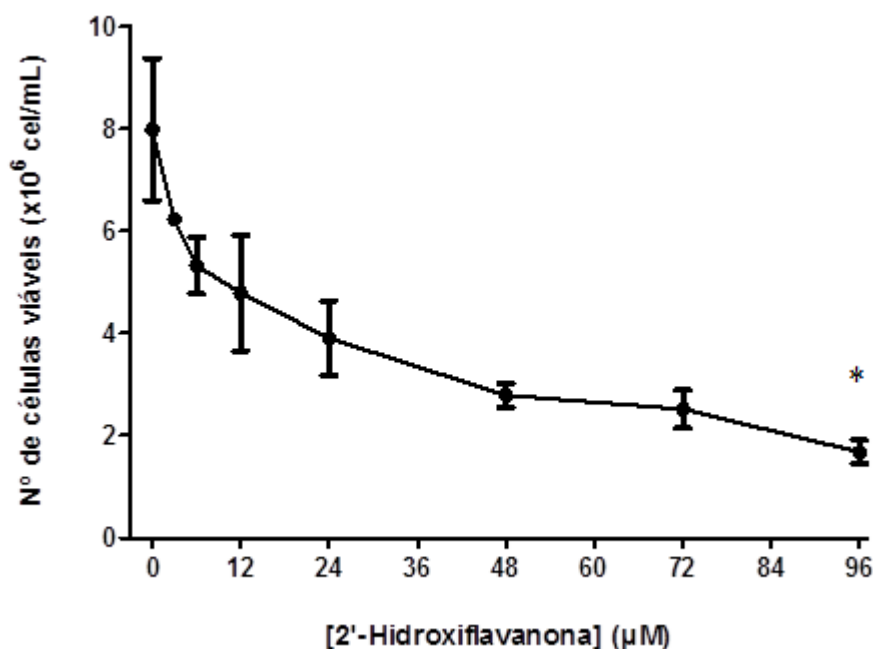
Todos os experimentos foram realizados em três ou mais ensaios independentes com um n de 3 em cada. Os dados foram analisados pelo teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni em GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 4 Resultados

### 4.1 Ensaios *in vitro* e mecanismo de ação

#### 4.1.1 Atividade antipromastigota da 2'-hidroxiflavanona

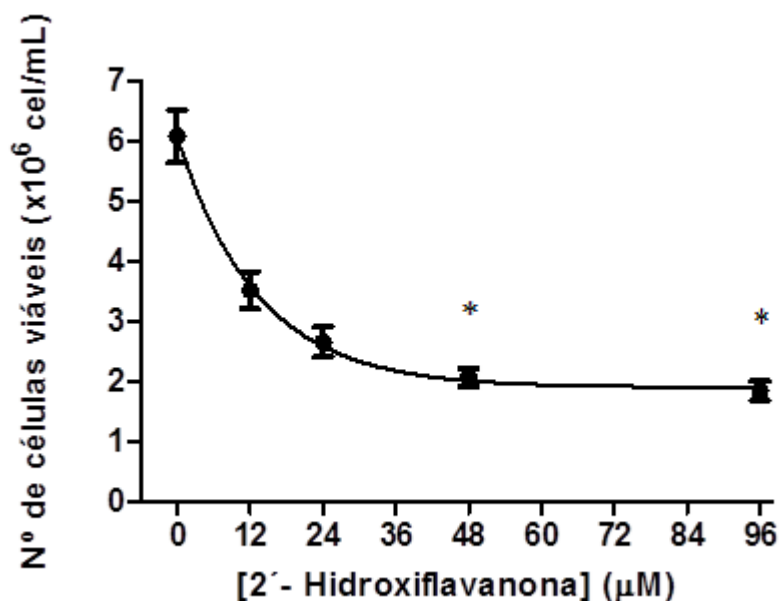
Para avaliar o efeito da 2'-hidroxiflavanona na proliferação celular de *L. amazonensis*, promastigotas foram incubadas na ausência ou presença de 2'-hidroxiflavanona (3 - 96 $\mu$ M), por 24h. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou efetiva ao provocar a inibição da proliferação de *L. amazonensis* de maneira concentração dependente, mostrando um IC<sub>50</sub> de 20,96  $\mu$ M, com 74% de inibição na maior concentração (96 $\mu$ M) (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Efeito da 2'-hidroxiflavanona na proliferação celular de promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos ( $5 \times 10^6$  cel/mL) foram incubadas na ausência ou presença de 2'-hidroxiflavanona (3-96 $\mu$ M) por 24 horas. Alíquotas foram retiradas para contagem direta em câmara de Neubauer conforme descrito no item 3.4.1. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes, com um n de 3.  $P < 0.001$  (ANOVA).

Para avaliar um possível efeito imediato da 2'-hidroxiflavanona na viabilidade de *L. amazonensis*, promastigotas foram incubadas na ausência ou na presença de concentrações crescentes (12 - 96 $\mu$ M) de 2'-hidroxiflavanona por 3 horas. A 2'-hidroxiflavanona também se mostrou efetiva ao inibir, em 3 horas, a proliferação de promastigotas de maneira concentração

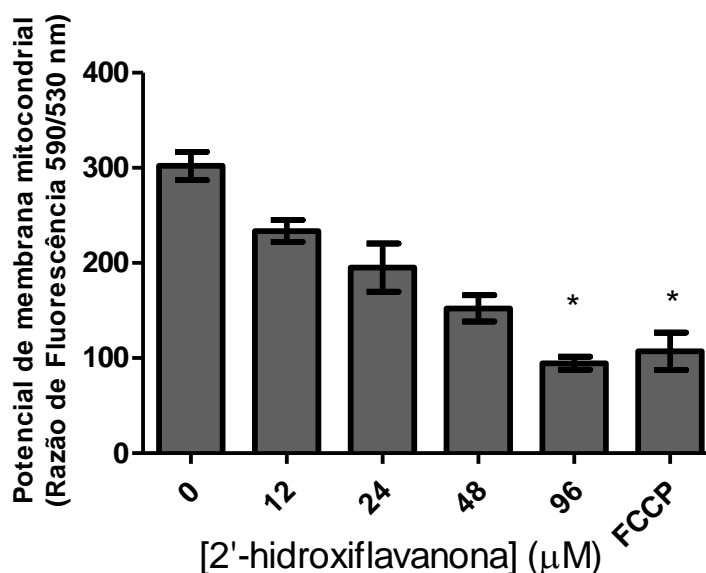
dependente, apresentando  $IC_{50}$  de  $21,59 \mu M$ , com 70% de inibição na maior concentração ( $96 \mu M$ ), valores próximos aos obtidos em 24 horas. (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Efeito da 2'-hidroxiflavanona na viabilidade celular de promastigotas de *L. amazonensis*.  $5 \times 10^6$  parasitos/ml foram incubados na ausência ou presença de 2'-hidroxiflavanona (12-  $96 \mu M$ ) por 3 horas. A viabilidade celular foi dada a partir de contagem direta por câmara de Neubauer conforme descrito no item 3.4.1. Os valores mostram a média de 5 experimentos independentes, com um n de 3.  $P < 0.001$  (ANOVA).

#### 4.1.2 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Os tripanosomatídeos têm como forte característica sua mitocôndria única, que a torna um alvo para a ação de fármacos. Estudos tem mostrado que a perda de  $\Delta\Psi_m$  está diretamente ligada à inibição da proliferação celular (Menna-Barreto e cols, 2009; Rodrigues e cols, 2007; Inácio e cols, 2014; Fonseca-Silva e cols, 2016). Flavonoides também têm sido descritos por desencadearem essa relação entre inibição e despolarização (Fonseca-Silva e cols, 2011; Inácio e cols, 2012). Para determinar se a 2'- hidroxiflavanona causa algum efeito no potencial de membrana mitocondrial de *L. amazonensis*, foi utilizada a sonda fluorescente JC-1. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na presença ou na ausência 2'-hidroxiflavanona (12 -  $96 \mu M$ ) por 24 horas. A 2'-hidroxiflavanona foi capaz de causar uma redução concentração dependente no potencial de membrana mitocondrial em promastigotas tratadas, atingindo uma redução significativa de 71% do potencial de membrana com a maior concentração ( $96 \mu M$ ) quando comparada com as células controle (Figura 4.3)

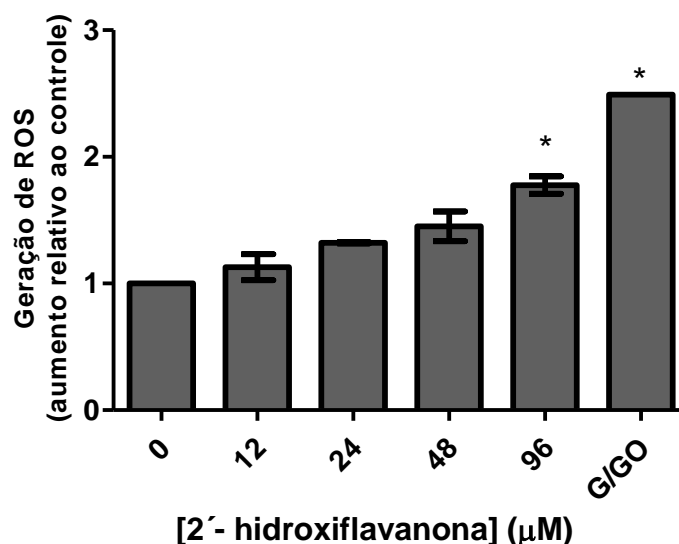


**Figura 4.3 Avaliação do Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em *L. amazonensis* tratada com 2'-hidroxiflavanona.** Promastigotas foram incubadas na ausência ou na presença de 2'-hidroxiflavanona por 24 horas. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando o indicador JC-1 conforme descrito no item 3.4.2. Controle positivo: FCCP 20μM. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes, com um n de 3.  $P < 0,005$  (ANOVA).

#### 4.1.3 Mensuração de espécies reativa de oxigênio (ROS)

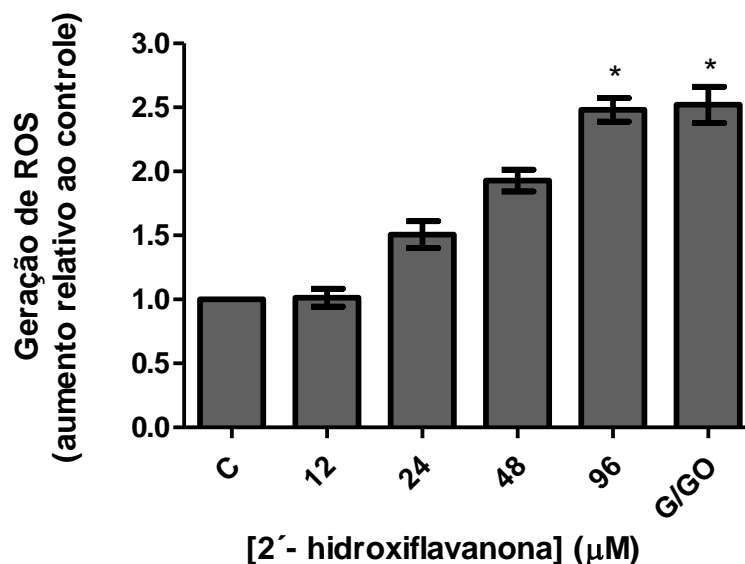
Ainda em relação à importância da mitocôndria única dos tripanosomatídeos, estudos vêm mostrando que o dano mitocondrial está relacionado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (Verchooten e cols, 2012). Para verificarmos a produção de ROS decorrente da incubação com o composto, promastigotas foram incubadas na presença e na ausência de 2'-hidroxiflavanona (12 – 96 μM) por 24 horas. O indicador  $H_2DCFDA$  foi utilizado para mensurar os níveis de ROS e como controle positivo foi utilizado o sistema glicose/glicose oxidase. A 2'-hidroxiflavanona foi capaz de induzir uma produção de ROS de maneira concentração dependente (Figura 4.4), chegando a uma produção 1,76 vezes maior que o controle na maior concentração utilizada (96 μM).

Promastigotas de *L. amazonensis* também foram incubadas na presença e na ausência de 2'-hidroxiflavanona (12 - 96μM) por 3 horas. A 2'-hidroxiflavanona foi capaz de induzir uma produção de ROS também de maneira concentração dependente (Figura 4.5), chegando a uma produção 2,48 vezes maior que o controle na maior concentração utilizada (96μM). Esse resultado sugere que a despolarização da membrana mitocondrial e o aumento das espécies reativas de oxigênio podem estar ligados ao efeito inibitório da 2'-hidroxiflavanona.

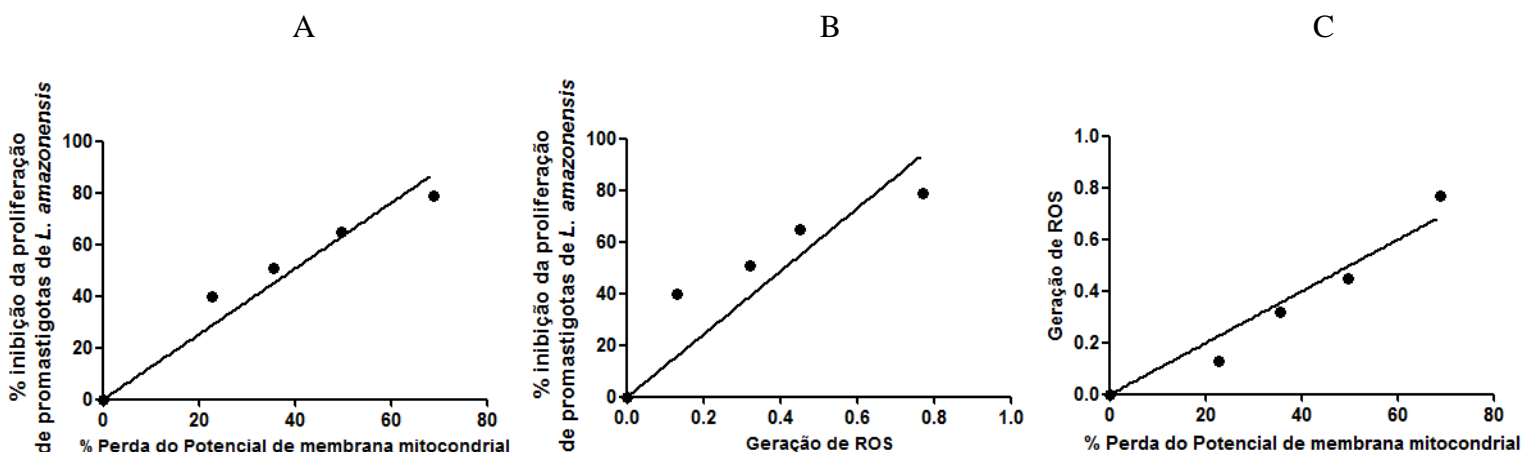


**Figura 4.4 Formação de espécies reativas de oxigênio.** Promastigotas foram incubadas na ausência ou na presença de 2'-hidroxiflavanona por 24 horas. A formação de ROS foi mensurada utilizando H<sub>2</sub>DCFDA conforme descrito no item 3.4.3. Controle positivo (G/GO): 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose, por 20 min. Os valores mostram a média de 5 experimentos independentes, com um n de 3. \*\*P<0,01 (ANOVA).

Para referenciar esta hipótese, utilizando os valores de inibição da proliferação, potencial de membrana mitocondrial e aumento de ROS, foi obtida uma correlação linear entre eles. Na Figura 4.6a podemos ver a correlação entre a inibição e a despolarização da membrana mitocondrial ( $R^2 = 0,96$ ). Em seguida, em 4.6b vemos a correlação entre a inibição e a produção de espécies reativas de oxigênio ( $R^2 = 0,94$ ). Por último, na 4.6c observamos a correlação linear entre a despolarização mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio ( $R^2 = 0,97$ ). Estes 3 gráficos demonstram que tanto a despolarização mitocondrial quanto a produção de espécies reativas de oxigênio estão diretamente ligados à inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* provocada pela 2'-hidroxiflavanona, além de sugerir que o aumento de espécies reativas de oxigênio está diretamente ligado à despolarização mitocondrial.



**Figura 4.5 Formação de espécies reativas de oxigênio.** Promastigotas foram incubadas na ausência ou na presença de 2'-hidroxiflavanona por 3 horas. A formação de ROS foi mensurada utilizando H<sub>2</sub>DCFDA conforme descrito no item 3.4.3. Controle positivo (G/GO): 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose, por 20 min. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes com um n de 3. \*P<0,05; (ANOVA).

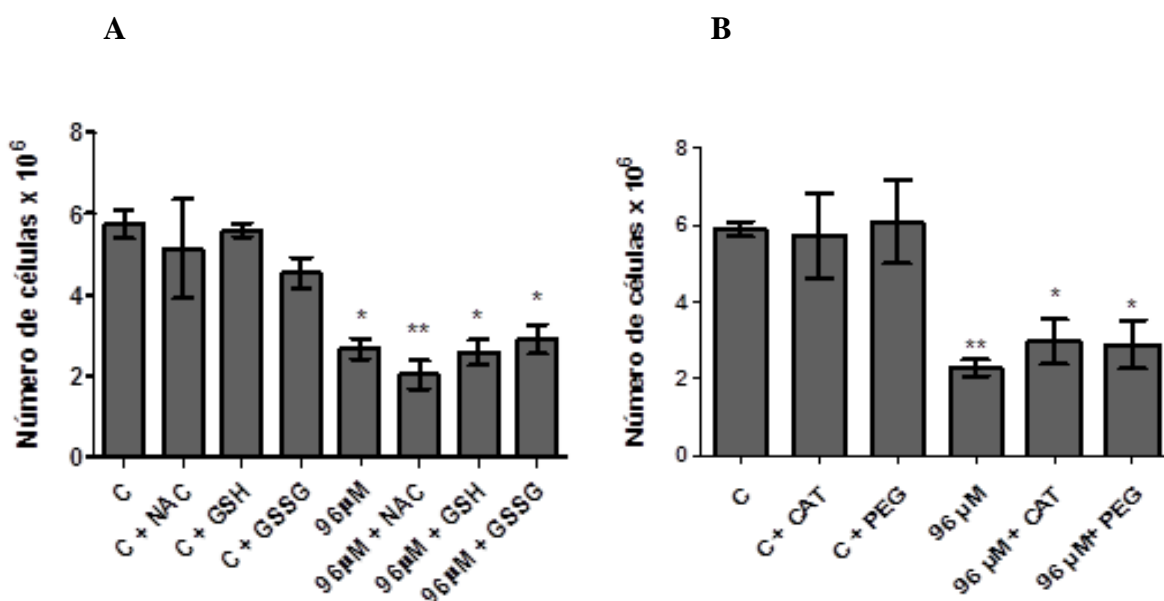


**Figura 4.6 Correlação linear em 24 horas:** A - % de inibição / Potencial de membrana mitocondrial ( $R^2 = 0,96$ ); B - % de inibição / Geração de ROS ( $R^2 = 0,94$ ); C - Geração de ROS / Potencial de membrana mitocondrial ( $R^2 = 0,97$ );

#### 4.1.4 Estudo do efeito de antioxidantes no tratamento com 2'-hidroxiflavanona

N- acetilcistina (NAC), glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG), são moléculas muito estudadas, sendo a GSH componente da tripanotona, sistema de detoxificação do parasito e NAC uma molécula antioxidante (Lu, 1999). Catalase é uma enzima capaz de

converter peróxido de hidrogênio em  $H_2O + O_2$ . A polieietenoglicol-catalase difere da catalase apenas por possuir uma cadeia lipofílica que facilita sua passagem pela membrana das células. Para determinar se esses compostos com atividade antioxidante são capazes de proteger do efeito inibitório da 2'-hidroxiflavanona, promastigotas de *L. amazonensis* foram pré-incubadas com os antioxidantes (Figura 4.7A) ou enzimas (Figura 4.7B), tratadas com 2'-hidroxiflavanona e após 24 horas, foi avaliado o efeito inibitório. A incubação com os antioxidantes não foi capaz de proteger as promastigotas do efeito inibitório causado pela 2'-hidroxiflavanona.



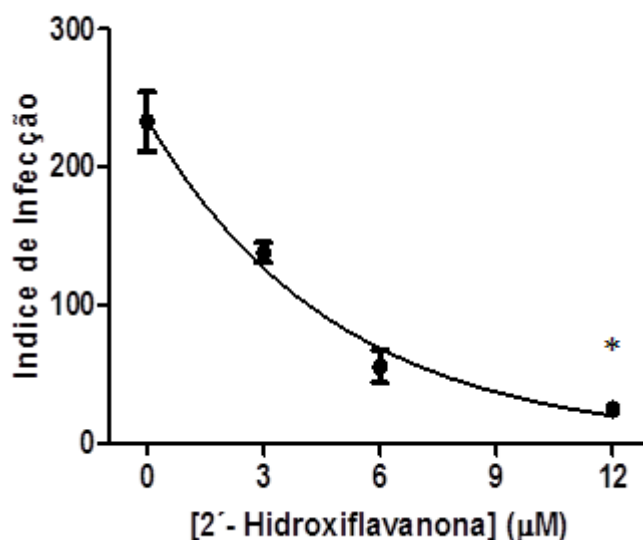
**Figura 4.7** Efeito de enzimas antioxidantes em *L. amazonensis* tratadas com 2'-hidroxiflavanona. Promastigotas foram incubadas na presença ou ausência de 96 μM de 2'-hidroxiflavanona e em adição (A) NAC, GSH e GSSG [300 μM] e (B) CAT e PEG-CAT [500 U/L] por 24 horas. A avaliação da viabilidade celular foi feita por contagem direta de câmara de Neubauer Conforme descrito no item 3.4.4. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes com um n de 3.  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  (ANOVA).

#### 4.1.5 Atividade anti-amastigota da 2'-hidroxiflavanona

Depois de observar a atividade inibitória da 2'-hidroxiflavanona na forma promastigota, o próximo passo foi investigar um possível efeito da 2'-hidroxiflavanona na forma amastigota. Para isso, macrófagos peritoneais de camundongos suíços foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados na ausência ou na presença de 2'-hidroxiflavanona (3, 6 e 12 μM) por 72h. A 2'-hidroxiflavanona inibiu, de forma concentração dependente, o índice de infecção (razão entre o percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas), apresentando um  $IC_{50}$  de 3,38 μM (Figura 4.8). A inibição obtida foi de 88,4 % na maior concentração (12 μM).



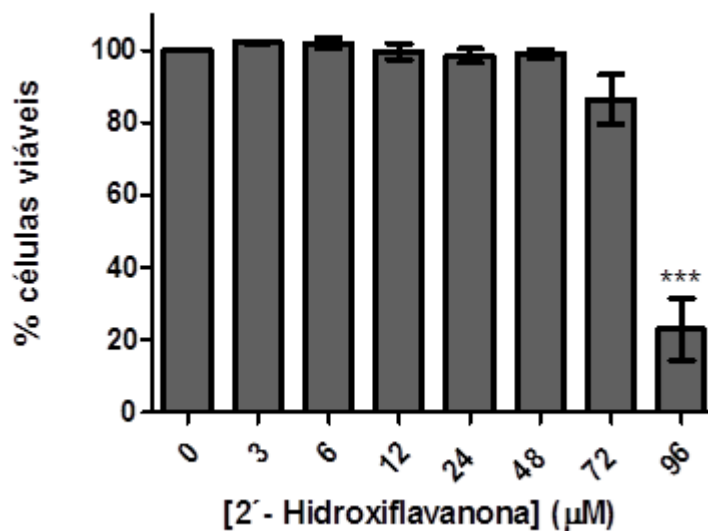
Para corroborar a eficácia da 2'-hidroxiflavanona na inibição de amastigotas, fotos foram obtidas a partir de lâminas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 2'-hidroxiflavanona (3-12  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4.10).



**Figura 4.8 Atividade anti-amastigota da 2'-hidroxiflavanona.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados e incubados com 2'-hidroxiflavanona (3, 6 e 12 $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A contagem dos macrófagos infectados foi feita por microscopia óptica e o índice de infecção foi calculado, conforme descrito no item 3.4.5. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes, com um n de 3.  $P < 0,05$  (ANOVA)

#### 4.1.6 Avaliação da citotoxicidade da 2'-hidroxiflavanona

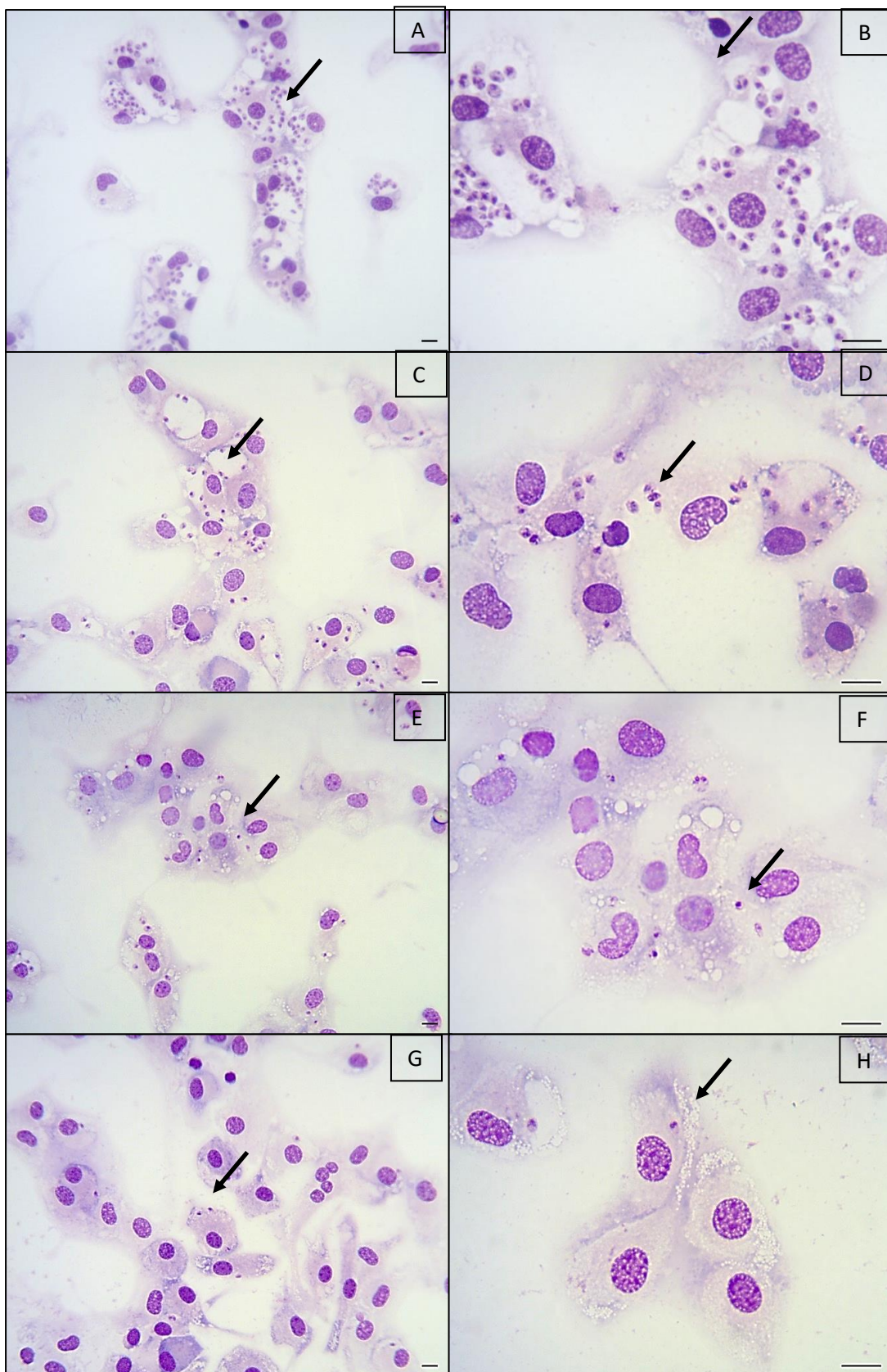
Para determinar a citotoxicidade sobre macrófagos, estes foram plaqueados na ausência ou presença da 2'-hidroxiflavanona (3-96  $\mu\text{M}$ ), sem infecção. A viabilidade celular foi mensurada empregando-se a resazurina. A 2'-hidroxiflavanona não apresentou diferenças significativas na viabilidade celular nas concentrações utilizadas em amastigotas (3, 6 e 12 $\mu\text{M}$ ), apresentando um  $\text{IC}_{50}$  de 72,02  $\mu\text{M}$  (Figura 4.9), resultando em um índice de seletividade de 21,30 (Tabela 4.1).



**Figura 4.9 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em macrófagos peritoneais murinos.** Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com 2'-hidroxiflavanona (3, 6 e 12µM) por 72 horas, sem infecção. A viabilidade foi mensurada utilizando resazurina, como descrito no item 3.4.6. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes com n de 3. P<0,05 (ANOVA)

**Tabela 4.1: Índice de seletividade da 2'-hidroxiflavanona**

IC <sub>50</sub> amastigota	IC <sub>50</sub> macrófagos	Índice de seletividade
3,38 µM	72,02 µM	21,30



**Figura 4.10** Efeito da 2'-hidroxiflavanona em amastigotas de *L. amazonensis*. Fotos obtidas a partir de lâminas de macrófagos peritoneais murinos, infectados com *L. amazonensis*, incubados com 2'-hidroxiflavanona e coradas com panótico rápido (Instant Prov) em dois diferentes aumentos. A e B- Controle; C e D- 3μM; E e F- 6μM; G e H- 12μM; Setas indicam amastigotas dentro dos vacúolos;

## 4.2 Ensaio in silico

Para avaliar o potencial da 2'-hidroxiflavanona como um futuro fármaco, usamos a plataforma pkCSM (Pires e cols, 2015 – disponível em <http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm>) para avaliar as propriedades farmacocinéticas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) da 2'-hidroxiflavanona. Avaliamos também suas características químicas de acordo com a “Regra dos Cinco” (Ro5) de Lipinski (Cheng et al. 2012; Lipinski 2004; Lipinski et al. 2001).

Interpretando os valores obtidos na avaliação ADMET de acordo com os valores de referência propostos pelo banco de dados (pkCSM), podemos observar na Tabela 4.2 que a 2'-hidroxiflavanona demonstra ter uma solubilidade em água mediana e uma boa absorção intestinal humana. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou permeável à pele (um fármaco é considerado pouco permeável se  $\log K_p > -2,5$ ) e também a Caco-2 (alta permeabilidade se  $P_{app} > 8 \times 10^{-6}$  cm/s). Em relação as P-glicoproteínas, a 2'-hidroxiflavanona não se mostrou inibidora, porém aparece como substrato. Este resultado significa que a 2'-hidroxiflavanona não se mantém acumulada dentro da célula.

Para distribuição, a 2'-hidroxiflavanona demonstra uma boa permeabilidade a barreira hemato-encefálica ( $< -1$  indica baixíssima permeabilidade enquanto  $> 0,3$  indica permeabilidade total), além de demonstrar uma boa permeabilidade ao sistema nervoso central (considera-se  $\log PS < -3$  não permeável, enquanto  $\log PS > -2$  é considerado permeável).

Quanto ao metabolismo, a 2'-hidroxiflavanona mostrou não ser substrato de nenhuma CYP, sendo inibidora da CYP450 2C19 e CYP450 1A2. Em termos de excreção, a 2'-hidroxiflavanona demonstrou um bom *clearance* (1,2 ml/min/kg), similar ao da creatinina (1,4 ml/min/kg), além de não se mostrar substrato renal de OCT2, o que poderia trazer reações adversas ao tratamento. OCTs são transportadores orgânicos de cátion (*Organic Cation Transporters*), proteínas transmembranas associadas ao fígado (OCT1) e aos rins (OCT2). Quando um fármaco, molécula ou composto demonstra algum tipo de associação com a OCT2, seu *clearance* diminui e sua excreção é afetada, podendo trazer problemas ao organismo (Giacomini e cols, 2010). Por último, avaliando os parâmetros de toxicidade, a 2'-hidroxiflavanona demonstrou não ser hepatotóxica, não provocar sensibilidade à pele, não ser bloqueador de canais de potássio (não interfere nos genes hERG), além de nos mostrar os valores preditivos de dose da 2'-hidroxiflavanona tanto em humanos quanto em modelo murino.

Tabela 4.2: Propriedades ADMET da 2'-hidroxiflavanona

Propriedades	Modelo	Valores
Absorção	Solubilidade em água	-3,701 log mol/L
	Permeabilidade Caco 2	1,327 log mol/L
	Absorção intestinal (humana)	96,218 %
	Permeabilidade da pele	-2,805 log Kp
	Substrato P-glicoproteína	SIM
	Inibidor P-glicoproteína I	NÃO
	Inibidor P-glicoproteína II	NÃO
Distribuição	Volume de distribuição estável (humana)	-0,32 log L/Kg
	Fração desacoplada (humana)	0,177 Fu
	Permeabilidade barreira hemato-encefálica	0,219 Log BB
	Permeabilidade SNC	- 1,375 Log PS
Metabolismo	Substrato CYP2D6	NÃO
	Substrato CYP3A4	NÃO
	Inibidor CYP1A2	SIM
	Inibidor CYP2C19	SIM
	Inibidor CYP2C9	NÃO
	Inibidor CYP2D6	NÃO
	Inibidor CYP2A4	NÃO
Excreção	Eliminação total	0,044
	Substrato Renal OCT2	NÃO
Toxicidade	Dose máxima tolerada (humano)	18,88mg/kg/dia
	Inibidor hERG I	NÃO
	Inibidor hERG II	NÃO
	Toxicidade oral aguda (rato) (LD50)	2,185 mol/kg
	Toxicidade oral crônica (rato) (LOAEL)	185,78 mg/kg/dia
	Hepatotoxicidade	NÃO
	Sensibilização da pele	NÃO

A Regra dos 5 de Lipinski tem como base a avaliação de descritores moleculares. Esses parâmetros são: peso molecular menor que 500, LogP menor que 5, máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio e máximo de dez grupos aceptores de ligação de hidrogênio. A 2'-hidroxiflavanona também mostrou não violar a Regra dos Cinco de Lipinski, tendo seus valores dentro dos parâmetros. (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3: Regra dos 5 de Lipinski da 2'-hidroxiflavanona**

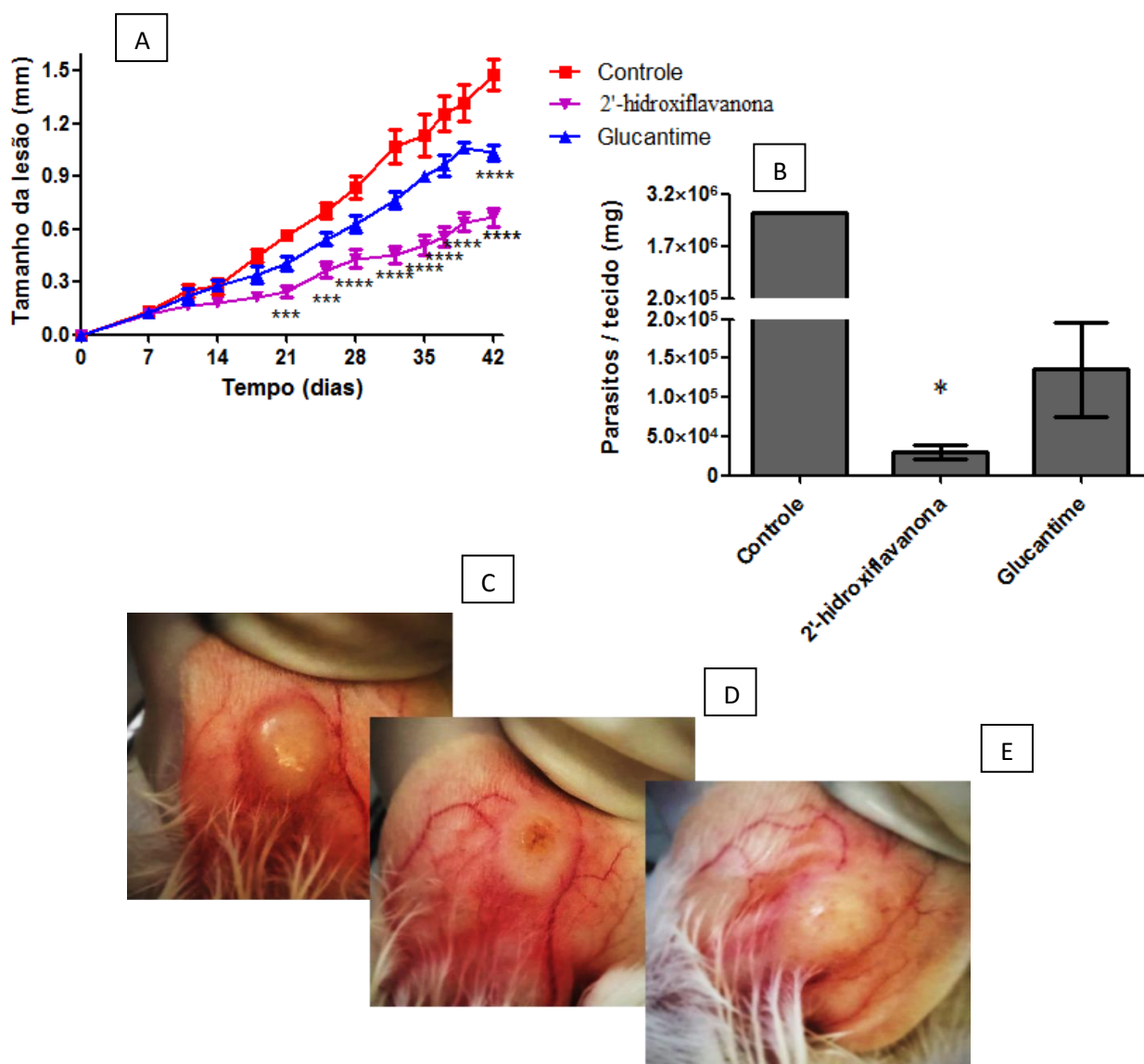
<b>Regras de Lipinski</b>	<b>Valores</b>
<b>Aceptores ligantes de H (HBA ≤ 10)</b>	3
<b>Doadores ligantes de H (HBD ≤ 5)</b>	1
<b>miLogP (≤ 5)</b>	3,123
<b>n-ROTB (≤ 10)</b>	1
<b>Peso molecular (≤ 500)</b>	240,25
<b>Violações</b>	0

Juntos, esses parâmetros ditam a disponibilidade oral do candidato e a avaliação presente nas tabelas 4.2 e 4.3 sugerem a 2'-hidroxiflavanona como uma boa candidata para administração via oral.

### 4.3 Ensaio in vivo

A partir dos efeitos promissores *in vitro* da 2'-hidroxiflavanona e sua avaliação *in silico*, o passo seguinte foi avaliar seu efeito *in vivo*, em modelo murino de leishmaniose cutânea. Promastigotas -  $1 \times 10^6/10\mu\text{L}$  - foram inoculadas na orelha de camundongos machos BALB/c. Após 7 dias, iniciou-se o tratamento via oral, um grupo tratado com 50mg/kg/dia de 2'-hidroxiflavanona e um grupo controle, recebendo apenas o veículo da droga, OraPlus, veículo usado para facilitar a suspensão de compostos que sejam pouco solúveis em água. Como controle positivo, foi utilizado o antimoniato de meglumina (Glucantime, referência para o tratamento da leishmaniose), por via intraperitoneal, 100mg/kg/dia. A 2'-hidroxiflavanona

mostrou-se clara e significativamente eficiente a partir do dia 21 pós infecção em comparação com o antimoniato que só se mostrou eficiente a partir do dia 32. Após a eutanásia, a carga parasitária foi determinada por diluição limitante. A 2'-hidroxiflavanona provocou uma redução significativa de parasitos na lesão comparada ao fármaco de referência. O controle da infecção pode ser observado pelo tamanho da lesão (Figura 4.11A), pela quantificação da carga parasitária (Figura 4.11B) e também pelas fotos ilustrativas das orelhas infectadas, demonstrando uma significativa redução da lesão em relação ao controle (Figura 4.11C-E).



**Figura 4.11 Efeito *in vivo* da 2'-hidroxiflavanona.** (A) Tamanho da lesão; (B) Carga parasitária; (C-E) Fotos ilustradas da lesão (C-Controle; D- 2'-hidroxiflavanona; E-Glucantime). Camundongos BALB/c foram inoculados na orelha direita com promastigotas de *L. amazonensis*. Após 7 dias de infecção, foram tratados com veículo ou 50mg/kg/dia de 2'-hidroxiflavanona via oral e 100mg/kg/dia de antimoniato de meglumina via intraperitoneal, como descrito no item 3.46.1. As orelhas foram medidas com auxílio de um paquímetro, 2 vezes por semana. Os camundongos foram eutanasiados após 35 dias de tratamento e a carga parasitária foi determinada por diluição limitante, conforme descrito no item 3.6.2. O sangue foi recolhido pelo método de punção cardíaca para análise bioquímicas e hematológicas como descrito no item 3.6.3. Os valores são referentes a média de 2 experimentos, cada um com um n de 5; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001;

Parâmetros bioquímicos hepáticos como alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), e para a função renal como a creatinina, são de extrema importância para verificar a toxicidade do tratamento. Para isso, o soro foi coletado a partir do sangue retirado dos animais e dosado para os parâmetros citados. Além de parâmetros sorológicos, a análise de parâmetros hematológicos também se torna importante. Como visto na literatura, a 2'-hidroxiflavanona demonstra inibir células tumorais (Nagaprashanta e cols, 2011), que são destacadas por possuírem uma alta capacidade proliferativa. Portanto, uma parte do sangue coletado foi enviada para a plataforma de análises clínicas de animais de laboratório da FIOCRUZ, para realização de hemograma completo, para avaliar qualquer tipo de dano à proliferação celular. A 2'-hidroxiflavanona mostrou não alterar parâmetros toxicológicos, além de não alterar significativamente parâmetros hematológicos (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4 Resultados dos testes Hematológicos e Bioquímicos**

	<b>Controle</b>	<b>2'-hidroxiflavanona</b>	<b>Glucantime</b>
<b>Série Vermelha</b>			
<b>Hemácias</b>	11,66 ±0,094	11,35 ±0,096	10,92 ±0,12
<b>Hemoglobina</b>	16,32 ±0,21	16,18 ±0,15	15,2 ±0,15
<b>Hematócrito</b>	56,34 ±0,61	56,36 ±0,55	54,18 ±0,934
<b>MCV</b>	48,32 ±0,18	50,21 ±0,28	50,27 ±0,36
<b>MCH</b>	14,12 ±0,14	14,37 ±0,123	14,06 ±0,154
<b>MCHC</b>	29 ±0,11	28,63 ±0,16	28,17 ±0,292
<b>Série Branca</b>			
<b>Plaquetas</b>	1472,3 ±27,35	1356,5 ±69,78	1299,2 ±30,90
<b>Leucócitos</b>	6,83 ±0,213	5,88 ±0,70	7,8 ±1,152
<b>Bioquímica</b>			
<b>Creatinina</b>	0,1	0,1	0,1
<b>ALT</b>	0,1	0,1	0,1
<b>AST</b>	0,1	0,1	0,1

Resultados obtidos a partir das amostras de sangue e soro enviadas para plataforma de análises clínicas de animais de laboratório/Fiocruz; os valores são referentes a 2 experimentos independentes, cada um com um n de 5.



#### **4.4 Efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência em promastigotas de *L. amazonensis***

A necessidade de novas alternativas quimioterápicas levou a uma mudança no quadro de pesquisa para o tratamento da leishmaniose. Além da busca por produtos naturais, a combinação de drogas, de referência ou não, também passou a ser estudada. Com o objetivo de investigar o efeito da associação da 2'-hidroxiflavanona com fármacos de referência como anfotericina B, antimonio e miltefosina, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com os compostos sozinhos, ou em combinação, respeitando as proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, diluídas seriadamente em base 2 por 72 horas em placas de 96 poços. As concentrações máximas utilizadas foram: 96  $\mu\text{M}$  de 2'-hidroxiflavanona, 50  $\mu\text{M}$  de antimonial e miltefosina e 1  $\mu\text{M}$  de anfotericina B. As curvas sigmoidais de regressão foram utilizadas para determinar o  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$ . Para cada razão, um valor de  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$  foi calculado para cada um dos fármacos. A análise dos dados se deu por meio da construção de isobogramas utilizando os  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$  (Figura 4.12 e 4.13, Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7), bem como os índices de concentração inibitória fracionais ( $\text{FICI}_{50}$  e  $\text{FICI}_{90}$ ), calculados de acordo com a equação descrita (Seifert e cols, 2011). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram utilizados para analisarmos o tipo de efeito obtido na associação de acordo com o estabelecido pela literatura  $\text{FICI} \leq 0,5$  – sinergismo;  $0,5 < \text{FICI} < 4$  – aditivo;  $\text{FICI} \geq 4$  – antagonismo (Odds, 2003). Podemos então observar, pelos valores de somatório do  $\text{FICI}_{50}$  e  $\text{FICI}_{90}$  (1,01 e 1,18 para anfotericina B, 0,6 e 1,21 para o antimônio e 1,1 e 1,03 para a miltefosina, respectivamente) que as associações da 2'-hidroxiflavanona com os fármacos se mantiveram dentro da linha de aditividade. Nas tabelas apresentadas demonstramos a comparação entre os  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$ , além do  $\text{FICI}_{50}$  e  $\text{FICI}_{90}$  e seu somatório para as associações.

Tabela 4.5 IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona e dos fármacos de referência

	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>90</sub> (μM)
<b>2'-hidroxiflavanona</b>	31,64 ± 2,53	83,23 ± 2,98
<b>Anfotericina B</b>	0,5737 ± 0,03	0,8505 ± 0,66
<b>Antimônio</b>	36,32 ± 0,089	54,22 ± 0,18
<b>Miltefosina</b>	9,793 ± 0,04	18,19 ± 0,32

Tabela 4.6 FICI<sub>50</sub> e FICI<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona em combinação com os fármacos de referência

Proporção	2'-hidroxiflavanona + Anfotericina B		2'-hidroxiflavanona + Antimônio		2'-hidroxiflavanona + Miltefosina	
	FICI <sub>50</sub>	FICI <sub>90</sub>	FICI <sub>50</sub>	FICI <sub>90</sub>	FICI <sub>50</sub>	FICI <sub>90</sub>
<b>4:1</b>	0,81	0,65	0,60	0,63	1,01	1,33
<b>3:2</b>	1,02	1,30	0,79	0,68	0,90	0,83
<b>2:3</b>	1,10	1,10	0,64	2,56	1,17	0,91
<b>1:4</b>	1,13	1,62	0,62	0,98	1,31	1,05

Tabela 4.7 Média do somatório de FICI<sub>50</sub> e FICI<sub>90</sub> da 2'-hidroxiflavanona em combinação com fármacos de referência

Combinação	xΣ FICI <sub>50</sub> + SEM	xΣ FICI <sub>90</sub> + SEM
<b>2'-hidroxiflavanona + Anfotericina B</b>	1.01 ± 0.061	1,18 ± 0,176
<b>2'-hidroxiflavanona + Antimônio</b>	0.66 ± 0.045	1,21 ± 0,394
<b>2'-hidroxiflavanona + Miltefosina</b>	1.10 ± 0.077	1,03 ± 0,951

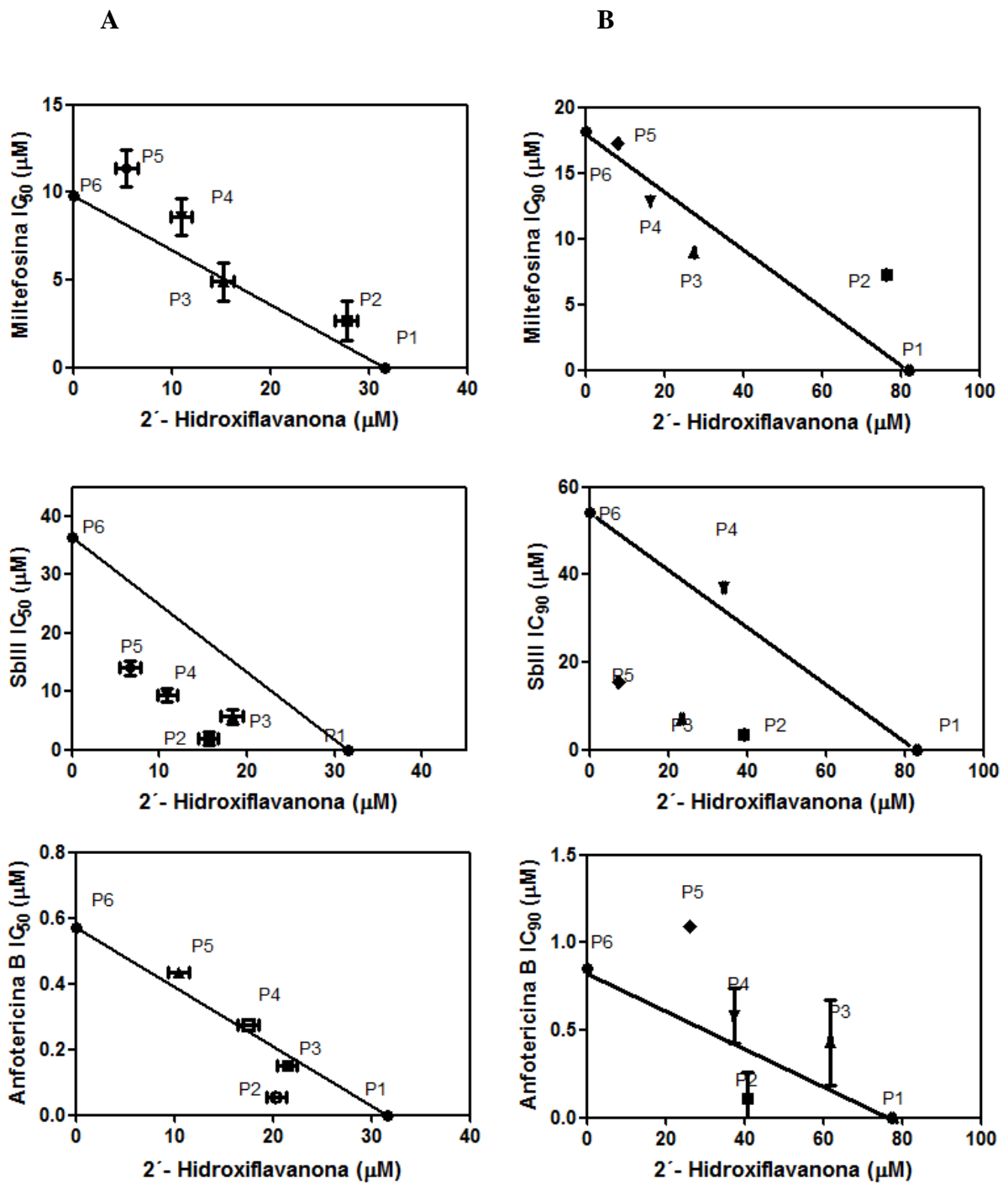


Figura 4.12 Isobogramas gerados a partir dos valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> obtidos da associação da 2'-hidroxiiflavanona com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose. (Coluna A) Valores de IC<sub>50</sub> de cada associação (Coluna B) Valores de IC<sub>90</sub> de cada associação. Pontos P1 a P6 correspondem à 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5.

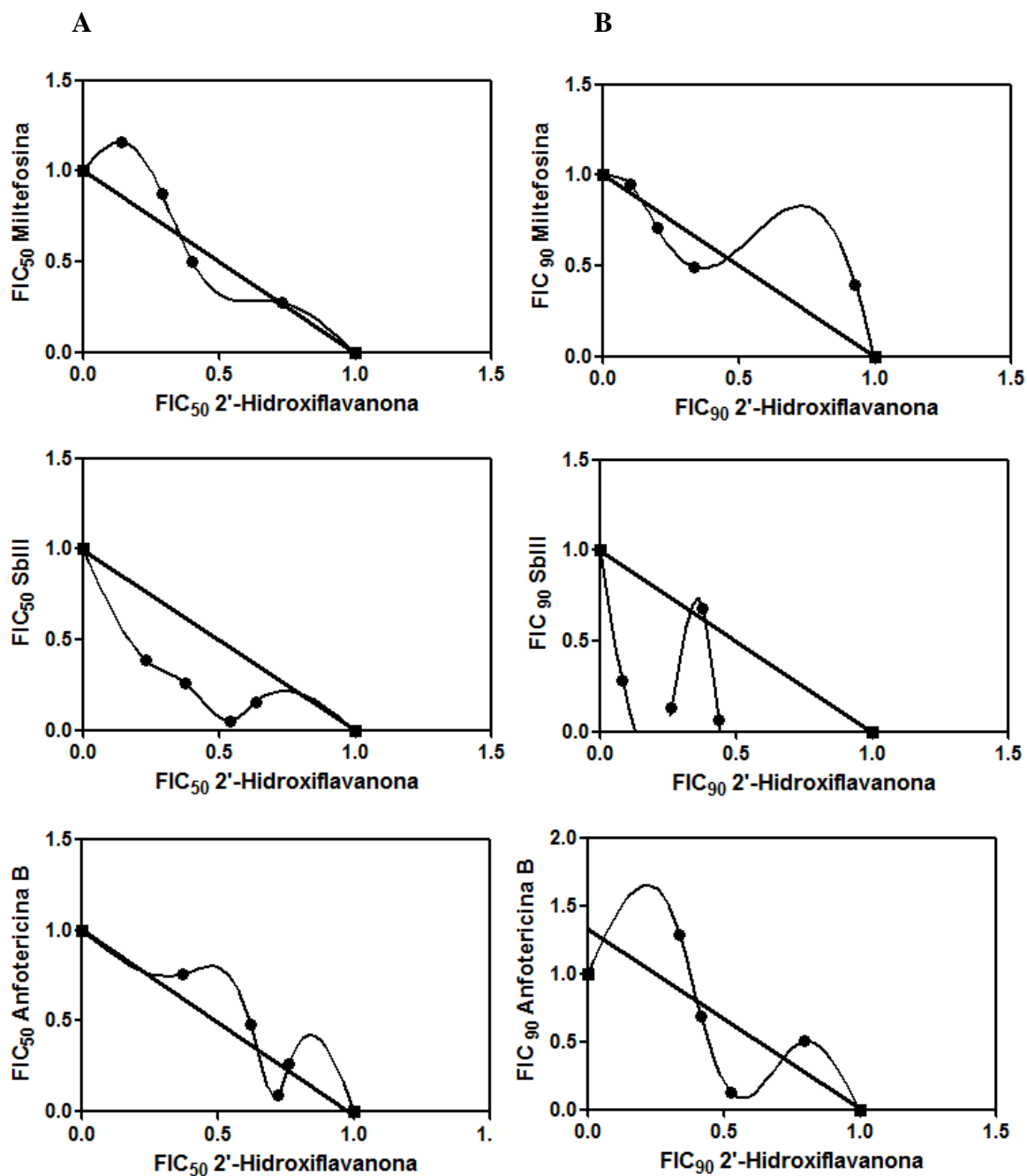
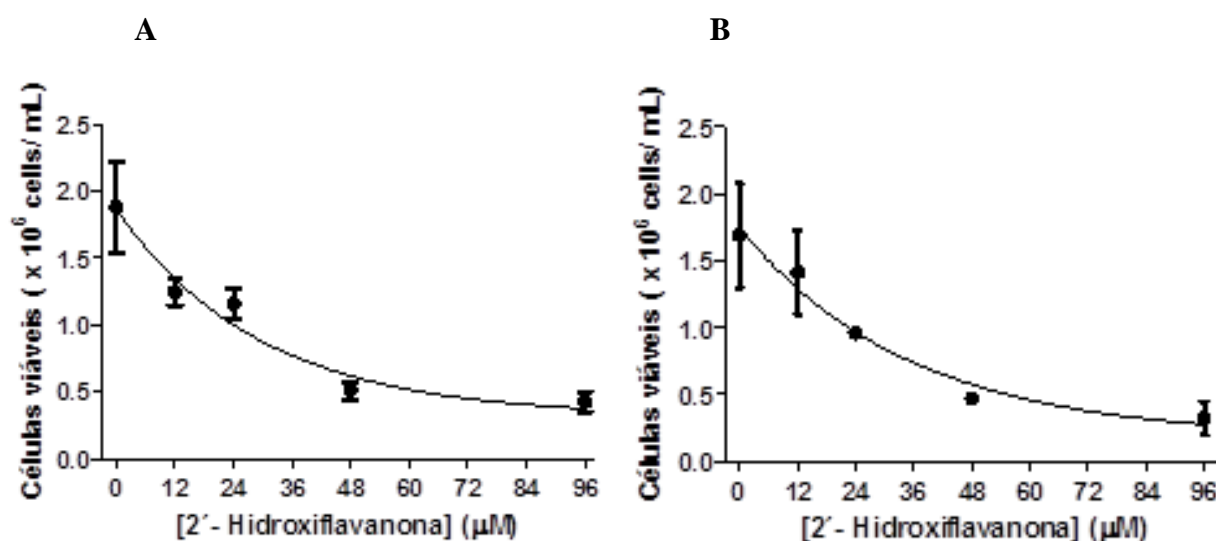


Figura 4.13 Isobogramas gerados a partir do valor de  $FICI_{50}$  e  $FICI_{90}$  obtidos a partir da associação da 2'-hidroxiiflavanona com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose. (Coluna A) Valores do  $FICI_{50}$  da associação da 2'-hidroxiiflavanona com Anfotericina B, Antimônio e Miltefosina, respectivamente. (Coluna B) Valores do  $FICI_{90}$  da associação da 2'-hidroxiiflavanona com Anfotericina B, Antimônio e Miltefosina. A linha traçada corresponde à linha de aditividade.

#### 4.5 Efeito da 2'-hidroxiflavanona em *Leishmania amazonensis* tartarato de antimônio e potássio-resistentes

Um dos grandes problemas da quimioterapia atual é a geração de resistência pelos fármacos de referência. Como solução tem sido buscado cada vez mais compostos que sejam efetivos em células resistentes. Para testar um possível efeito da 2'-hidroxiflavanona em células desse tipo, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas com concentrações crescentes a partir do IC<sub>50</sub> de tartarato de antimônio e potássio pré-estabelecido (16μM). Ao atingirem a passagem com 10x a concentração do IC<sub>50</sub>, elas foram analisadas quanto a sua resistência. Um novo IC<sub>50</sub> foi determinado, chegando à 108,3μM na célula sensível e 1583μM na célula resistente, provando sua resistência em 14,7 vezes. Vale ressaltar que a célula sensível utilizada na comparação com a resistente passou pelo mesmo número de passagens (32). A partir daí investigamos um possível efeito da 2'-hidroxiflavanona sobre promastigotas resistentes ao tartarato de antimônio e potássio. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou efetiva ao inibir a proliferação das células resistentes, chegando a um IC<sub>50</sub> muito similar ao IC<sub>50</sub> da célula sensível de mesmo número de passagens (Figura 4.14, Tabela 4.8) e também da célula sensível recente (Tabela 4.8).



**Figura 4.14** Efeito da 2'-hidroxiflavanona em células resistentes ao tartarato de antimônio e potássio: Após obtida resistência, promastigotas –sensíveis (A) e –resistentes (B), ambas com 32 passagens foram incubadas com diferentes concentrações de 2'-hidroxiflavanona por 24 horas. A viabilidade foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.4.8.

**Tabela 4.8** Comparação entre IC<sub>50</sub> de células -sensíveis e -resistentes tratadas com 2'-hidroxiflavanona por 24horas

IC <sub>50</sub> –sensíveis (5 passagens)	IC <sub>50</sub> –sensíveis (32 passagens)	IC <sub>50</sub> –resistentes (32 passagens)
20,96 μM	20,41 μM	24,34 μM

## 5 Discussão

O cenário atual da quimioterapia para leishmaniose é cercado de efeitos colaterais, altos custos e resistência (Gasser e cols, 1994; Sundar e cols 1998). A necessidade de buscar novos fármacos e alvos terapêuticos que apresentem maior eficácia, facilidade e menor toxicidade, vem crescendo nas últimas décadas. O surgimento de novas alternativas quimioterápicas tem deslanchado no contexto atual, como novas formulações de fármacos conhecidos, o uso de nanopartículas e a terapia combinada (Croft e cols, 2011).

Um dos grandes problemas atuais é a resistência clínica (Sundar e cols 2011, Oullette e cols, 2004.). Sabe-se também, que a resistência ao antimônio pode ser induzida por pressão farmacológica em laboratório (Liarte e cols, 2013), porém o mecanismo de ação ainda é misterioso.

Na tentativa de diminuir os efeitos colaterais e resistência, a busca por produtos naturais tem crescido cada vez mais (Ndjonka e cols, 2013) e o destaque vem sendo dos metabólitos secundários, dentre eles os flavonoides. Estes pertencem ao grupo dos polifenóis e são sintetizados por plantas (Schmidt e cols 2012a; Schmidt e cols 2012b). Devido às suas propriedades farmacológicas, vem recebendo destaque por possuírem atividades antivirais, antiinflamatórias, antineoplásicas, tripanossomicidas e leishmanicidas (Weston e Mathesius, 2013; Aboulaila e cols, 2010; Güida e cols, 2007; Hoensch e Oertel, 2012; Fonseca-Silva e cols, 2011, Inácio e cols, 2012). Ainda hoje, muitos estudos desses metabólitos não avançaram além dos ensaios *in vitro*. Muitos devido a resultados negativos obtidos em um *screening* inicial, outros a problemas de toxicidade *in vitro* e uma grande maioria possui resultados promissores, porém, aguardam para serem testados (Schmidt e cols, 2012a e b).

Este estudo descreve a avaliação do potencial da 2'-hidroxiflavanona de abranger essas novas vertentes da quimioterapia atual, sendo um produto natural com efeito leishmanicida e, tendo ou não um possível efeito em células resistentes e combinação com fármacos de referência. Um passo essencial para o desenvolvimento de um novo fármaco é estudar seu mecanismo de ação.

Nosso grupo vem estudando ao longo dos anos os efeitos de moléculas naturais em tripanosomatídeos. Em estudos anteriores, foi observado o efeito de flavonoides como a apigenina (flavona), quercetina (flavonol) e epigallocatequina-3-galato (Fonseca e Silva e cols, 2011; Fonseca e Silva e cols, 2015; Inácio e cols, 2014), que mostraram promissores. Analisando todos os resultados da investigação do mecanismo de ação da 2'-hidroxiflavanona, podemos ver algumas semelhanças e diferenças no efeito desses flavonoides.

Observando a figura 4.1 nota-se que 2'-hidroxiflavanona foi capaz de inibir a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* de maneira concentração dependente, apresentando um IC<sub>50</sub> de 20,96 µM, em 24h, com uma inibição de 74% na maior concentração utilizada (96 µM). Comparando este efeito da 2'-hidroxiflavanona com outros flavonoides, observamos uma similaridade com o efeito causado em promastigotas de *L. amazonensis* em 24 horas pela apigenina, já estudada pelo grupo. O IC<sub>50</sub> apresentado pela apigenina é de 23,7µM, um valor parecido com o IC<sub>50</sub> da 2'-hidroxiflavanona. Dentre os flavonoides estudados pelo grupo como a quercetina, que tem seu efeito em 48 horas, e a epigallo catequina 3-gallato, a 2'-hidroxiflavanona demonstra ter o menor IC<sub>50</sub> com ação em menor tempo.

Estudos em tripanosomatídeos, alguns inclusive do nosso grupo, correlacionam o aumento de ROS com a perda de potencial de membrana mitocondrial, (Menna-Barreto, 2009; Inácio e cols, 2014; Fonseca e Silva, 2012). Com o intuito de investigar o mecanismo de ação, foi avaliado o efeito da 2'-hidroxiflavanona no potencial de membrana mitocondrial e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *L. amazonensis*. Na Figura 4.3 podemos observar que a 2'-hidroxiflavanona se mostrou capaz de provocar a despolarização da membrana mitocondrial em 24 horas de maneira concentração dependente, enquanto na Figura 4.5, observamos um aumento concentração dependente na produção de ROS. Interpretando estes resultados podemos sugerir uma ligação direta entre a inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, a perda do potencial de membrana mitocondrial e o aumento nos níveis de ROS. A Figura 4.6 ajuda a fortalecer essa ligação, mostrando uma correlação linear extremamente positiva entre estes 3 fatores, com valores de R<sup>2</sup> bem próximos de 1 (Figura 4.6A – R<sup>2</sup>=0,96; B - R<sup>2</sup> = 0,94; C - R<sup>2</sup>=0,97)

Analisando os flavonoides estudados pelo grupo percebemos a similaridade de efeitos provocados por estes em promastigotas de *L. amazonensis*. A epigallo catequina 3-gallato, a quercetina e a apigenina são capazes de provocar despolarização da membrana mitocondrial e também um aumento dos níveis de ROS. Curiosamente, a 2'-hidroxiflavanona difere destas por sua correlação sugerir que o aumento de ROS é uma consequência e não a causa da despolarização mitocondrial.

Investigando possíveis efeitos imediatos, promastigotas foram incubadas por 3 horas com 2'-hidroxiflavanona, mostrando um efeito similar ao de 24 horas, chegando a um IC<sub>50</sub> de 21,59 µM. Lazarin-Bidoida e colaboradores (2013) demonstraram os efeitos do eupomateoide-5 em *Tripanosoma cruzi*, em 3 horas. Eupomateoide-5 pertence à classe das neolignanas, substâncias fenólicas extraídas de folhas de plantas. Neste estudo, essa neolignana foi capaz de causar danos à membrana mitocôndrial do parasito, provocando aumento nos níveis de ROS. A

2'-hidroxiflavanona se mostrou capaz de aumentar os níveis de ROS já em 3 horas (Figura 4.5), demonstrando efeitos similares a esta molécula, ambos produtos naturais.

Para investigar então se o aumento nos níveis de ROS seria uma possível causa ou consequência da despolarização mitocondrial, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com 2'-hidroxiflavanona e moléculas antioxidantes e enzimas. A Glutathione é uma molécula antioxidante componente da tripanotona, sistema de destoxificação do parasito (Comini e cols., 2004). Ela se apresenta sob as formas oxidada (GSSG) e reduzida (GSH). Em situações de estresse oxidativo, a GSH reduz ROS, formando grandes quantidades de GSSG (Lu, 1999). Já a N-acetilcisteína é uma substância sintética que, devido ao seu grupo tiol, funciona como antioxidante, além de ser capaz de induzir o aumento da glutathione intracelular. Catalase e PEG-Catalase (polietilenoglicol-catalase possui uma cadeia lipofílica, sendo capaz de atravessar a membrana com mais facilidade) são enzimas capazes de transformar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em subprodutos que um organismo é capaz de eliminar (H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>).

O tratamento com esses antioxidantes mostrou não ser eficaz em proteger as células da inibição provocada pela 2'-hidroxiflavanona (Figura 4.7). Este resultado fortalece a ideia de que a mitocôndria é o alvo primário da 2'-hidroxiflavanona e como consequência, há um aumento de ROS. Comparando com outros produtos naturais, este resultado se mostra bastante similar à outro protótipo estudado pelo grupo, a LQB-118, uma pterocarpanoquinona. Estudos mostram que a LQB-118 age diretamente na mitocôndria do parasito e quando incubada com antioxidantes, estes também não são capazes de reverter o efeito inibitório por ela provocado (Ribeiro e cols, 2013).

Após demonstrar a atividade da 2'-hidroxiflavanona na forma encontrada no inseto vetor, fomos investigar se o composto também seria eficaz na forma intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado. Assim como em promastigotas, a 2'-hidroxiflavanona também se mostrou eficiente no controle da infecção causada por *L. amazonensis* em macrófagos murinos, no tempo de 72 horas (Figura 4.8). A 2'-hidroxiflavanona não foi tóxica para os macrófagos murinos (Figura 4.9), mostrando uma inibição dose-dependente na proliferação das amastigotas intracelulares (Figura 4.8 e 4.10). A Tabela 4.1 indica os valores de IC<sub>50</sub> dos macrófagos e amastigotas quando submetidas ao tratamento com 2'-hidroxiflavanona por 72 horas. A partir desses dados, foi calculado o índice de seletividade. Segundo Weniger e cols, 2001, considera-se que a eficácia biológica não é devido à citotoxicidade *in vitro* quando este índice é  $\geq 10$ . Nesse caso, 2'-hidroxiflavanona mostrou-se bastante seletiva em induzir danos apenas nas amastigotas intracelulares, apresentando um índice de seletividade de 21,30 em 72 horas.



Comparando os dados do grupo, a 2'-hidroxiflavanona demonstra ser mais seletiva para a amastigota do que a Quercetina e a Apigenina, flavonoides estudados pelo grupo. Ambas possuem índice de seletividade igual a 16,8 e 18,18 respectivamente, embora o IC<sub>50</sub> para amastigota da 2'-hidroxiflavanona seja similar ao da Quercetina, com valores de 3,38 µM e 3,4 µM respectivamente. A LQB 118, testada por Costa e cols. (2014), demonstrou atividade também em *L. braziliensis*, demonstrando um IC<sub>50</sub> de 3,4 µM em promastigotas, 7,5 µM em amastigotas e um perfil similar ao visto pelos flavonoides citados como o aumento de ROS e despolarização da membrana mitocondrial.

Flavonoides como a Strychnobiflavona, estudada por Lage e cols. (2015) em *L. infantum*, e a Vitecetina, estudada por Rudrapaul e cols. (2014) em *L. donovani*, demonstrar um perfil diferente de mecanismo de ação dos flavonoides estudados pelo grupo. Ambas tiveram um IC<sub>50</sub> menor que a 2'-hidroxiflavanona, 5,4 µM e 2,4 µM, respectivamente. Já em termos de seletividade, a Vitecetina se mostrou muito seletiva com um índice de 133, diferente da Strychnobiflavona, que demonstrou um índice de 6,6. Curiosamente, a Strychnobiflavona não foi capaz de promover aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e não provocou despolarização da membrana mitocondrial. Já a Vitecetina parece atuar aumento os níveis de NO, modulando a expressão da enzima iNOS2 (óxido nítrico sintase induzida).

Observando os dados *in vitro* de mecanismo de ação e atividade leishmanicida, podemos observar as diferenças encontradas no efeito da 2'-hidroxiflavanona com os flavonoides citados. Essas diferenças podem estar relacionadas com a estrutura dos compostos e os substituintes. Voltando as Figuras 1.8 e 1.9, comparando as estruturas, observamos que as diferenças básicas são de posição e número de hidroxilas e a presença ou ausência de ligação dupla no anel B. Shin e cols. (2012) e Hsiao e cols. (2007) demonstram claramente esta diferença de atividade dentro uma mesma classe ou classe diferente. Os dois promovem experimentos em células de câncer, comparativos entre a flavanona, a taxolina (flavanonol) e algumas hidroxiflavanonas que diferem apenas na posição da hidroxila. Em ambos, a 2'-hidroxiflavanona demonstra ser mais efetiva do que a flavanona, a 3'-hidroxiflavanona, a 4'-hidroxiflavanona, a 6'-hidroxiflavanona, a 7'-hidroxiflavanona, a narigenina e a taxifolina. Em relação à quercetina e a apigenina por exemplo, a 2'-hidroxiflavona demonstra ter um efeito mais rápido, um mecanismo de ação aparentemente diferente, além de uma seletividade maior para amastigotas.

Um recurso que vem sendo cada vez mais utilizado é a análise *in silico* de moléculas. A vantagem dessa análise é, dentro a confiabilidade do banco de dados e da plataforma utilizada, poder aprovar ou descartar moléculas, caso seus parâmetros estejam muito fora dos valores de referência, além de auxiliar na escolha de doses e vias de administração. No intuito de

extrapolar os efeitos *in vitro* observados da 2'-hidroxiflavanona para o modelo *in vivo*, avaliamos as propriedades ADMET da 2'-hidroxiflavanona (Tabela 4.3) bem como sua aderência na regra dos 5 de Lipinski (Tabela 4.4).

Observando o resultado, os parâmetros analisados pela plataforma pkCSM e as regras de Lipinski, podemos inferir que a análise da 2'-hidroxiflavanona se mostrou favorável. Parâmetros como absorção intestinal, permeabilidade em Caco-2 (linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal), permeabilidade à barreira hematoencefálica, clearance e hepatotoxicidade sugerem a boa disponibilidade oral da 2'-hidroxiflavanona.

Ainda considerando a análise ADMET, a 2'-hidroxiflavanona se mostrou inibidora de 2 enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450 1A2 e 2C19), responsáveis pela metabolização de muitos fármacos como antidepressivos (clomipramina e imipramina), antipsicóticos (clozapina), agonistas ou antagonistas de receptores (propranolol, losartana), anti-inflamatórios não esteroidais (diclofenaco e ibuprofeno), e inibidores de bomba de prótons (omeprazol). Este resultado sugere que o uso da 2'-hidroxiflavanona pode atrapalhar o metabolismo desses fármacos, aumentando seus níveis séricos. Como ponto favorável, a 2'-hidroxiflavanona não mostrou ser um provável inibidor promíscuo das CYP450.

Parâmetros como P-glicoproteína e hERG compõem o entendimento da absorção e toxicidade da 2'-hidroxiflavanona. As P-glicoproteínas (Pgps) estão associadas diretamente com o fluxo e efluxo de fármacos dentro das células (Padowski e Pollack, 2010). Quando inibidas, as Pgps interrompem o efluxo dos fármacos, provocando seu acúmulo dentro das células. Esse acúmulo pode ser prejudicial para a célula. Além disso, a inibição de Pgps pode interferir com a farmacocinética de outros fármacos se houver administração concomitante, prejudicando assim seus efeitos. O gene hERG é responsável por codificar uma subunidade de canais de potássio, conhecido por controlar diretamente os impulsos elétricos do coração. Uma vez bloqueados, esses canais provocarão alterações cardíacas sérias, que pode levar a toxicidade do organismo como um todo.

Além dos parâmetros clássicos das plataformas de análise ADMET, a pkCSM ainda nos dá os valores preditivos para dose de administração da 2'-hidroxiflavanona para humanos e também para modelo de roedor. Esses valores ajudam a escolha de doses possíveis para experimentos *in vivo*.

Quando comparada, na análise de parâmetros de Lipinski, à fármacos de referência como a miltefosina e o antimoníato de meglumina (Glucantime), a 2'-hidroxiflavanona se mostra favorável já que os dois fármacos citados violam, cada um, uma regra, enquanto a 2'-hidroxiflavanona não possui nenhuma violação.

A partir dessas análises, foi realizado o estudo *in vivo*, utilizando a dose de 50mg/kg/dia. Esta dose foi estipulada após os resultados dos parâmetros ADMET onde a análise sugere uma dose máxima tolerada de 18,88 mg/kg/dia para humanos. A conversão desse valor para modelo murino foi feita através da fórmula: Dose animal = km humano/km animal x dose humano, onde o km murino é 3 e o humano 37, chegando ao valor proposto de uma dose de 232,85 mg/kg. Definida a dose, iniciou-se o tratamento. A lesão foi medida 2 vezes por semana para acompanhamento. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou efetiva no controle de lesão, tendo um efeito significativamente maior que o fármaco de referência (Figura 4.11). Além disso, testes sorológicos e hematológicos realizados mostraram que a 2'-hidroxiflavanona não provocou alterações significativas de parâmetros bioquímicos e hematológicos (Tabela 4.4), não sendo tóxica para os animais.

A importância de sugerir novas alternativas para o tratamento da leishmaniose não só em casos de resistência, provocou um crescimento dos estudos de uma terapia combinada (Das e cols, 2001). Um grande exemplo é a combinação entre a paramomicina e o estibugluconato de sódio que, incentivada pelo DNDi, foi implementada em 2010 pela OMS na África (DNDi, 2016). Apesar das doses de ambos não terem sido diminuídas, houve a diminuição do tempo de tratamento (de 30 para 17 dias), um menor custo, além de alcançar resultados melhores a longo prazo.

Ao longo dos anos, com os resultados positivos das combinações estudadas, metodologias foram aperfeiçoadas para provar a eficiência da associação de compostos (Croft e cols, 2013). Avaliamos então o efeito da 2'-hidroxiflavanona em combinação com fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose, como a Anfotericina B, o Antimônio e a Miltefosina. Como em todo experimento de associação, espera-se que o efeito seja sinérgico, porém não podemos descartar a importância de um efeito aditivo. Em Mesquita e cols, 2013, a combinação de fármacos de referência com o nitazoxanide mostrou não ter um efeito geral sinérgico e sim aditivo, porém em algumas proporções de combinação, o valor do FICI se aproximou de um possível efeito sinérgico, mostrando que aquela combinação pode trazer resultados positivos, como menores efeitos colaterais e toxicidade. Ao observar os resultados da 2'-hidroxiflavanona em promastigota, vemos que esta seguiu o mesmo padrão citado acima, mostrando no geral um efeito aditivo, porém em algumas proporções, um efeito bem próximo de sinérgico (Figuras 4.13 e 4.14, Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7). O próximo passo será investigar esse efeito da associação em amastigotas intracelulares.

Sabemos que um dos grandes problemas da quimioterapia atual é a geração de resistência, e esta, está muito ligada ao medicamento de primeira escolha, os antimoniais (Oullette et all, 2004). Assim, induzimos resistência por pressão farmacológica (Liarte e cols,

2011) em promastigotas de *L. amazonensis*, até chegar a 10 vezes o IC<sub>50</sub> previamente estabelecido. A confirmação da resistência foi feita, mostrando uma resistência de quase 15 vezes em relação as células sensíveis de mesma passagem. A partir daí foi avaliado o efeito da 2'-hidroxiflavanona em promastigotas resistentes ao tartarato de antimônio e potássio. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou efetiva, inibindo a proliferação de maneira concentração dependente (Figura 4.14), demonstrando ainda um IC<sub>50</sub> próximo ao IC<sub>50</sub> das promastigotas sensíveis ao tartarato de antimônio e potássio, 24,34 µM e 20,96 µM, respectivamente (Tabela 4.8).

Juntos, esses resultados sugerem o potencial da 2'-hidroxiflavanona de contemplar as três principais vertentes da quimioterapia atual da leishmaniose que são a busca por novos fármacos menos tóxicos e naturais (tendo uma boa atividade *in vitro* e *in vivo*), a possibilidade de uma terapia combinada bem sucedida e o efeito sobre células resistentes. A 2'-hidroxiflavanona se mostrou eficaz em preencher esses 3 quesitos, porém, estudos mais aprofundados sobre mecanismo de ação, farmacocinética, resistência, e combinação de fármacos precisam ser realizados para que, no futuro, a 2'-hidroxiflavanona possa entrar para o quadro quimioterápico da leishmaniose.

## 6 Conclusão

A 2'-hidroxiflavanona é capaz de inibir a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* a partir de 3 horas de tratamento, provocando um dano mitocondrial que leva ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio.

Enzimas e moléculas antioxidantes não são capazes de proteger promastigotas de *L. amazonensis* do efeito provocado pela 2'-hidroxiflavanona.

A 2'-hidroxiflavanona é capaz de diminuir o índice de infecção em macrófagos peritoneais murinos, demonstrando um bom índice de seletividade, não sendo tóxica para os macrófagos nas concentrações utilizadas.

O estudo *in silico* da 2'-hidroxiflavanona a coloca como uma boa candidata à administração oral por não violar a regra dos 5 de Lipinski e ter boas propriedades na avaliação ADMET.

A 2'-hidroxiflavanona, administrada por via oral, se mostrou capaz de diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária em relação ao controle e ao fármaco de referência utilizado no estudo *in vivo*.

A combinação entre a 2'-hidroxiflavanona e fármacos de referência mostrou ter efeito aditivo.

A 2'-hidroxiflavanona foi capaz de inibir a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao tartarato de antimônio e potássio (SbIII) de maneira similar à inibição provocada em células sensíveis.

Juntos, os resultados *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, sua associação e efeito em células resistentes, sugerem a 2'-hidroxiflavanona como uma boa possibilidade à quimioterapia da leishmaniose.

## 7 Referências Bibliográficas

Aboulaila M., Yokoyama N., Igarashi I. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology*. 2010;137(5):785–791.

Alves Ribeiro, G. Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona lqb-118 em *leishmania amazonensis*. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz/Ioc, 2011. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, 2011.

Bari AU. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. *Dermatol. Online J.* 2012; 18(2):4.

Bray PG, Barrett MP, Ward SA, De Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends Parasitol.* 2003. p. 232–9.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012; 142, w13659.

Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, et al. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* 2012; 52(11):3099–105.

Comini MA, Guerrero SA, Haile S, Menge U, Lünsdorf H, Flohé L. Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic. Biol. Med.* 2004 May;36(10):1289–1302.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003. p. 502–8.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;17:1478–83.

Czaplińska M, Czepas J, Gwoździński K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. *Postepy Biochem.* 2012; 58(3): 235-44.

David C V, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther.* 2009; 22(6):491–502.

Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11):2576–97.

Feijó, D., Tibúrcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C., Tavares, N. *Journal of Immunology Research* Volume 2016, Article ID 3967436, 9 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3967436>

Fidalgo LM & Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* 2011; 28(11), p. 2758-2770.

Fivelman, Q.L., I.S. Adagu, and D.C. Warhurst, Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(11): p. 4097-102.

Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2011; 6.

Fonseca-Silva, F., et al., *Effect of Apigenin on Leishmania amazonensis Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction.* *J Nat Prod*, 2015.

Fonseca-Silva, F.d., Estudo do efeito *in vitro e in vivo* da apigenina em *Leishmania amazonensis*, in *Instituto Oswaldo Cruz.* 2014, Fundação Oswaldo Cruz. p. 60.

Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent Antimonials: New perspectives for Old Drugs. *Molecules* 2009, 14, 2317-2336.

Gasser Ra JR, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. Clin infect dis. 1994 18(1), 83-90.

Giacomini KM, et al. (2010) Membrane transporters in drug development. Nature Reviews Drug Disc. 9(3):215-236

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev. Anti-Infective Ther. . 2010;8:419–33.

Griesven, J. V.; Diro, E.; Visceral Leishmaniasis Infect Dis Clin N Am 26 (2012) 309–322

Guida MC, Esteva MI, Camino A, Flawiá MM, Torres HN, Paveto C. Trypanosoma cruzi: in vitro and in vivo antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). Exp Parasitol, 2007. 117: 188–194.

Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. Mol Biol Int. 2011; 2011:571242.

Hoensch H. & Oertel R. Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids. DtschMed Wochenschr. 2012; 137(51-52): 2738-40.

Hsiao, Y.C., Kuo, W.H., Chen, P.N., Chang, H.R., Lin, T.H., Yang, W.E., Hsieh, Y.S., and Chu, S.C., *Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway*. Chem Biol Interact, 2007. **167**(3): p. 193-206.

Inácio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. *In vitro* and *in vivo* effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. J Nat Prod. 2013; 25; 76(10): 1993-6.



Inácio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*. 2012; 132(2): 151-5.

Inacio JDF, Gervazoni L, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O--gallate *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8(8):e3093.

Jain K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis, *Drug Discov Today*, Ago 2013; Volume 00, Número 00.

Kaur G, Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *J Parasitol Res*. 2014;2014:726328.

Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 2010; 1(2):13–32.

Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura C V, Silva SO. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic. Biol. Med*. 2013; 60:17–28.

Lehane AM & Saliba KJ. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res Notes*. 2008; 18, 1:26.

Liarte DB ; Murta, S. M. F; Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitology Research*, vol. 107, no. 1, pp. 205–212, 2010.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001; 46(1-3):3–26.

Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today. Technol.* 2004; 1(4):337–41.

Loría-Cervera, E.N. & Andrade-Narváez, F.J. - Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, **56**(1): 1-11, 2014.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999; 13(10): 1169-83.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104(22):9375–80.

Maltezou H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology.* 2010;2010:8.

Mehta A. & Shaha C. Mechanism of metalloinduced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and glutathione. *Free Radic Biol Med*, 2006; 40(10), p. 1857-1868.

Menna-Barreto RF & de Castro SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 614014.

Menna-Barreto, R. F. et al. The effects on trypanosoma cruzi of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free radic biol med.* set 2009; 47(5): 644-53.

Mesquita, J., T. Tempone, A., G., Reimão., J., Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Tropica* 130 (2013) 112–116.

Ministério da Saúde. Indicadores e Dados Básicos - Brasil - 2016 [Internet]. [acessado em 15/03/2016]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2016/matriz.htm#mort>

Ministério da Saúde. Leishmania Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2011b. p. 1–78.

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010.

Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV. 1a edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2011a. p. 1–106.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Ministério da Saúde. Nota Técnica No52/2011- CGDT/DEVIT/SVS?MS – Orientações sobre a utilização da Anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses. 2011c. p. 1–2.

Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 2009 80 (2), 81-90. 93

Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. *Mini Rev Med Chem* 2009 9 (1), 107-123.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr med chem.* 2007 14(10), 1153-69.

Mistro, S.; Rodrigues, M.; Rosa, L.; Camargo, M.; Badaró, R.; Liposomal Amphotericin B drug access for the treatment of leishmaniasis in Brazil. *Trop Med Int Health.* 2016 Mar 31.

Mohapatra S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology.* 2014;4(1):4-9.

Mukherjee P, Majee SB, Ghosh S, Hazra B. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. *Int J Antimicrob Agents.* Dez 2009; 34(6): 596-601.

Murray HW, Berman JD, Davies CR et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561–77.

Nagaprashantha LD, Vatsyayan R, Singhal J, Lelsani P, Prokai L, Awasthi S, Singhal SS. 2'-hydroxyflavanone inhibits proliferation, tumor vascularization and promotes normal differentiation in VHL-mutant renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2011;32:568–7

Nagill, R. and Kaur, S. "Vaccine candidates for leishmaniasis: a review." *int immunopharmacol* 2011(10): 1464-88.

Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJN, et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* 2014; 114(22):11305–47.

Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *Int J Mol Sci* 2013; 6 14(2), 3395-439.

Neuber H. Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2008;6:754–65.

OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization.2010.

Odds, F.C., Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother, 2003. 52(1): p. 1.

OMS. Global Health Observatory Data Repository. World Heal. Organ. World Health Organization. [Internet] [acessado em 15/03/2016]. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en101>

OMS. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007. World Health Organization 2007 p. 1–32.

Paloque L, Verhaeghe P, Casanova M, Castera-Ducros C, Dumètre A, Mbatchi L, Hutter S, Kraiem-M'rabet M, Laget M, Remusat V, Rault S, Rathelot P, Azas N, Vanelle P. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. Eur J Med Chem. 2012 Aug;54:75-86

Pandey K, Pun SB, Pandey BD. Relapse of kala-azar after use of multiple drugs: a case report and brief review of literature. Indian J Med Microbiol. 2012;30:227–9.

Pires, D. E., Blundell, T. L. & Ascher, D. B. pCSM: Predicting Small-molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. J Med Chem 58, 4066–4072 (2015).

Piscopo, T. V.; Mallia, A. C. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2006;82:649–657. doi: 10.1136/pgmj.2006.047340

Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ e cols. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother. 2013 Apr; 68(4):789-99.

Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-Leishmania Response. PLoS Pathog 8(2): e1002536, 2012.

Ribeiro-Gomes FL, Romano, A., Lee, S., Roffê, E., Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. Cell Death and Disease (2015) 6, e2018;

Rodrigues JC, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, de Souza W. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. Protist. Out 2007; 158(4): 447-56.

Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. Subcell Biochem. 2014; 74:1-42.

Sacks D. & Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001 55, 453-83.

Salem MM, Werbovetz KA. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. Curr Med Chem 2006; 13: 2571-98.

Seifert, K. and Croft, SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(1): p. 73-9.

Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R e cols. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against protozoan Neglected Diseases – Part I e II. Curr Med Chem. 2012; 19(14): 2128-228.

Shin SY, Kim JH, Lee JH, Lim Y, Lee YH. 2'-Hydroxyflavanone induces apoptosis through Egr-1 involving expression of Bax, p21, and NAG-1 in colon cancer cells. Mol Nutr Food Res. 2012;56:761-74.

Shukla AK, Singh BK, Patra S, Dubey VK. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Appl Biochem Biotechnol* 2010; 160 (8): 2208-2218.

Singh G, Dey CS. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. *Acta Trop.* 2007; 103(3):172–85.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012; 485-497.

Singodia e cols 2012, nanomedicine

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J e cols. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 2008; 118 (4), 1301-1310.

Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, Murray HW, Singh VP. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am j trop med hyg.* 1998 59(1), 139-43

Trinconi, C.T., et al., Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. 58(5): p. 2608-13

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 2002; 8(4): 297-318.

Verschooten L, Barrette K, Van Kelst S, Rubio Romero N, Proby C, De Vos R, Agostinis P, Garmyn M. Autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cell death inducing effect of the flavonoid luteolin in metastatic squamous cell carcinoma cells. *Plos one.* 2012 7(10), e48264.

Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Arch. Bras. Med. 1912;1:36–8.

Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V e cols. Antiprotozoal activities of Colombian plants. J Ethnopharmacol. 2001; 78(2-3): 193-200.

Weston LA, Mathesius U 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. J. Chem. Ecol. 39, 283–297.