

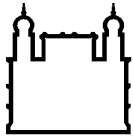
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANÁLISE *IN VITRO* DA AÇÃO COMBINADA DE COMPOSTOS
LEISHMANICIDAS

IVANA D'ALMEIDA MELO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Ivana D'Almeida Melo

Análise *in vitro* da ação combinada de compostos leishmanicidas

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2019

Melo, Ivana D'Almeida.

Análise *in vitro* da ação combinada de compostos leishmanicidas / Ivana D'Almeida Melo. - Rio de Janeiro, 2019.

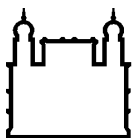
79 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Maria de Nazaré Correia Soeiro.

Bibliografia: f. 54-62

1. Leishmanioses. 2. Quimioterapia experimental. 3. *Leishmania amazonensis*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: IVANA D'ALMEIDA MELO

ANÁLISE IN VITRO DA AÇÃO COMBINADA DE COMPOSTOS LEISHMANICIDAS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Aprovada em: 27/02/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria – Presidente e revisora (IOC/Fiocruz)

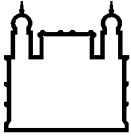
Prof. Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub (DGBM/UNIRIO)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Saulo Cabral Bourguignon (GCM/UFF) - Suplente

Prof. Dr^a. Katia da Silva Calabrese (IOC/Fiocruz) - Suplente

Rio de Janeiro, 27 de Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Ivana D' Almeida Melo**, sob orientação da Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao vigésimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: “**Análise in vitro da ação combinada de compostos leishmanicidas**”, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub - UNIRIO/RJ, Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Saulo Cabral Bourguignon – UFF/RJ e Dr^a. Katia da Silva Calabrese – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela **A PROVAÇÃO** da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2019.

Dr^a. Suzana Côrte-Real Faria (Presidente da Banca):

Dr^a. Claudia Alessandra Fortes Aiub (Membro da Banca):

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS QUE
CONTRIBUÍRAM POSITIVAMENTE, ESPECIALMENTE
AOS MEUS PAIS, ANGELA E IVANILDO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a São Bento, pela proteção e força nos momentos de maior desespero e dor durante este período de mestrado.

Aos meus amados pais, por sempre me acolherem, me darem carinho, amor e me fazerem acreditar que eu sou capaz de realizar meus sonhos, mesmo com dificuldades e obstáculos que entram no caminho. E por sempre batalharem junto comigo seja qual for o problema e serem os meus maiores incentivadores.

Aos meus padrinhos, Aparecida e Augusto, porque sem eles talvez eu não tivesse a oportunidade de chegar onde cheguei hoje.

À minha avó Penha, que apesar de todo medo pela minha profissão, sempre esteve feliz e orgulhosa pelas minhas vitórias, até o fim de sua vida.

Ao Dr. Marcello Barcinski, pela grande oportunidade que me deu e por ter me acolhido de braços abertos.

À minha orientadora, Dra. Maria de Nazaré, pela oportunidade dada, por abrir as portas do laboratório para mim, pelos múltiplos ensinamentos, pela paciência, generosidade e dedicação. Obrigada por mesmo com tantos alunos, sempre ter tempo de nos guiar, nos ensinar e nos ouvir com carinho.

À Kelly Demarque, por tanto conhecimento de histologia e de vida que me foram ensinados, pela paciência e grande carinho.

Ao grande grupo do Laboratório de Biologia Celular, por terem me acolhido com tamanha generosidade e carinho e por terem tido paciência para os meus questionamentos. Aos amigos Raiza Brandão, Camila Cardoso, Aline Nefertiti, Marianne Rocha, Patrícia Bernardino, Rayane Nogueira, Karine Lima, Marcos Baldez, Carlos Fernando, Gabriela Rodrigues, Thamires Christinne, Juliana Magalhães, Yasmin Pedra, Camila Rodrigues, Luíza Pereira, Ana Cristina, Dra. Kelly Salomão, Dra. Solange Castro e Dr. Rubem Barreto. Além de tudo agradeço às companheiras Dra. Cristiane França, Ludmila Fiuza, Dra. Denise Gama e Julianna Siciliano pelo ombro amigo e por me ouvirem desabafar. Ao Dr. Gabriel Oliveira e ao técnico Marcos Meuser por terem me ensinado tanto e com tanta dedicação.

Ao amigo Carlos Felipe, que nos deixou precocemente, por todo carinho, pelos abraços apertados, pelas piadas, por sempre me ouvir e me dar conselhos, pelos almoços...enfim, por ser um grande amigo.

Aos amigos, Jackeline Rossetti, Gabriela Cardoso, Luiza Gervazoni, Lucas Cortinhas e Paula Finamore, por serem um ponto de equilíbrio nos momentos mais difíceis.

Aos colaboradores, Dra. Galina Lepesheva, Dr. Rob Leurs e Dr. David Boykin por cederem os compostos que fizeram parte do meu trabalho.

À Dra. Solange Castro, pela parceria sem medidas e por prontamente aceitar nos ajudar. Obrigada por todo carinho, palavras são poucas para agradecer o tamanho da ajuda.

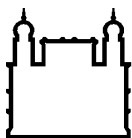
Às Dra. Suzana Côrte-Real, Claudia Aiub e Katia Calabrese e aos Dr. Eduardo Caio e Saulo Cabral, por aceitarem o convite de fazerem parte da banca avaliadora desta dissertação.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, a Fundação Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, pelo ensino de qualidade.

Às agências de fomento, FAPERJ, CNPq e CAPES, pelo financiamento de um sonho realizado.

"QUEM SE ARRISCA A ANDAR POR ARES NUNCA ANTES RESPIRADOS OU PENSAR FORA DA CURVA TEM GRANDES CHANCES DE ENCONTRAR PEDRAS NO CAMINHO. NO ENTANTO, NINGUÉM É DIGNO DE CONTRIBUIR PARA A CIÊNCIA SE NÃO USAR SUAS DORES E INSÔNIAS NESSE PROCESSO. NÃO HÁ CÉU SEM TEMPESTADE. RISOS E LÁGRIMAS, SUCESSOS E FRACASSOS, APLAUSOS E VAIAS FAZEM PARTE DO CURRÍCULO DE CADA SER HUMANO, EM ESPECIAL DAQUELES QUE SÃO APAIXONADOS POR PRODUZIR NOVAS IDÉIAS."

AUGUSTO CURY



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE *IN VITRO* DA AÇÃO COMBINADA DE COMPOSTOS LEISHMANICIDAS

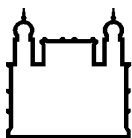
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ivana D'Almeida Melo

As leishmanioses fazem parte de doenças negligenciadas, por acometer, em sua grande maioria, pessoas de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, para as quais empresas farmacêuticas tem pouco interesse em financiar o desenvolvimento de novos medicamentos. O tratamento é feito utilizando antimonial pentavalentes como primeira escolha, pentamidina (Pt), miltefosina (Mt), anfotericina B e sua formulação lipossomal. Todos causam efeitos adversos e exibem crescentes casos de resistência, logo há a necessidade de se desenvolver terapias mais seguras, eficazes e de curta duração. Neste trabalho, primeiramente, foi testada a atividade fenotípica de 18 novos compostos (ftalazinonas e imidazóis - inibidores de fosfodiesterases (PDE), imidazóis inibidores de biossíntese de ergosterol (EBI), além de quinolinas) comparando-os com dois fármacos de referência (Pt e Mt), em esquemas de monoterapia por ensaios sobre amastigotas obtidas de lesões na pata de camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis*, comparando ainda com ação sobre as formas intracelulares presentes em macrófagos infectados *in vitro*. Dentre esses compostos, 09 não foram ativos, com $EC_{50} > 50 \mu M$. Os mais promissores foram as ftalazinonas e imidazóis inibidores de PDEs (NPD001, NPD008, NPD040, NPD029, NPD3115, NPD3124, NPD3125, NPD3126) e o VNI (EBI), com ação leishmanicida moderada (EC_{50} entre 10,15 e 44 μM), sendo menos efetivos que Mt e Pt (EC_{50} 4 e 1,5 μM , respectivamente). Ensaios de toxicidade dos melhores compostos sozinhos e em combinação, sobre cultivos de macrófagos revelaram que os compostos sozinhos, têm valores de $LC_{50} >$ pentamidina ($LC_{50} = 15,2 \mu M$), sendo, portanto, menos tóxicos. Porém, quando comparados a miltefosina ($LC_{50} = 157,6 \mu M$), as ftalazinonas e o imidazol NPD3126 foram mais citotóxicos. O índice de seletividade (IS) também foi calculado, e todos os compostos tiveram IS inferior aos dois fármacos. Os compostos mais potentes (NPD001, NPD008, NPD040, NPD3115 e NPD3126) foram selecionados para estudos de combinação com Mt e Pt e também entre si, sendo ainda avaliados em modelos *ex vivo*. Em todas as combinações, a natureza da interação foi de aditividade ou "sem interação", segundo classificação por Odds (2003). Com relação aos ensaios de toxicidade das combinações testadas, houve perda de viabilidade celular ($> 56\%$) somente nas maiores concentrações das proporções estudadas. Por fim, de modo a comparar e validar os dados obtidos, realizamos ensaios *in vitro* com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* localizadas em culturas de macrófagos. NPD008, NPD3126 e a Pt exibiram superiores potências leishmanicidas sobre os parasitos intracelulares em comparação às amastigotas livres obtidas de lesão, com os seguintes valores de EC_{50} : pt: 0,35 μM e 1,5 μM ; NPD008: 2,38 μM e 10,8 μM e NPD3126: 5,0 μM e 10,15 μM , respectivamente. NPD008 teve o valor de EC_{50} (2,38 μM) inferior ao da miltefosina (5,0 μM) e melhor IS (17) comparado aos demais compostos testados, e assim, seguiu para os estudos de combinação sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. A semelhança do observado com amastigotas livres, NPD008 + Pt resultou em perfil de aditividade ($x\Sigma FICI = 1.39$). Nas proporções não tóxicas de 80:20, 60:40 e 40:60 de NPD008 + pt observamos redução da carga parasitária superior a 85 %, alcançando em algumas proporções índices de supressão igual a 98 % e mesmo 100 % de redução no percentual e número de parasitos por célula hospedeira. A microscopia eletrônica de varredura revelou que NPD008 + Pt induziu alterações sugestivas de inibição de divisão celular, com grande número de amastigotas duplicadas e não dissociadas, resultando em extensos grumos parasitários, como já reportado para *Trypanosoma brucei* incubado com inibidores de PDEs. Nosso estudo revela o efeito promissor de inibidores de PDEs sobre *Leishmania amazonensis*, em especial em esquemas de combinação, que merece ser explorado em futuros ensaios *in vivo* visando futuro desenvolvimento de novos fármacos para terapia das leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmanioses, quimioterapia experimental, *Leishmania amazonensis*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IN VITRO ANALYSIS OF THE COMBINATORY ACTION OF LEISHMANICID COMPOUNDS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ivana D'Almeida Melo

Leishmaniasis belong to the distinct group of neglected diseases, named so for their endemicity mostly in countries under development, therefore attracting low interest of pharma industries to research new medicines. The treatment of leishmaniasis uses pentavalent antimonials as the first choice: pentamidine (Pt), miltefosine (Mt), amphotericin B and its liposomal formulation. All of them cause adverse effects and resistant cases have been increasing. Thus, there is an urgent need to develop new alternative therapies that are safer, more effective, in short-term treatment, and accessible for all the patients. The present work, first, tested the phenotypic activity of 18 new compounds (ftalazinones and imidazoles inhibitors of phosphodiesterase (PDE), imidazoles inhibitors of ergosterol biosynthesis (EBI), and quinolines), comparing them with two reference medicines, Pt and Mt, in monotherapy activity assays with amastigotes obtained from footpad lesion of mice experimentally infected with *Leishmania amazonensis*, and also comparing with the *in vitro* activity on intracellular forms present in infected macrophages. Among the compounds, nine showed no activity, with $EC_{50} > 50 \mu\text{M}$. The most promising were the ftalazinones and imidazoles inhibitors of PDEs (NPD001, NPD008, NPD040, NPD029, NPD3115, NPD3124, NPD3125, NPD3126) and VNI (EBI), that presented moderate leishmanicidal activity (EC_{50} from 10.15 to 44 μM), being less effective than Mt and Pt, which EC_{50} values were 4 and 1.5 μM , respectively. The best compounds were also tested for toxicity alone and in combination on macrophage cultures. In the monotherapy toxicity assays, $LC_{50} >$ pentamidine ($LC_{50} = 15.2 \mu\text{M}$), being, therefore, less toxic. However, when compared to Mt ($LC_{50} = 157.6 \mu\text{M}$), the ftalazinones and the imidazole NPD3126 were more cytotoxic. Selectivity index (SI) was also calculated, and all tested compounds had SI lower than the two medicines. The most potent compounds (NPD001, NPD008, NPD040, NPD3115 e NPD3126) were selected for combined therapy assays with Mt and Pt, and also with one another, being evaluated in *ex vivo* models. All combinations showed additivity or "no interaction", according to the classification of Odds (2003). Regarding the toxicity assays of the tested combinations, there was loss of cell viability ($> 56 \%$) only at the highest concentrations of the proportions between the compounds. Finally, to compare and validate the data obtained, *in vitro* assays were performed with intracellular amastigotes of *L. amazonensis* in macrophage culture. NPD008, NPD3126 and Pt exhibited higher leishmanicidal potency upon the intracellular parasites in comparison to the free amastigotes obtained from footpad lesion, with the following values of EC_{50} : Pt: 0.35 μM and 1.5 μM ; NPD008: 2.38 μM and 10.8 μM ; and NPD3126: 5.0 μM and 10.15 μM , respectively. NPD008 presented lower EC_{50} (2.38 μM) than Mt (5.0 μM) and better SI (17) in comparison to the others tested compounds, therefore being suitable to follow to combination studies on intracellular amastigotes of *L. amazonensis*. Similarly, to the result upon free amastigotes, NPD008 + Pt resulted in additivity ($x\Sigma\text{FICI} = 1.39$). However, in the non-toxic proportions of 80:20, 60:40 and 40:60 of NPD008 + Pt, the reduction of parasite load observed was higher than 85 %, reaching suppression indexes equal to 98 % or 100 % reduction of parasites inside the host cell in some proportions. The analysis with scanning electron microscopy revealed the incubation of the NPD008 + Pt with free amastigotes, there were alterations suggestive of inhibition of cell division processes, with a high number of duplicated non-dissociated amastigotes, resulting in extensive parasite agglomerates, as previously reported for *Trypanosoma brucei* incubated with PDE inhibitors. The present study shows the promising effect of PDE inhibitors on *L. amazonensis* amastigotes, particularly in combination schemes, that deserve to be further investigated in *in vivo* studies, aiming to the development of new drugs for therapy of leishmaniasis.

Key words: Leishmaniasis, experimental chemotherapy, *Leishmania amazonensis*

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve histórico das leishmanioses	1
1.1.1 Origem nas Américas	1
1.1.2 Dispersão no Brasil.....	2
1.2 Epidemiologia e dispersão geográfica	3
1.3 Leishmanioses	4
1.3.1 Leishmaniose cutânea	7
1.3.2 Leishmania amazonensis	7
1.4 Tratamentos atuais	8
1.5 Compostos ativos sobre cinetoplastídeos	12
1.5.1 Quinolinas.....	12
1.5.2 Inibidores da biossíntese de lipídeos	13
1.5.3 Inibidores de fosfodiesterase	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Compostos	20
3.2 Culturas de células de mamíferos	20
3.3 Parasitos	20
3.4 Toxicidade sobre células de mamífero	21
3.5 Validação de ensaio de atividade com amastigota livre	21
3.6 Atividade <i>in vitro</i>	21
3.6.1 Avaliação dos compostos em combinação	22
3.6.2 Determinação do índice de FIC (FICI) e construção de isobologramas	23
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
3.8 Aspectos éticos (CEP/CEUA)	24

4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Figura 1. Huaco (cerâmica de origem peruana).....	2
Figura 2. Distribuição das leishmanioses cutânea e visceral pelo mundo.....	4
Figura 3. Ciclo de vida do protozoário do gênero <i>Leishmania</i>	6
Figura 4. Estrutura química das quinolinas.....	12
Figura 5. Via biossintética de lipídeos.....	14
Figura 6. Demonstração de sinalização em humanos mediada pelo segundo mensageiro AMPc.....	16
Figura 7. Demonstração da diluição dos compostos para experimentos de atividade em combinação.....	23
Figura 8. Comparação entre a ação leishmanicida da pentamidina e do composto NPD2191 pela quantificação ao microscópio de luz e do sistema colorimétrico (AlamarBlue) e leitura em espectrofotômetro.....	29
Figura 9. Exemplos de isobogramas com seus respectivos χ^2 FICI das combinações entre o composto NPD008 e pentamidina e NPD008 e miltefosina em ensaios <i>ex vivo</i> com amastigotas livres de <i>Leishmania amazonensis</i> cepa LTB0016.....	31
Figura 10. (A-H): Imagem por microscopia de luz de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados ou não com os compostos testados, fixados com Boiun e corados com Giemsa.....	35
Figura 11. (A-H): Imagem por microscopia de luz de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados ou não com as combinações testadas, fixados com Boiun e corados com Giemsa.....	38
Figura 12. (A-F): Imagem por microscopia eletrônica de varredura de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas ou não com as combinações testadas, incubadas por 24 h, fixadas com 2,5 % de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato e processadas para MEV.....	40
Figura 13. (A-F): Imagem por microscopia eletrônica de varredura de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas ou não com as combinações testadas, incubadas por 48 h, fixadas com 2,5 % de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato e processadas para MEV.....	41

Tabela 1. Relação entre as espécies de <i>Leishmania</i> , região encontrada e manifestações clínicas	8
Tabela 2. Critérios “hit” e “lead” para definição e seleção de compostos leishmanicidas sobre a forma visceral.	11
Tabela 3. Compostos avaliados no projeto e fármacos de referência com suas respectivas estruturas químicas.....	28
Tabela 4. Análise da atividade (EC ₅₀) de compostos em ensaios <i>ex vivo</i> de monoterapia com amastigotas livres de <i>Leishmania amazonensis</i> cepa LTB0016.	30
Tabela 5. Análise da atividade de ftalazinonas e imidazóis inibidores de fosfodiesterase em combinação com miltefosina e pentamidina ou entre si em ensaios <i>ex vivo</i> com amastigotas livres de <i>Leishmania amazonensis</i> cepa LTB0016.	31
Tabela 6. Identificação da toxicidade dos compostos isolados (LC ₅₀) sobre culturas não infectadas de macrófagos intraperitoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS), demonstrando a razão entre valores de LC ₅₀ e EC ₅₀	32
Tabela 7. Identificação da toxicidade dos compostos em combinação sobre culturas não infectadas de macrófagos peritoneais, através da demonstração da porcentagem de perda de viabilidade das células e suas respectivas concentrações da combinação.	33
Tabela 8. Análise da atividade (EC ₅₀) de compostos em ensaio de monoterapia com macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> cepa LTB0016.	36
Tabela 9. Análise da atividade (redução do índice de infecção) de compostos em ensaio de combinação do composto NPD008 com pentamidina sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> cepa LTB0016.	37
Tabela 10. Identificação da toxicidade dos compostos isolados (LC ₅₀) sobre culturas não infectadas de macrófagos intraperitoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS) sobre amastigotas intracelulares, demonstrando a razão entre valores de LC ₅₀ e EC ₅₀	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AIA s	Arilimidamidas
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ASAQ	Artesunate-amodiaquine
ASMQ	Artesunate-mefloquine
Bz	Benznidazol
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CYP	Citocromo P450
CYP51	Esterol 14α-desmetilase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i>
DO	Densidade óptica
dpi	Dias pós infecção
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EBI	Ergosterol Biosynthesis Inhibitor
EC₅₀	Concentração mínima de reduz 50 % da população parasitária
FCI	Índice de concentração inibitória fracional
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HIV	Human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)
IC₅₀	Concentração que inibe 50 % de um processo biológico ou bioquímico
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (óxido nítrico sintase induzida)
IS	Índice de seletividade
kDNA	Kinetoplast deoxyribonucleic acid
LC	Leishmaniose cutânea
LC₅₀	Concentração que inviabiliza 50% das células
LCD	Leishmaniose cutânea difusa

LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Miligrama
MS	Ministério da Saúde
Mt	Miltefosina
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NECT	Nifurtimox-eflornithine combination therapy
Nm	Nanômetro
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PDE	Phosphodiesterase (fosfodiesterase)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína-cinase A
Pt	Pentamidina
ROS	Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Th1	Linfócito T helper tipo 1
Th2	Linfócito T helper tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	World Health Organization
$x\bar{\Sigma}$FICI	Média do somatório de FICI
ΣFICI	Somatório de FICI

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico das leishmanioses

A descrição mais antiga das leishmanioses no Velho Mundo data de 2000 a.C. feita no Papiro Ebers (mais extenso registro médico do Egito antigo), no qual a doença foi mencionada como “Nile Pimple” (Oumeish, 1999).

1.1.1 Origem nas Américas

Sabe-se que a chegada e colonização de portugueses e espanhóis ao continente americano trouxeram não só uma cultura diferente da população indígena residente (como catequização), mas também sua exploração e mortalidade em massa, através de doenças do Velho Mundo, antes não conhecida pelo povo do Novo Mundo, como febre amarela, malária, sarampo, varíola etc (Altamirano-Enciso et al., 2003). No entanto, algumas enfermidades, como as leishmanioses, pareciam já causar grande número de mortes antes mesmo da chegada dos europeus.

Diversos cronistas do século XVI escreveram sobre a cultura dos povos autóctones. Dentre eles, podem-se destacar cronistas do território andino como o espanhol Pedro Pizarro, que em 1533 relatou a presença de índios com a chamada “doença dos narizes”, na qual se observava alta frequência de lesões mucosas em uma região oriental alta, de clima quente e úmido (Altamirano-Enciso et al., 2003).

Já em 1586, um padre, Rodrigo de Loayza, também fez observações de lesões vistas em índios em terras andinas no Peru. A doença descrita pelo sacerdote acometia a mucosa nasal e foi chamada de “*andeongo*” (que seria a leishmaniose mucocutânea – LMC) (Altamirano-Enciso et al., 2003).

No início de 1903, o patologista James Homer Wright denominou de *Helcozoma tropicum* o parasito encontrado em lesões cutâneas de uma criança da Síria (Armênia) com suspeita de “botão do oriente” que, em 1906, Max Lühe denominou de *Leishmania tropica*. Em maio de 1903, William Boog Leishman e Charles Donovan obtiveram independentemente biópsias de órgãos de soldados mortos na Índia, sendo identificado o agente etiológico do calazar, classificado como membro da família Trypanosomatidae. Sendo assim, o médico inglês Ronald Ross (o mesmo que demonstrou que a malária era transmitida pelo mosquito do gênero *Anopheles* e desvendou o ciclo do parasito causador desta doença) nomeou o

parasito de *Leishmania donovani*, sendo a leishmaniose visceral descrita apenas ao final da década de 1940, na Índia (Oumeish, 1999; Altamirano-Enciso et al., 2003).

A descoberta de que *L. donovani* e *L. tropica* eram tripanossomatídeos foi feita através de visualização de formas flageladas em meio ágar sangue *in vitro* por Rogers e Nicolle (1904) e Carlos Chagas (1908) (Altamirano-Enciso et al., 2003).

Com relação ao surgimento das leishmanioses no continente americano, houve muita discussão e uma das teorias é que teria surgido no Peru e Bolívia, sendo que um dos indícios seriam as cerâmicas (huacos) feitas por esses povos, que retratavam figuras humanas com enfermidades (Figura 1) (Altamirano-Enciso et al., 2003).



Figura 1. Huaco (cerâmica de origem peruana). Cerâmica exibindo lesão nasal e de lábio superior indicando provável LMC. Retirado de Altamirano-Enciso et al., 2003.

Em 1914, Gaspar Vianna introduziu como tratamento das leishmanioses tegumentares o antimonial (tártaro emético), que também era utilizado no tratamento da doença do sono (tripanossomíase africana) (Altamirano-Enciso et al., 2003).

1.1.2 Dispersão no Brasil

Por causa da relação histórica das leishmanioses e proximidade da região da Bolívia e Peru, pode-se estimar que a região amazônica foi por onde se iniciou a leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil. A doença foi depois difundida para outras regiões do país, sendo bastante provável que tenha relação com a introdução pelo

próprio homem ou animais domésticos, na qual a população de flebotomídeos tenha aumentado devido a atividades humanas, resultando na maior oferta de sangue como alimento juntamente com a diminuição de predadores do inseto vetor (Marzochi & Marzochi, 1994).

Houve duas migrações principais que podem justificar a disseminação de LT para outras regiões do Brasil. A primeira foi por causa de uma grande seca que ocorreu na região nordeste e que fez muitas pessoas migrarem para a Amazônia (1877-1880), onde permaneceram trabalhando na extração de borracha (1912-1932). Após, houve retorno ao nordeste e ida para a região sudeste do país para cultivo do café (a partir de 1930), quando ocorreu uma epidemia de leishmaniose. Outro possível momento de dispersão da doença foi pelo final dos anos de 1970, com a migração de pessoas de todas as regiões do Brasil para o sul da Amazônia no período de mineração do ouro. O retorno destes trabalhadores a sua região de origem fez com que houvesse casos de leishmaniose no sul do Brasil e em países como o Paraguai (Marzochi & Marzochi, 1994).

Corroborando estas hipóteses de origem e regiões para onde a doença foi disseminada, pode-se observar que há uma heterogeneidade genética entre diferentes cepas de *L. braziliensis* do sul da Amazônia comparando-se com a homogeneidade das linhagens desta mesma espécie isoladas de outras regiões do Brasil (Marzochi & Marzochi, 1994).

1.2 Epidemiologia e dispersão geográfica

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) de pele são um grupo de doenças que primariamente acomete a pele, podendo formar inchaço, úlceras, manchas etc e que por ser um local aparente faz com que sejam altamente estigmatizadas devido a possível desfiguração do paciente, caso não seja tratado, fazendo com que este sofra problemas sociais como preconceito (WHO, 2019). Entre essas doenças estão as leishmanioses tegumentares, que envolve leishmaniose cutânea (LC - forma mais comum), mucocutânea e cutânea difusa (LCD). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há uma incidência anual de novos casos de leishmaniose cutânea em cerca de 600 mil a 1 milhão (WHO, 2019). Já com relação a leishmaniose visceral (LV), estima-se cerca de 50 a 90 mil novos casos que, se não tratados, serão fatais em mais de 95% dos infectados, sendo que com tratamento, as chances de sobrevivência são de 90 a 97%. A taxa

de letalidade das leishmanioses é de cerca de 20 a 30 mil anuais, principalmente pela LV (WHO, 2019). Estima-se também que haja mais de 1 bilhão de pessoas em risco em áreas endêmicas (WHO, 2019).

Em 2015, mais de 90 % dos casos da LV ocorreram em sete países: Etiópia, Brasil, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul; enquanto mais de dois terços dos novos casos de leishmaniose cutânea (LC) ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã e República Árabe da Síria (WHO, 2019) (Figura 2).

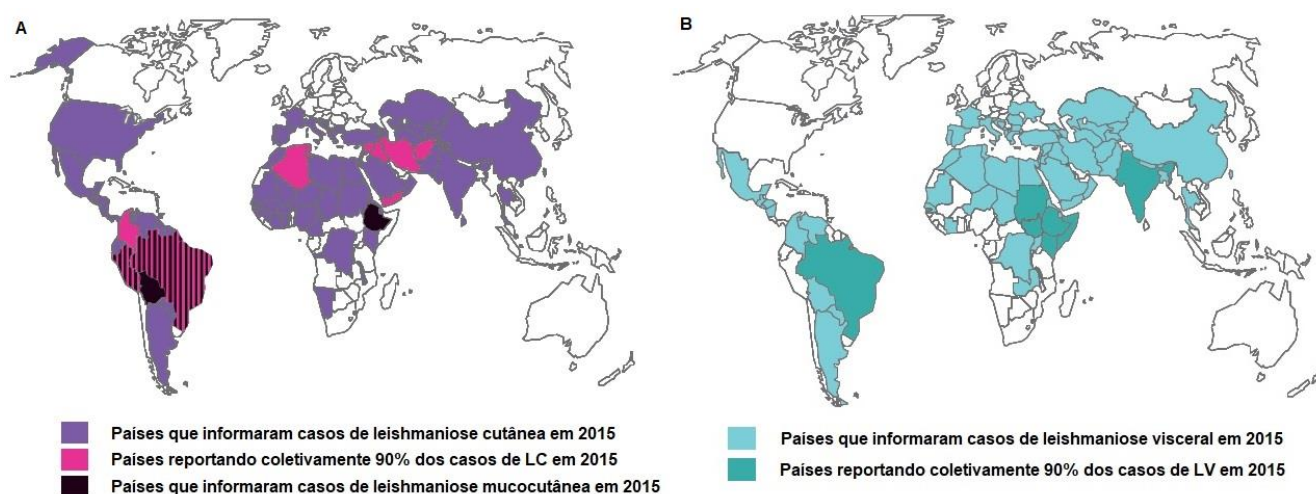


Figura 2. Distribuição das leishmanioses cutânea e visceral pelo mundo. A: Casos de leishmaniose cutânea no mundo; **B:** Casos de leishmaniose visceral no mundo. Pode-se observar que o Brasil está entre os países que mais reportaram casos tanto de LC quanto LV.

O Brasil é um país endêmico para LC, LMC e LV, sendo o país com maior número de casos de LC da América do Sul (WHO, 2019). Em áreas altamente endêmicas, 20% dos cães possuem LV (WHO, 2019).

1.3 Leishmanioses

As chamadas “patologias negligenciadas”, como a doença de Chagas, leishmanioses, doença do sono, entre outras, são assim nomeadas decorrente da falta de tratamentos eficazes, acessíveis, de baixa ou sem toxicidade e de fácil administração (como uso oral, por exemplo). Normalmente essas patologias acometem pessoas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, em populações de extrema pobreza, sem condições financeiras para custear o tratamento. Além disso, há ainda pouco interesse das indústrias farmacêuticas no

desenvolvimento de novos tratamentos, já que priorizam o desenvolvimento de fármacos mais rentáveis, como aqueles relacionados a patologias degenerativas, doenças cardíacas, problemas dermatológicos, estéticos, entre outros que afetam de modo universal diferentes populações mundiais (Yamey & Torreele, 2002).

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas tropicais causadas por pelo menos 20 diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Schroeder & Aebischer, 2011), podendo ser dos subgêneros *Leishmania* (Velho Mundo) ou *Viannia* (Novo Mundo). A *Leishmania* é da família Trypanosomatidae e da classe Kinetoplastida, da qual pertencem os parasitos que possuem uma única mitocôndria que contém o cinetoplasto, formado pelo kDNA (Kaufer et al., 2017).

Este protozoário é transmitido pela picada de fêmeas de mais de 90 espécies de vetores flebotomíneos, normalmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2019), pertencentes aos gêneros *Phlebotomus spp* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia spp* (Novo Mundo) (Mears et al., 2015).

Esses protozoários podem causar um conjunto de doenças ao hospedeiro vertebrado: desde úlceras cutâneas (autoresolutivas) até uma patologia visceral fatal. Os parasitos alternam entre formas amastigotas intracelulares no hospedeiro vertebrado e promastigotas extracelulares no vetor (Kamhawi, 2006).

O ciclo de vida deste parasito é digenético, ou seja, ele passa por dois hospedeiros para completar o ciclo, e fora do hospedeiro vertebrado, seu ciclo fica restrito extracelularmente ao trato digestivo do hospedeiro invertebrado. A localização do parasito nos invertebrados difere nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. O primeiro é chamado de parasito suprapilar, sendo o seu desenvolvimento limitado ao intestino médio; já o segundo tem seu desenvolvimento no intestino posterior, onde são predominantemente ligados à parede do piloro e, em menor grau, ao íleo, e tem seu crescimento no intestino médio e no anterior sendo, portanto, chamados de parasitos peripilares. (Lainson, Ward & Shaw, 1977). No ciclo, o flebotomíneo se alimenta do sangue do indivíduo e pode inocular, caso esteja infectado, através da pele, as formas promastigotas metacíclicas. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou outros fagócitos mononucleares (neutrófilos) e se diferenciam, intracelularmente, para a forma amastigota no interior de vacúolos parasitóforos. As amastigotas se multiplicam e são, após a ruptura das células hospedeiras, capazes de manter o ciclo no vertebrado pela infecção de outras células. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos sugam o sangue deste portador e acabam ingerindo macrófagos infectados com amastigotas. No

intestino do vetor, essas amastigotas se diferenciam para promastigotas, que se dividem e migram para o probóscide do vetor, sendo então capazes de serem transmitidas aos vertebrados num novo repasto sanguíneo (CDC, 2019) (Figura 3). Quando o parasito muda de hospedeiro (invertebrado para vertebrado), estes parasitos ficam expostos a diferentes fatores no microambiente, incluindo alterações na temperatura, na natureza dos nutrientes e no pH, estresse oxidativo e, sendo assim, é fundamental que o protozoário consiga se adaptar a essas mudanças.

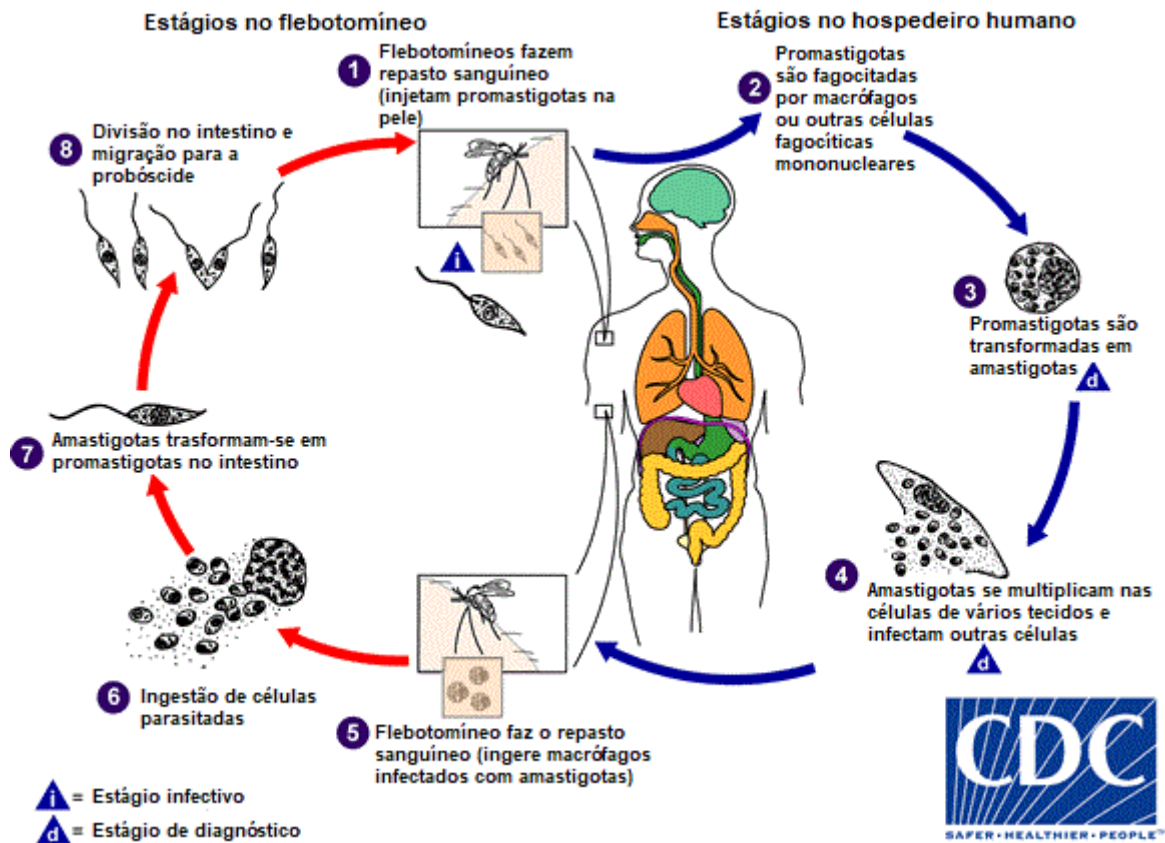


Figura 3. Ciclo de vida do protozoário do gênero *Leishmania*. Adaptado de: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Clinicamente, as leishmanioses podem se apresentar como: leishmaniose visceral (LV), que é fatal quando não tratada; mucocutânea (LMC), que é uma doença mutilante; cutânea difusa (LCD), que é causada por uma resposta imune não competente do hospedeiro vertebrado, levando a difusão da doença; e cutânea (LC), que é incapacitante quando há múltiplas lesões (Desjeux, 2004). Para entender melhor este conjunto de patologias, é preciso estudar não somente o agente etiológico, no caso a *Leishmania*, como também a interação entre esse agente e seus hospedeiros (vertebrado e invertebrado).

1.3.1 *Leishmaniose cutânea*

Os determinantes relativos a incidência da doença, são ainda pouco conhecidos, já que não existe um sistema eficiente de vigilância epidemiológica nas áreas remotas nas quais ela ocorre, além de muitos casos não notificados. A LC se manifesta através de lesões na forma de úlceras, nódulos, pápulas e placas em partes do corpo, como braços, pernas e face (Mears et al., 2015). Exibe múltiplas manifestações clínicas, sendo seu curso dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e da forma que o sistema imunológico do hospedeiro irá responder à infecção, sendo importantes o tipo e a magnitude desta resposta (Scott & Novais, 2016).

Os pacientes que não apresentam resposta eficiente de células T exibem uma doença grave chamada leishmaniose cutânea difusa. Por outro lado, há pacientes que apresentam uma resposta imune exacerbada, que desenvolvem a doença conhecida como leishmaniose mucocutânea, que também é grave. Há também os indivíduos que tem cura espontânea de suas lesões (Scott & Novais, 2016).

De um modo geral, sabe-se que com relação ao curso da doença e o sistema imunológico do hospedeiro nas leishmanioses, uma resposta Th1 (linfócito T *helper* tipo 1) com produção de IL-12, INF- γ e TNF- α , induzindo a produção da óxido nítrico sintase tipo 2 (iNOS) em macrófagos infectados representa uma resposta mais promissora para a cura ou resistência a doença. Já a resposta Th2 (linfócito T *helper* tipo 2), com secreção de IL-4 e IL-10 causa uma maior susceptibilidade e pode levar a um curso de doença com maiores lesões, maior número de parasitos e infecção disseminada (Scott & Novais, 2016; Heinzl et al., 1989; Scott et al., 1988).

Assim, apesar de sua evolução benigna e alta taxa de cura espontânea, o tratamento para a LC é indicado para erradicação das formas amastigotas e redução do tamanho das lesões, e conseqüentemente menor evolução de cicatrizes (Mitropoulos, Konidas & Durkin-Konidas, 2010).

1.3.2 *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis está incluída nas espécies mais comuns que causam LC encontradas no Novo Mundo (hemisfério ocidental), resultando ainda em casos de LCD como doença causada. Também podem causar LC as espécies *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (CDC, 2019). Outras espécies causadoras de LC no Velho Mundo

(hemisfério oriental) são *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. donovani* e *L. infantum* (CDC, 2019). Além de LC e LCD, a *L. amazonensis* também já foi relacionada com LMC e raramente com LV (Kevric, Cappel & Keeling, 2015) (Tabela 1).

Manifestação Clínica	Região	Espécies
LC	Velho Mundo*	<i>L. tropica</i> (LMC/LV raros) <i>L. major</i> (LMC raro)
	Novo Mundo**	<i>L. mexicana</i> (LCD raro) <i>L. venezualensis</i> (LCD raro) <i>L. peruviana</i>
LC/LMC	Novo Mundo**	<i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i>
LC/LV	Velho Mundo*	<i>L. donovani</i> (LMC raro) <i>L. infantum</i> (LMC raro) <i>L. chagasi</i> (LMC raro)
LC/LCD	Velho Mundo*	<i>L. aethiopica</i>
LC/LCD/LMC	Novo Mundo**	<i>L. amazonensis</i> (LV raro)
LC/LMC/LV	Novo Mundo**	<i>L. braziliensis</i>

Tabela 1. Relação entre as espécies de *Leishmania*, região encontrada e manifestações clínicas. LC = leishmaniose cutânea; LCD = leishmaniose cutânea difusa; LMC = leishmaniose mucocutânea; LV = leishmaniose visceral. * = Europa, África e Ásia; ** = Américas. Adaptado de Kevric, Cappel & Keeling 2015.

1.4 Tratamentos atuais

Atualmente não existem vacinas nem terapias que sejam consideradas satisfatórias para as leishmanioses, logo há a necessidade de se desenvolver tratamentos de curta duração de administração, mais seguros, acessíveis e eficazes (Mears et al., 2015). O tratamento mais comum tanto para a LC quanto para LV é o uso de medicamentos de primeira linha, antimoniais pentavalentes, que são medicamentos com maior tempo no mercado contra esta doença, e melhores taxas de cura. Apesar disso, há lugares nos quais observa-se resistência dos parasitos

aos medicamentos utilizados na clínica, além de já terem sido reportados outros tipos de problemas como, por exemplo, hepatotoxicidade (Kato *et al.*, 2014). Para solucionar este problema, são utilizados como alternativa ao fármaco de primeira linha a pentamidina (utilizada principalmente para a forma cutânea difusa) (Torres-Guerrero *et al.*, 2017), anfotericina B (somente para LV) e a formulação lipossomal da anfotericina B (AmBisome®), porém esta última tem restrição de uso devido ao seu alto custo (Desjeux, 2004). A paromomicina já foi demonstrada com taxas de cura de até 97 % para LV (Jha *et al.*, 1998), o antifúngico fluconazol também já teve atividade relatada contra *Leishmania* (Alrajhi *et al.*, 2002). A miltefosina também é utilizada em tratamentos atuais, porém pode causar muitos efeitos adversos, como diarreia, vômito e desidratação (Pandey *et al.*, 2016). Além destes, também já foi relatado o uso de imiquimod, um imunomodulador, ativador da resposta imune (Arevalo *et al.*, 2001).

No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde recomenda um protocolo de tratamento de acordo com o tipo de leishmaniose e a espécie relacionada. Para LC, de um modo geral recomenda-se antimoniato de meglumina como primeira escolha ou anfotericina B lipossomal para pacientes com 50 anos ou mais, transplantados ou com insuficiência renal, cardíaca ou hepática para todas as espécies menos para *L. guyanensis*, onde é substituído o antimoniato de meglumina por isetionato de pentamidina. LCD tem como primeira escolha o tratamento com isetionato de pentamidina para todos os pacientes, exceto os com comorbidade renal, hepática ou cardíaca, diabéticos, gestantes e lactantes. Para LMC, o protocolo recomenda a utilização de anfotericina B lipossomal para pacientes com idade a partir de 50 anos, insuficiência e transplantados renais, cardíacos e hepáticos e gestantes, antimoniato de meglumina para pacientes com menos de 12 anos, exceto os com as comorbidades acima, e antimoniato de meglumina associado a pentoxifilina para todos os outros pacientes, excluindo também os com histórico de hemorragia recente, hipersensibilidade à pentoxifilina e outras xantinas, coinfectados pelo HIV, imunossuprimidos e nutrízes (SVS/MS, 2017). Para LV o antimoniato de meglumina é o único medicamento de primeira escolha, tendo outros tratamentos alternativos com anfotericina B ou sua formulação lipossomal que, por causa do seu alto custo, além da dificuldade de ser sintetizada, é indicada somente para pacientes graves que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do antimoniato de meglumina e de outros

medicamentos de escolha com os quais não se obteve melhora ou cura clínica (SVS/MS, 2014).

Estratégias de novas terapias antiparasitárias incluem o reposicionamento de fármacos/medicamentos já utilizados para outras doenças e que possam compartilhar alvos comuns além uso de terapias combinadas ou coadministradas, simultaneamente ou sequencialmente (Laura *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2014; Perez-Mazliah *et al.*, 2013). Um dos exemplos atuais de sucesso de terapia combinada inclui: NECT (nifurtimox-eflornitina) para o segundo estágio da doença do sono, utilizando-se 14 administrações intravenosas de eflornitina, 2 h cada, por 7 dias e, em paralelo, nifurtimox (via oral) por 10 dias. Outros exemplos incluem combinações antimaláricas de ASAQ (artesanato-amodiaquina) e ASMQ (artesanato-mefloquina), entre outras (DNDi, 2019). A administração combinada permite reduzir possibilidade de resistência adquirida a fármacos por atuar sobre distintas vias e alvos moleculares dos parasitos, com redução de custos, doses e perfil de toxicidade (Nosten & Brasseur, 2002). Vários ensaios clínicos (fase II e III) tem sido conduzidos para terapia da LV na Ásia e África, incluindo a combinação da anfotericina B e a miltefosina, assim como a antimoniais, como proposta de alternativa terapêutica (DNDi, 2019; Jha, 2006; Mcquarrie *et al.*, 2015; Ramesh *et al.*, 2014). Com relação a LC, as combinações em testes clínicos incluem: associação de termoterapia (50°C por 30 min) com 100-150 mg/kg de miltefosina por 21 dias (DNDi, 2019), uso de crioterapia com antimoniais (Asilian *et al.*, 2004) e mesmo extratos de fontes botânicas (Parvizi *et al.*, 2017), além de associação de imiquimod com antimoniais, entre outras (DNDi, 2019). A seguir faremos uma breve descrição de algumas moléculas com potencial antiparasitário promissor, assim definido tendo por base características de compostos leishmanicidas como demonstrado na Tabela 2.

Critério	Parâmetro	Composto “Hit”	Composto “Lead”
Eficácia	Atividade (<i>in vitro</i>)	EC ₅₀ ≤ 10µM sobre amastigotas intracelulares de <i>L. donovani</i> ou <i>L. infantum</i> , IS > 20	EC ₅₀ ≤ 1 µM Ativo contra um painel de isolados clínicos e linhagem resistente ao antimonial
	Seletividade (<i>in vitro</i>)	10 vezes mais ativo vs. linhagem de células de mamíferos	Potência e seletividade superior ao “hit” (ideal ≥ 50x)
	<i>In vivo</i>	-	> 70% de redução de parasitos no fígado após no máximo 5 doses de 50mg/kg administradas por via oral uma ou duas vezes por dia
DMPK <i>in silico</i>	Regras de Lipinski	Usado para priorizar “hits”, mas não deve ser utilizado como critério de seleção definitivo	Usado para priorizar “hits”, mas não deve ser utilizado como critério de seleção definitivo
Toxicidade	Alertas estruturais (<i>in silico</i>)	Proceder com cuidado, testando o mais cedo possível para determinar a extensão do problema percebido	-
	<i>In vitro</i>	-	Proceder com ensaios relevantes (genotoxicidade, teste AMES, cardiotoxicidade, etc.)
	<i>In vivo</i>	-	Não ser tóxico para camundongos na dose eficaz
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Via sintética aceitável para compostos e/ou análogos (< 8 passos)	Não há potenciais impedimentos à síntese em escala

Tabela 2. Critérios “hit” e “lead” para definição e seleção de compostos leishmanicidas sobre a forma visceral. Adaptado de De Araújo, 2015; Katsuno et al., 2015; Don & Ioset, 2013; Nwaka et al., 2009.

1.5 Compostos ativos sobre cinetoplastídeos

1.5.1 Quinolinas

As quinolinas, formadas por dois anéis aromáticos em que em um deles o carbono é substituído por um nitrogênio (Figura 4), são clinicamente conhecidas e amplamente utilizadas no tratamento da malária, podendo ser identificadas na composição do quinino e da cloroquina. Ao longo dos anos, o parasito responsável pela doença, *Plasmodium*, obteve resistência a esses compostos, o que levou pesquisadores a procurar novos antimaláricos, incluindo testes com híbridos (combinação de duas moléculas biologicamente ativas) em que uma das moléculas é uma quinolina (Vandekerckhove & D'hooghe, 2015).

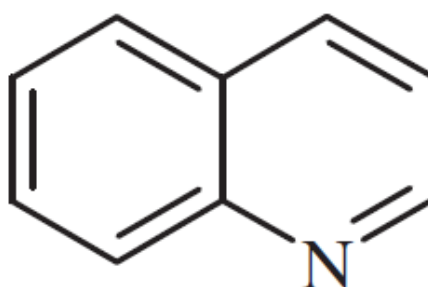


Figura 4. Estrutura química das quinolinas. Retirado de Marella et al., 2012.

Pela sua alta atividade antimalárica, começou-se a testar as quinolinas contra outros tipos de doença, como câncer, fungos (como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*), bactérias (gram-positivas e negativas) e protozoários (como *T. cruzi* e *L. panamensis*) (Ramírez-Prada et al., 2017; Nefertiti et al., 2018). Também foi observada atividade desse grupo de compostos contra *T. brucei* e promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, exibindo perfil semelhante aos fármacos de referência miltefosina e pentamidina (Audisio et al., 2012). Outros derivados quinolíticos foram sintetizados e estudados com relação a sua atividade antileishmanicida sobre diferentes espécies do parasito incluindo *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, além de baixa toxicidade sobre macrófagos e hemácias humanas (Duarte et al., 2016). Esse grupo de compostos também já foi testado pelo nosso grupo sobre *T. cruzi* e *T. brucei*, sendo ativas contra estes tripanosomas em estudos *in vitro*. *In vivo*, dentre as moléculas quinolíticas estudadas, a DB2186 foi a mais promissora alcançando 70% de redução na parasitemia em modelos de

infecção aguda por *T. cruzi* e cura de 50% em modelos de infecção por *T. brucei*. A quinolina DB2217 também foi ativa *in vivo*, tendo uma taxa de cura de 100 % em infecção por *T. brucei* (Nefertiti et al., 2018).

Apesar do mecanismo de ação das quinolinas ainda não estar completamente desvendado, acredita-se que esta classe atue contra o *Plasmodium* bloqueando a polimerização do heme (que estando livre é tóxico) liberado durante a proteólise da hemoglobina no parasito intraeritrocítico. A cloroquina e a quinidina, por exemplo, se associam a esta forma tóxica impedindo que as moléculas heme livres se liguem para sintetizar a forma não-tóxica, hemozoína, e fazendo com que se acumule as formas tóxicas sendo prejudicial e matando o parasito (Sullivan et al., 1998). Já para *Leishmania*, foi visto em trabalhos recentes que moléculas derivadas de quinolinas podem ter seu mecanismo de ação ligado a interação com a hemina, inibindo sua degradação e gerando estresse oxidativo, que não é neutralizado pelo sistema de defesa antioxidante do parasito (Chanquia et al., 2019). Outro composto, QuinDer 1, fez com que promastigotas de *L. amazonensis* apresentassem alta geração nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de alterações no potencial de membrana mitocondrial, com manutenção da integridade da membrana celular e tendo seu mecanismo de ação também ligado a estresse oxidativo mitocondrial (Coimbra et al., 2016).

1.5.2 Inibidores da biossíntese de lipídeos

Inibidores da biossíntese de ergosterol são amplamente usados como antifúngicos, tendo em vista que os fungos sintetizam ergosterol e não colesterol como ocorre nos mamíferos. Os protozoários assim como os fungos tem colesterol, sendo esta via, portanto, um relevante alvo para os parasitos. Outra principal diferença é que os mamíferos podem retirar colesterol de sua alimentação, já os fungos e protozoários não podem fazer o mesmo com o ergosterol. Os esteroides são fundamentais funções celulares, modulando a fluidez, integridade e permeabilidade da membrana celular (Sueth-Santiago et al., 2015).

A síntese de ergosterol começa com a condensação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA), tendo várias etapas até chegar ao esqualeno, que então forma o 2,3-óxido de esqualeno, que sofre uma série de ciclizações pela ação da enzima lanosterol sintase formando o cátion protosterol, que é convertido em lanosterol. O lanosterol sofre uma desmetilação no carbono da posição 14, formando uma insaturação pela ação da lanosterol 14 α -demetilase (CYP51), enzima

pertencente à superfamília dos citocromos P450 (CYP). O intermediário 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol formado é reduzido pela estero 14-redutase e o produto sofre duas desmetilações consecutivas. O produto dessas reações é o zimosterol, que após uma série de modificações é convertido a ergosterol em protozoários e fungos (Figura 5) (Sueth-Santiago et al., 2015). O alvo dos inibidores da biossíntese de lipídeos é a inibição da enzima 14 α -desmetilase, fazendo com que não haja produção de ergosterol.

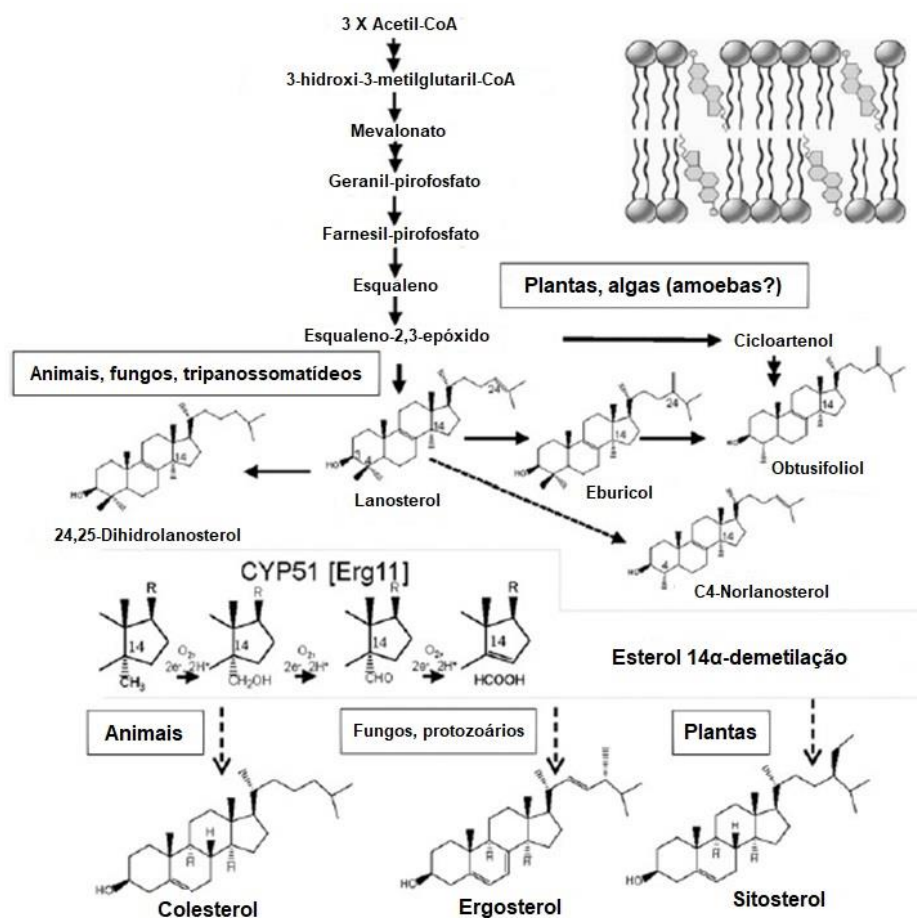


Figura 5. Via biossintética de lipídeos. O produto dessa via em fungos e cinetoplastídeos é o ergosterol, enquanto para os animais é o colesterol. Adaptado de Lepesheva, Friggeri & Waterman, 2018.

Dois inibidores de CYP51, VNI e VFV, foram testados pelo nosso grupo em colaboração com a Dra. Lepesheva, que identificou esta classe de imidazóis inibidores de CYP51 a partir de uma biblioteca da Novartis (Soeiro et al., 2013). VNI foi ativo sobre formas intracelulares da cepa Tulahuen e Y de *T. cruzi* em ensaios *in vitro* (Guedes-da-Silva et al., 2017). Estes compostos foram ativos *in vitro* sobre amastigotas axênicas e intracelulares de *L. donovani*, reduzindo a parasitemia em 89 % no caso do VFV e 60% no caso do VNI (Lepesheva et al., 2015). Nosso grupo

também reportou que estes dois compostos (VNI e VFV) suprimem a parasitemia (99,7% para VFV e entre 91 - 100% para VNI) *in vivo* em modelo murino infectado com a cepa Y de *T. cruzi* (Guedes-da-Silva et al., 2017).

1.5.3 Inibidores de fosfodiesterase

Inibidores de fosfodiesterases (PDEs) tem sido apontados como uma possível nova geração de fármacos antiparasitários, não só com relação aos parasitos do gênero *Leishmania*, mas também outros agentes causadores de patologias negligenciadas como a doença de Chagas, doença do sono e helmintos (Long et al., 2017; Veerman et al., 2016; Seebeck, Sterk & Ke, 2011).

Há alguns estudos sugerindo o papel de PDEs em diversos eventos celulares, incluindo diferenciação celular, controle de proliferação e regulação osmótica (De Koning *et al.*, 2012). As PDEs são enzimas que hidrolisam ligações fosfodiéster, incluindo as presentes em nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), que atuam como segundo mensageiros em vários eventos biológicos. Em mamíferos, são compostas por onze famílias, que desempenham diferentes funções, sendo que a compreensão destas a nível celular e molecular pode proporcionar o desenvolvimento de inibidores seletivos para tratamento de diversas doenças, como insuficiência cardíaca congestiva (inibidores de PDE3), doença inflamatória das vias aéreas (inibidores de PDE4) e, um dos exemplos mais conhecidos e de maior sucesso, para disfunção erétil (inibidores de PDE5) (Boswell-Smith, Spina & Page, 2006).

Existem três diferentes classes de PDE. As PDEs de classe I são encontradas em vertebrados e eucariotos diversos, sendo as únicas formas de PDEs em eucariotos superiores (Gancedo, 2013). O genoma de cinetoplastídeos codifica quatro PDEs de classe I diferentes (PDEA, PDEB (B1 e B2), PDEC e PDED) e não contém membros das outras classes de PDE, como é o caso do genoma humano (Beavo, 1995; Tagoe, Kalejaiye & De Koning, 2015). Os PDEs de classe II são encontrados em certos procariotos ou fungos e em alguns eucariotos inferiores, e os PDEs de classe III são apenas encontrados em bactérias (Tagoe, Kalejaiye & De Koning, 2015; Gancedo, 2013). Nos humanos, resumidamente a sinalização ocorre da seguinte forma: um determinado ligante (ex. hormônio) se associa ao seu receptor ancorado na membrana plasmática, induzindo uma mudança conformacional no domínio intracelular do receptor, e resultando na interação com proteína G. Esta proteína, quando em presença de GTP (trifosfato de guanosina), ativa a adenilil-ciclase, que por sua vez estimula a produção de AMPc a partir de

ATP. O AMPc ativa a proteína-quinase A (PKA), que catalisa a fosforilação de outras proteínas, resultando uma reação a resposta celular gerada pelo ligante em questão (ex. hormônio) (Figura 6). Um dos mecanismos de regulação desta resposta é a hidrólise do AMPc/GMPc pela ação de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (Nelson & Cox, 2011). Embora o AMPc seja produzido durante todos os estágios do ciclo dos tripanossomatídeos, suas vias de sinalização são muito diferentes em relação aos mamíferos. Diferenças de PDEs de parasitos (em relação a de mamíferos) podem permitir o desenho de inibidores mais específicos e seletivos. Algumas diferenças entre as vias de sinalização de AMPc de mamíferos e cinetoplastídeos incluem: a ausência, nos parasitos, de receptores acoplados à proteína G, PKA inativa (descrito em *T. brucei*), presença de adenilil-ciclases distintas e estruturalmente diferentes, a essencialidade em *T. brucei*, entre outras. Estes dados sugerem que PDEs possam assim, representar futuros alvos farmacológicos (Tagoe, Kalejaiye & De Koning, 2015).

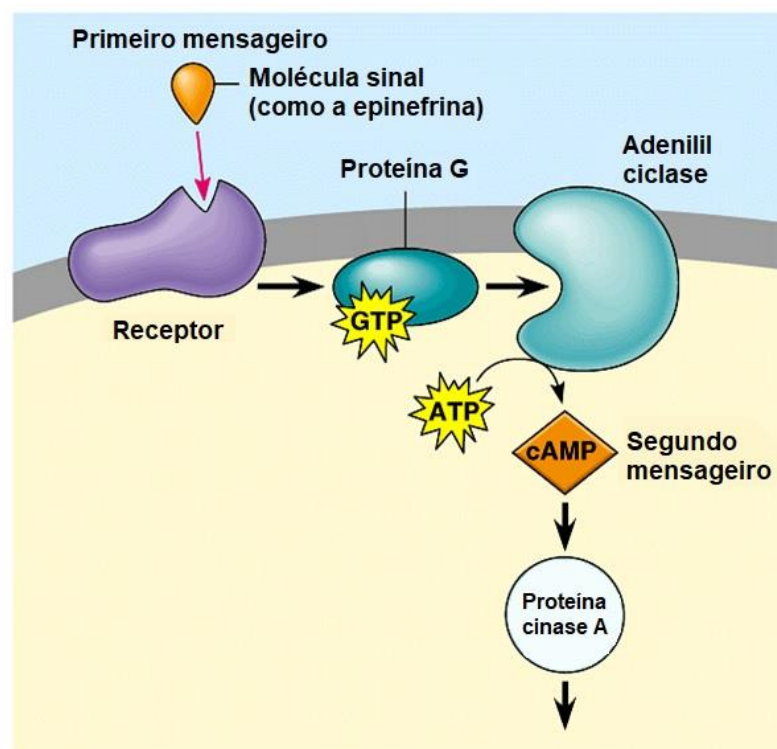


Figura 6. Demonstração de sinalização em humanos mediada pelo segundo mensageiro AMPc. A ligação do ligante ao seu receptor começa uma cascata que tem por resultado a resposta gerada pelo ligante.

Sendo as PDEs humanas amplamente estudadas e já em uso farmacológico, abre-se ainda uma oportunidade que esta experiência possa diminuir o tempo de

estudos em termos de segurança em ensaios pré-clínicos para o uso deste tipo de fármacos como agentes antiparasitários. Outra vantagem é que como as PDEs humanas e protozoárias têm também diferenças estruturais (ex. presença de região denominada de “P pocket” em tripanossomatídeos), inibidores mais seletivos podem ser desenhados e testados buscando ampliar a janela terapêutica. Em *Leishmania*, a expressão de LdPDEA é regulada no curso do crescimento e diferenciação do parasito, sendo mais expressa em promastigotas de fase logarítmica em relação a fase estacionária e mesmo em amastigotas (Bhattacharya, Biswas & Das, 2009). A inibição química ou o silenciamento da PDEA de *Leishmania* conferiram maior resistência dos parasitos a pró-oxidantes, como peróxido e peroxinitrito (Bhattacharya, Biswas & Das, 2009; Biswas, Bhattacharya & Das, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação combinatória de potenciais candidatos a fármacos sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- A. Validar a atividade leishmanicida de compostos sobre amastigotas livres pelo método de resazurina e quantificação ao microscópio de luz;
- B. Analisar a possível ação leishmanicida (sobre amastigotas livres) em esquemas de monoterapia, de diferentes compostos sintéticos (ftalazinonas e imidazóis inibidores de fosfodiesterases, quinolinas e imidazóis inibidores da síntese de ergosterol), visando determinação dos valores de EC₅₀ e seleção para estudos posteriores de combinação;
- C. Investigar efeito da combinação de fármacos de referência (pentamidina e miltefosina) com agentes leishmanicidas (previamente selecionados nos ensaios acima descritos) sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* em ensaios *ex vivo*, visando determinar os valores de EC₅₀ de cada combinação, respectivos FICI e suas médias ($x\sum FICI$) para determinação da natureza de interação;
- D. Identificar a toxicidade de moléculas isoladas e de suas combinações sobre culturas não infectadas de macrófagos peritoneais, para determinação dos valores de LC₅₀;
- E. Investigar efeito dos agentes leishmanicidas (previamente selecionados nos ensaios acima descritos) isolados ou em combinação aos fármacos de referência (pentamidina e miltefosina) sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* localizadas no citoplasma de cultivos de macrófagos peritoneais, determinando os valores de EC₅₀ dos compostos e suas combinações, respectivos FICI e suas médias ($x\sum FICI$) para determinação da natureza de interação;

- F. Calcular os índices de seletividade (razão entre valores de LC_{50} e EC_{50} das monoterapias e suas combinações) para avaliar o futuro potencial uso sobre infecção em modelos experimentais;
- G. Analisar ultraestruturalmente (utilizando o microscópio eletrônico de varredura) danos celulares a amastigotas obtidas de lesão de animais infectados e expostos ou não às combinações mais promissoras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Compostos

Dezoito compostos sendo 12 ftalazinonas e imidazóis inibidores de fosfodiesterase (NPD 001, 005, 007, 008, 029, 040, 223, 340, 3115, 3124, 3125 e 3126) cedidos pela VU University (Amsterdã, Holanda, pelo grupo do Dr Rob Leurs), dois imidazóis inibidores de CYP51 (VNI e VFV) cedidos pela Dr Galina Lepesheva (Wanderbilt University/USA) e quatro quinolinas (DB2131, DB2186, DB2191 e DB2217) sintetizadas e cedidas pelo Dr David Boykin (Georgia State University/USA) foram testadas. Soluções estoques foram preparadas a 20 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) cuja concentração final < 0,6 % não confere toxicidade sobre células de mamíferos e parasitos (Silva et al., 2007). Como controles, foram usados dois fármacos de referência, pentamidina e miltefosina (positivos), ou somente veículo (negativo).

3.2 Culturas de células de mamíferos

Culturas primárias de macrófago peritoneal foram obtidas a partir do peritônio de camundongos previamente estimulados com 3 % de tioglicolato e cultivadas como descrito por Ribeiro-Dias et al., 1998. As células foram semeadas em placas de 24 (300 x 10³ cels/poço) ou de 96 poços (50 x 10³ cels/poço) e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂.

3.3 Parasitos

Amastigotas de *L. amazonensis* (cepa LTB0016) foram obtidas após 30-40 dias pós infecção (dpi), a partir de lesões de camundongos Balb/c inoculados na pata posterior com 10⁶ amastigotas (Stauber, 1956; Godinho et al., 2012). Após purificação a partir de centrifugações diferenciais, as amastigotas foram usadas diretamente nos ensaios *ex vivo* de atividade fenotípica e de alvos celulares com metodologias já padronizadas no LBC/IOC/Fiocruz (De Souza et al., 2004) ou utilizadas para infecção de macrófagos peritoneais (razão parasito:célula de 3:1).

3.4 Toxicidade sobre células de mamífero

Culturas de macrófagos peritoneais não infectados foram plaqueados em placas de 96 poços (50 x 10³ cels/poço) e 24 h após, incubados por 48 h a 37°C com diferentes concentrações dos compostos isolados e em combinação (até sua solubilidade). As culturas foram avaliadas quanto a sua fisiologia, morfologia por microscopia de luz e viabilidade celular mensurada através do reagente AlamarBlue, visando a determinação dos valores de LC₅₀, que corresponde à concentração mínima capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular. Este reagente (20 µl por poço) foi adicionado ao experimento após 48h de tratamento da cultura com os compostos testados. Após 24 h a 37°C, foi feita a leitura da absorbância a 570 e 600 nm em espectrofotômetro para análise dos resultados. O AlamarBlue é um indicador de viabilidade celular que utiliza o poder redutor de células vivas para converter a resazurina em uma molécula fluorescente, a resorufina. A resazurina é o composto ativo do AlamarBlue e é permeável às células e possui cor azul, já a resorufina é altamente fluorescente e possui cor avermelhada. A constante conversão da resazurina em resorufina é o que gera a quantificação de viabilidade (ThermoFisher, 2019).

3.5 Validação de ensaio de atividade com amastigota livre

Para utilização do indicador de viabilidade celular AlamarBlue nos ensaios com amastigota livre, primeiramente foi feita uma validação comparando os resultados com o uso do indicador e leitura em espectrofotômetro e a contagem em câmara de Neubauer, método amplamente utilizado pelo nosso grupo para contagem de parasitos em microscópio de luz (Batista et al., 2010; Da Silva et al., 2017). Visto que os resultados foram semelhantes nos dois métodos, foi utilizado somente o primeiro no restante dos ensaios *in vitro* utilizando amastigotas livres juntamente com os compostos isolados ou em combinação em placas de 96 poços.

3.6 Atividade *in vitro*

Os estudos de atividade fenotípica *in vitro* foram conduzidos com dois protocolos utilizando efeito direto sobre amastigotas obtidas de lesão de animais infectados (amastigotas livres) e sobre amastigotas intracelulares presentes em

fagossomas de macrófagos peritoneais. Nos estudos de atividade sobre amastigotas intracelulares, camundongos machos Swiss foram inoculados com 3 % de tioglicolato. Após 96 h, as células peritoneais foram semeadas (300×10^3 cels/poço) em placas de 24 poços. A infecção com amastigotas isoladas de lesão de camundongos infectados com *L. amazonensis* (razão parasito:célula hospedeira será 3:1), foi realizada 24 h após o plaqueamento. Depois de 2 h de interação, as culturas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS) e os compostos isolados ou em combinação foram adicionados e mantidos por 48 h. Após fixação com Bouin e coloração por Giemsa, o percentual de infecção, o número médio de parasitos por célula infectada e o índice de infecção (produto dos valores de percentual de infecção e número médio de parasitos por célula infectada) foram determinados ao microscópio de luz para cálculo do EC₅₀ (De Araújo et al., 2014).

Para ensaios com amastigota livre, foram utilizados compostos sozinhos ou em combinação, sendo adicionados juntamente com o parasito em placas de 96 poços (1×10^6 parasitos/poço). Após 48 h de incubação com os compostos e suas combinações, foi adicionado 20 µl de AlamarBlue em cada poço da placa e, 24 h depois, foi feita a leitura das placas medindo-se em um espectrofotômetro a absorvância em 570 e 600 nm para cálculo do EC₅₀, respectivo valor FICI e média dos ΣFICIs ($x\Sigma FICI$) das combinações.

3.6.1 Avaliação dos compostos em combinação

As interações de compostos in vitro foram avaliadas utilizando um método de proporção fixa (Fivelman et al., 2004). Inicialmente, as concentrações máximas de cada composto individual são determinadas, de modo a assegurar que o EC₅₀ de cada um fique na faixa da quarta diluição (diluição seriada de 1:2) em uma série de sete (Trinconi et al. 2016). Por conseguinte, as concentrações superiores são preparadas em proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de cada composto respectivamente, seguidas por diluições em série até o sétimo poço da placa (Fivelman et al. 2004; Trinconi et al. 2016) (Figura 7). Para cada razão, é calculado EC₅₀ relativo a cada composto, separadamente. Para cada combinação, são utilizados pelo menos dois experimentos independentes em triplicata.

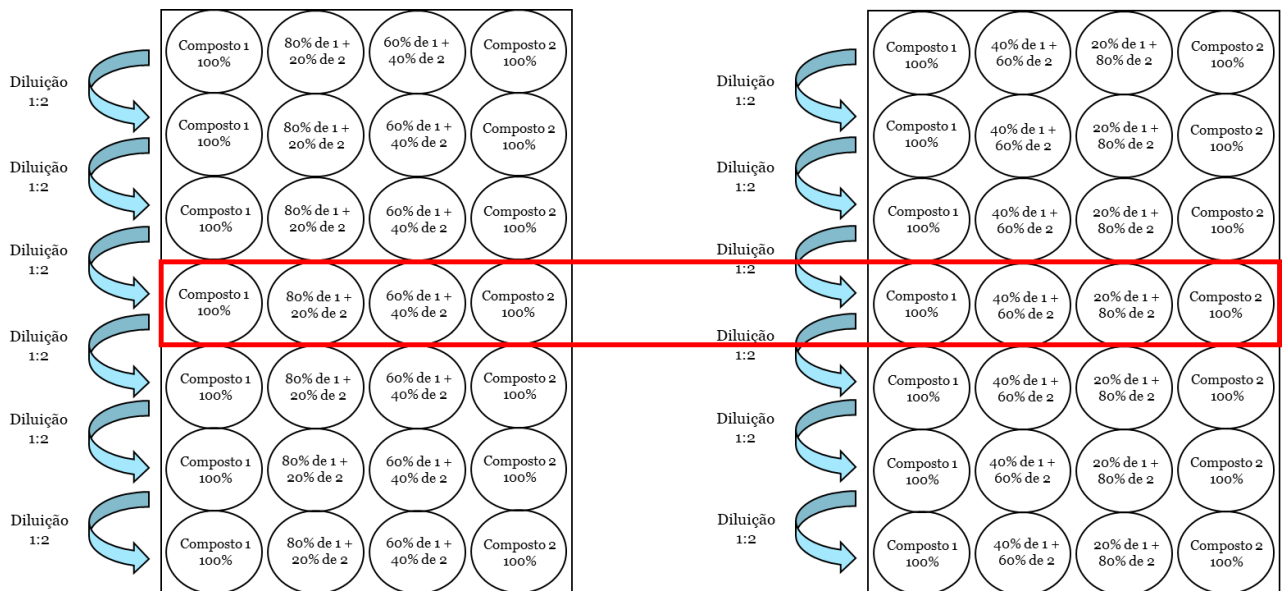


Figura 7. Demonstração da diluição dos compostos para experimentos de atividade em combinação. Destacado em vermelho a faixa do EC₅₀ dos compostos. Acima, concentrações maiores do que o EC₅₀ e abaixo, menores.

3.6.2 Determinação do índice de FIC (FICI) e construção de isobologramas

O índice de concentração inibitória fracional (FICI) no EC₅₀ de cada composto foi calculado pela razão do EC₅₀ quando em combinação / EC₅₀ do composto sozinho (5:0). O somatório de FICI (Σ FICI) para cada proporção foi obtido através do somatório do FICI de cada molécula (Trinconi et al., 2016). A média dos Σ FICIs ($x\Sigma$ FICI) foi calculada e utilizada para classificar a interação da natureza, feito conforme recomendado por Odds (2003): sinergia para $x\Sigma$ FICI $\leq 0,5$, sem interação para $x\Sigma$ FICI entre 0,5-4 e antagonismo para $x\Sigma$ FICI > 4 .

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

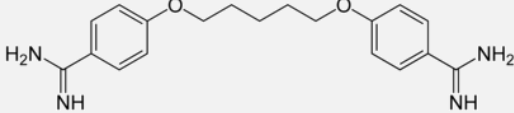
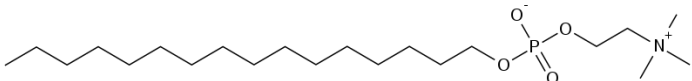
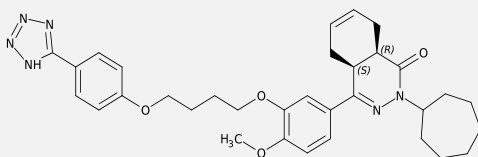
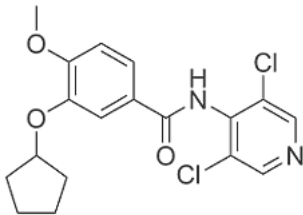
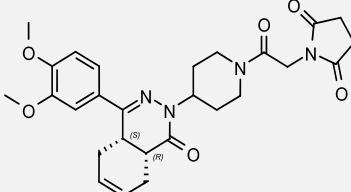
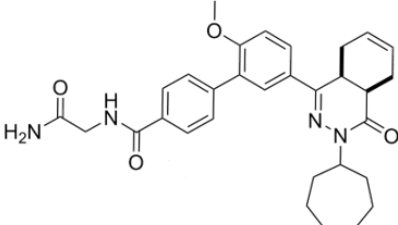
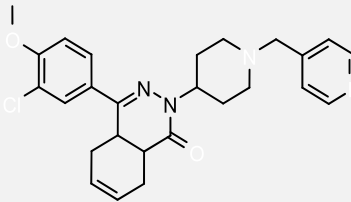
Para analisar alvos celulares das combinações mais promissoras, amastigotas livres obtidas de lesão foram tratadas por 24-48 h ou não (controle) com concentrações de EC₅₀ previamente determinadas nas combinações (EC₅₀ de 48 h), fixadas em 2,5 % de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato e processadas para rotina em MEV (Menna-Barreto et al., 2009).

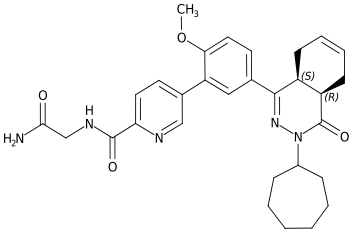
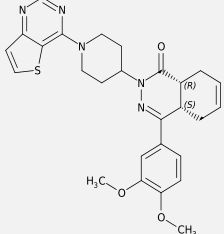
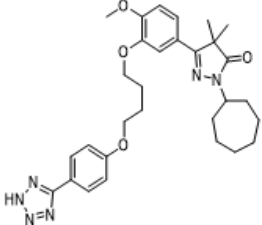
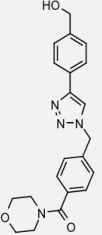
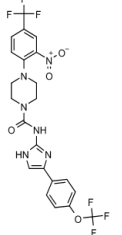
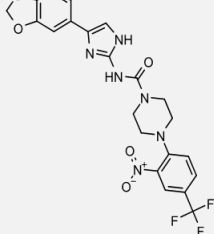
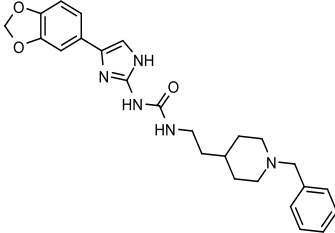
3.8 Aspectos éticos (CEP/CEUA)

Este estudo (LW-16/14) foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ, seguindo os princípios éticos e humanitários de cuidado com animal conforme princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4 RESULTADOS

Inicialmente, a atividade fenotípica de 18 novos compostos (Tabela 3) em esquemas de monoterapia foi avaliada em ensaios *ex vivo* sobre formas amastigotas obtidas de lesões na pata de camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis*. Como controle positivo, realizou-se a análise de dois fármacos de referência para o tratamento de leishmanioses, a miltefosina (Mt) e a pentamidina (Pt). A ação leishmanicida dos novos compostos e dos fármacos foi verificada pelo uso de um indicador de oxirredução, a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido), que permite avaliar o metabolismo mitocondrial, e assim, a viabilidade celular. Em células vivas, na presença de NADPH desidrogenase/NADH desidrogenase, NADPH ou NADH reduzem o corante azul resazurina convertendo-o em resorufina, um corante rosa, cuja conversão é mensurada pela leitura da densidade óptica (DO). Importante destacar que antes da aplicação do sistema colorimétrico (AlamarBlue) nos estudos de atividade fenotípica, diversos ensaios foram conduzidos pela quantificação ao microscópio de luz, do número de parasitos vivos após incubação das amastigotas com meio de cultura (controle negativo) e em presença de crescentes concentrações dos compostos, visando comparar os resultados obtidos por ambos métodos (quantificação ao microscópio e leitura da DO). Além disso, durante a padronização, foram avaliados vários comprimentos de onda para leitura em espectrofotômetro (540, 550, 570, 585, 600 e 630 nm), como também uma curva de densidade parasitária para determinação do limiar de sensibilidade de detecção de parasitas pelo método colorimétrico (5×10^5 , 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$). Também foram testadas diferentes proporções de infecção de células hospedeiras (macrófagos) por amastigotas de *L. amazonensis* (razões parasito:macrófagos 10:1, 5:1, 3:1 e 2,5:1).

Composto	Estrutura química
Pentamidina	
Miltefosina	
NPD001	
NPD005	
NPD007	
NPD008	
NPD029	

<p>NPD040</p>	
<p>NPD223</p>	
<p>NPD340</p>	
<p>NPD3115</p>	
<p>NPD3124</p>	
<p>NPD3125</p>	
<p>NPD3126</p>	

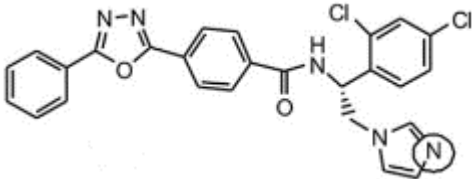
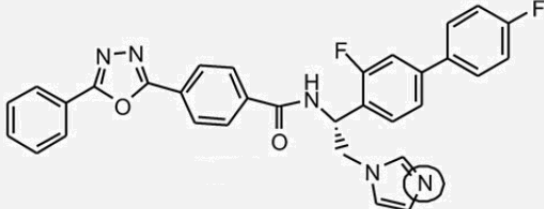
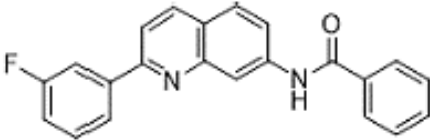
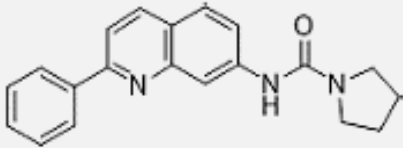
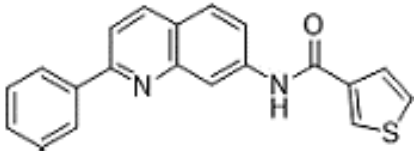
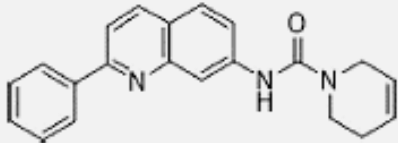
<p>VNI</p>	
<p>VFV</p>	
<p>DB2131</p>	
<p>DB2186</p>	
<p>DB2191</p>	
<p>DB2217</p>	

Tabela 3. Compostos avaliados no projeto e fármacos de referência com suas respectivas estruturas químicas.

Nossos resultados revelam potências semelhantes entre as análises ao microscópio quando comparados aos achados colorimétricos, demonstrando uma boa correlação entre os valores de EC_{50} destes dois métodos (Figura 8), o que nos permitiu prosseguir com o uso de resazurina como indicador de viabilidade das

amastigotas. Para cada composto testado, foram feitos pelo menos dois ensaios independentes em triplicatas.

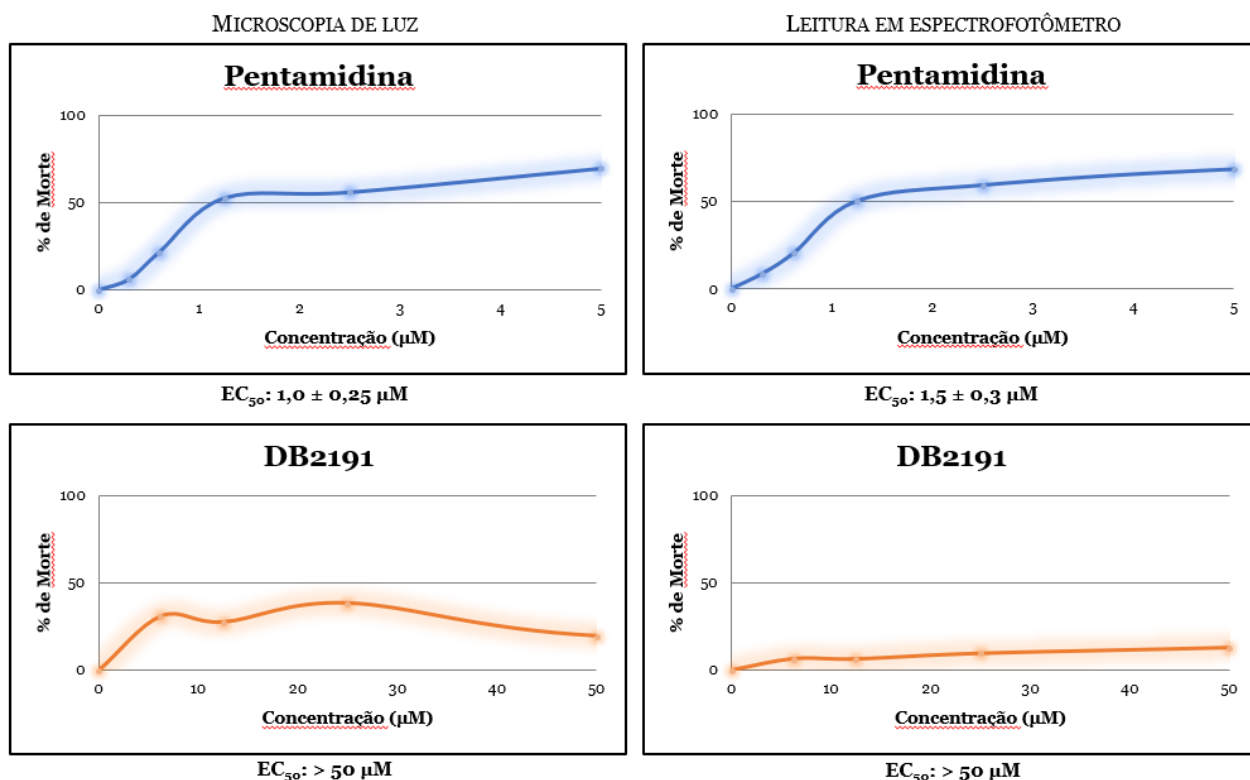


Figura 8. Comparação entre a ação leishmanicida da pentamidina e do composto NPD2191 pela quantificação ao microscópio de luz e do sistema colorimétrico (AlamarBlue) e leitura em espectrofotômetro. Os gráficos demonstram que não houve diferença entre os resultados obtidos por ambos métodos.

Nossos resultados mostram que 09 dos 18 novos compostos testados não foram ativos, exibindo valores de EC₅₀ > 50 µM (Tabela 4). Os inibidores de PDEs (as ftalazinonas NPD001, NPD008, NPD040 e NPD029 e os imidazóis NPD3115, NPD3124, NPD3125, NPD3126) e o inibidor de biossíntese de ergosterol (o imidazol VNI) apresentaram atividade leishmanicida moderada (valores de EC₅₀ entre 10,15 e 44 µM), sendo todos menos efetivos que os fármacos de referência, a Mt e Pt, que apresentam valores de EC₅₀ respectivamente 4 e 1,5 µM (Tabela 4). Todas as quinolinas foram inativas sobre os parasitos até a maior concentração testada (50 µM).

Atividade (μM) sobre formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (<i>ex vivo</i>): Média \pm Desvio Padrão	
NOME	EC ₅₀
Pentamidina	1,5 \pm 0,3
Miltefosina	4 \pm 0,41
NPD3126*	10,15 \pm 0,35
NPD008*	10,8 \pm 1,5
NPD040*	11,2
NPD001*	13 \pm 1,84
NPD3115*	14,7 \pm 3,81
NPD029	18,75 \pm 1,34
NPD3124	26 \pm 0,98
VNI	29,4 \pm 2,9
NPD3125	44 \pm 22,2
NPD005	> 50
NPD007	> 50
NPD223	> 50
NPD340	> 50
VFV	>50
DB2131	>50
DB2186	>50
DB2191	>50
DB2217	>50

Tabela 4. Análise da atividade (EC₅₀) de compostos em ensaios *ex vivo* de monoterapia com amastigotas livres de *Leishmania amazonensis* cepa LTB0016. Em azul: ftalazinonas; laranja: imidazóis inibidores de PDE; verde: imidazóis inibidores de CYP51; cinza: quinolinas.

A seguir, os melhores compostos (as ftalazinonas e imidazóis inibidores de PDE – NPD001, NPD008, NPD040, NPD3115 e NPD3126, em asteriscos na Tabela 4) foram selecionados para estudos de combinação com Mt e Pt e também entre si, utilizando o método de concentrações fixas, tendo por base, os respectivos valores de EC₅₀. Pelo menos dois ensaios independentes em triplicata foram realizados para cada combinação. Em todas as combinações, obtivemos como média ΣFICI , valores entre 0.9 e 1.41, o que de acordo com a classificação de Odds (2003), foram classificados como “aditividade” ou ausência de interação (Tabela 5). A classificação segundo Odds é avaliada da seguinte forma: sinergia para $x\Sigma\text{FICI} \leq 0,5$, sem interação para $x\Sigma\text{FICI}$ entre 0,5-4 e antagonismo para $x\Sigma\text{FICI} > 4$. Como exemplo, temos os isobogramas das combinações entre o composto NPD008 com miltefosina ($x\Sigma\text{FICI} = 1,24$) e NPD008 com pentamidina ($x\Sigma\text{FICI} = 0,94$) (Figura 9).

Combinações	$x\Sigma FICI$	Classificação da Interação
NPD001 + Miltefosina	1,07	Sem interação
NPD001 + Pentamidina	1,16	Sem interação
NPD001 + NPD008	0,93	Sem interação
NPD008 + Miltefosina	1,24	Sem interação
NPD008 + Pentamidina	0,94	Sem interação
NPD040 + Miltefosina	1,41	Sem interação
NPD040 + Pentamidina	1,15	Sem interação
NPD3115 + Miltefosina	0,95	Sem interação
NPD3115 + Pentamidina	0,90	Sem interação
NPD3126 + Miltefosina	1,27	Sem interação
NPD3126 + Pentamidina	1,03	Sem interação

Tabela 5. Análise da atividade de ftalazinonas e imidazóis inibidores de fosfodiesterase em combinação com miltefosina e pentamidina ou entre si em ensaios *ex vivo* com amastigotas livres de *Leishmania amazonensis* cepa LTB0016.

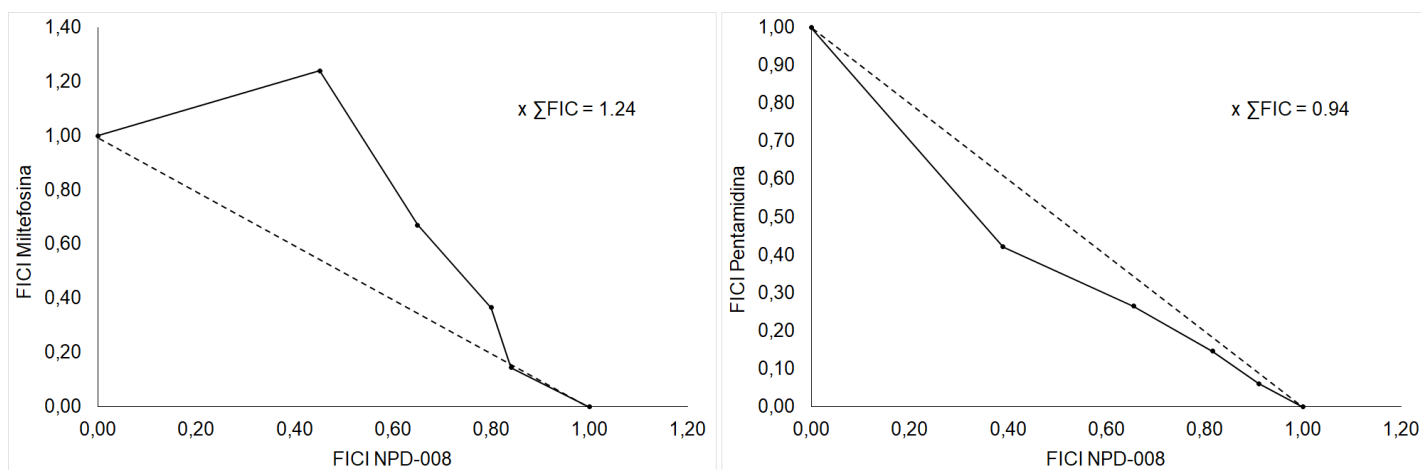


Figura 9. Exemplos de isobogramas com seus respectivos $x\Sigma FICI$ das combinações entre o composto NPD008 e pentamidina e NPD008 e miltefosina em ensaios *ex vivo* com amastigotas livres de *Leishmania amazonensis* cepa LTB0016.

Em paralelo, foi identificado o perfil de toxicidade (48 horas de incubação) sobre células de mamíferos das moléculas mais ativas (Tabela 6) assim como frente às distintas combinações testadas (Tabela 7), utilizando culturas não infectadas de macrófagos peritoneais. Foi observado que os compostos testados tiveram valores de LC_{50} superiores a pentamidina, sendo, portanto, menos tóxicos que esta diamidina ($LC_{50} = 15,2 \mu M$). Porém, quando comparados a miltefosina ($LC_{50} = 157,6 \mu M$), as ftalazinonas e o imidazol NPD3126 inibidores de PDEs foram mais citotóxicos exibindo os seguintes valores de LC_{50} : NPD001: $34,8 \mu M$; NPD008: $40,7 \mu M$ e NPD3126: $32,8 \mu M$. O composto NPD3115 teve baixa solubilidade em concentrações superiores a $15 \mu M$ e por isso não foi possível determinar seu LC_{50} (Tabela 6). Dados anteriores do nosso grupo (submetidos a publicação, De Araújo et

al., 2019) revelaram que NPD040 exibe toxicidade sobre células de mamíferos (linhagens L929) na faixa 28 μM , após 96 horas de incubação.

O índice de seletividade (IS) também foi calculado, podendo ser observado que os compostos testados tiveram o IS menor que os dois fármacos de referência (miltefosina e pentamidina), sendo os valores: Mt: 39,4; Pt: 10,1; NPD001: 2,7; NPD 008: 3,8 e NPD 3126: 3,2. O IS do composto NPD3115 não pode ser determinado já que seu LC_{50} também não pode ser calculado (Tabela 6). Com base no valor de 28 μM , a NPD040 alcança também baixos valores de IS (cerca de 2,5).

**Atividade, toxicidade e seus respectivos índices de seletividade (IS)
sobre amastigotas livres**

	EC_{50} (μM)	LC_{50} (μM)	IS
Miltefosina	4	157,6	39,4
Pentamidina	1,5	15,2	10,1
NPD001	13	34,8	2,7
NPD008	10,8	40,7	3,8
NPD3115	14,7	Não determinado	Não determinado
NPD3126	10,15	32,8	3,2

Tabela 6. Identificação da toxicidade dos compostos isolados (LC_{50}) sobre culturas não infectadas de macrófagos intraperitoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS), demonstrando a razão entre valores de LC_{50} e EC_{50} .

Com relação a toxicidade dos compostos em combinação quando testados sobre culturas não infectadas de macrófagos peritoneais, foi observado que na proporção de 04:01 (ou seja, proporção de 80 % do composto teste e 20 % do fármaco de referência – 74,88 μM NPD001 + 6,4 μM Mt, 74,88 μM NPD001 + 1,6 μM Pt, 62,72 μM NPD008 + 6,4 μM Mt, 62,72 μM NPD008 + 1,6 μM Pt, 64,96 μM NPD3126 + 6,4 μM Mt e 64,96 μM NPD3126 + 1,6 μM Pt), todas as combinações resultaram em perdas de viabilidade das células, superiores a 67 % e, portanto, alta toxicidade. A proporção de 03:02 (proporção de 60 % do composto teste e 40 % do fármaco de referência) também apresentou alta toxicidade (superior a 69 %) na maioria das combinações testadas (56,16 μM NPD001 + 3,2 μM Pt, 47,04 μM NPD008 + 12,8 μM Mt, 47,04 μM NPD008 + 3,2 μM Pt e 48,72 μM NPD3126 + 12,8 μM Mt). A combinação de NPD008 + Pt apresentou elevada toxicidade (64 a 86 % de perda de viabilidade celular) em todas as proporções testadas somente nas maiores concentrações. Também foi visto que na combinação de NPD3115 + Mt não

houve perda de viabilidade, fato talvez observado provavelmente devido à baixa solubilidade do imidazol (Tabela 7).

Combinação	Perda de viabilidade (%)	Concentrações (μM)	
NPD001 + Mt	85	93,6 (100% NPD001)	
	67	74,88 + 6,4 (80/20)	
NPD001 + Pt	84	93,6 (100% NPD001)	
	80	74,88 + 1,6 (80/20)	
	69	56,16 + 3,2 (60/40)	
NPD008 + Mt	86	78,4 (100% NPD008)	
	56	39,2 (100% NPD008)	
	87	62,72 + 6,4 (80/20)	
	87	47,04 + 12,8 (60/40)	
NPD008 + Pt	80	78,4 (100% NPD008)	
	64	39,2 (100% NPD008)	
	86	62,72 + 1,6 (80/20)	
	86	47,04 + 3,2 (60/40)	
	79	31,36 + 4,8 (40/60)	
	69	15,68 + 6,4 (20/80)	
NPD3115 + Mt	0	-	
NPD3126 + Mt	87	81,2 (100% NPD3126)	
	79	40,6 (100% NPD3126)	
	88	64,96 + 6,4 (80/20)	
	87	48,72 + 12,8 (60/40)	
NPD3126 + Pt	87	81,2 (100% NPD3126)	
	84	64,96 + 1,6 (80/20)	

	LC ₅₀ (μM)
Miltefosina	157,6
Pentamidina	15,2
NPD001	34,8
NPD008	40,7
NPD3115	Não determinado
NPD3126	32,8

Tabela 7. Identificação da toxicidade dos compostos em combinação sobre culturas não infectadas de macrófagos peritoneais, através da demonstração da porcentagem de perda de viabilidade das células e suas respectivas concentrações da combinação.

Em seguida, visando validar a ação leishmanicida dos compostos isolados e em combinação, a atividade dos 03 melhores compostos foi investigada sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, além de em paralelo, analisar a ação dos 02 fármacos de referência. Ao final dos ensaios, o percentual de infecção, o número médio de parasitos por célula infectada e o índice de infecção (que representa a multiplicação entre estes dois parâmetros) foram determinados ao microscópio de luz para cálculo do EC₅₀ (Tabela 8). A contagem dos parasitos localizados em típicos vacúolos parasitóforos no citoplasma dos macrófagos foi feita levando em consideração a presença característica do núcleo e

kDNA dos parasitos (setas, inset, Figura 10B) visualizados ao microscópio. As imagens evidenciam a grande redução no número de parasitos e percentual de células infectadas após incubação com 7,5 μ M de NPD008 e de NPD3126.

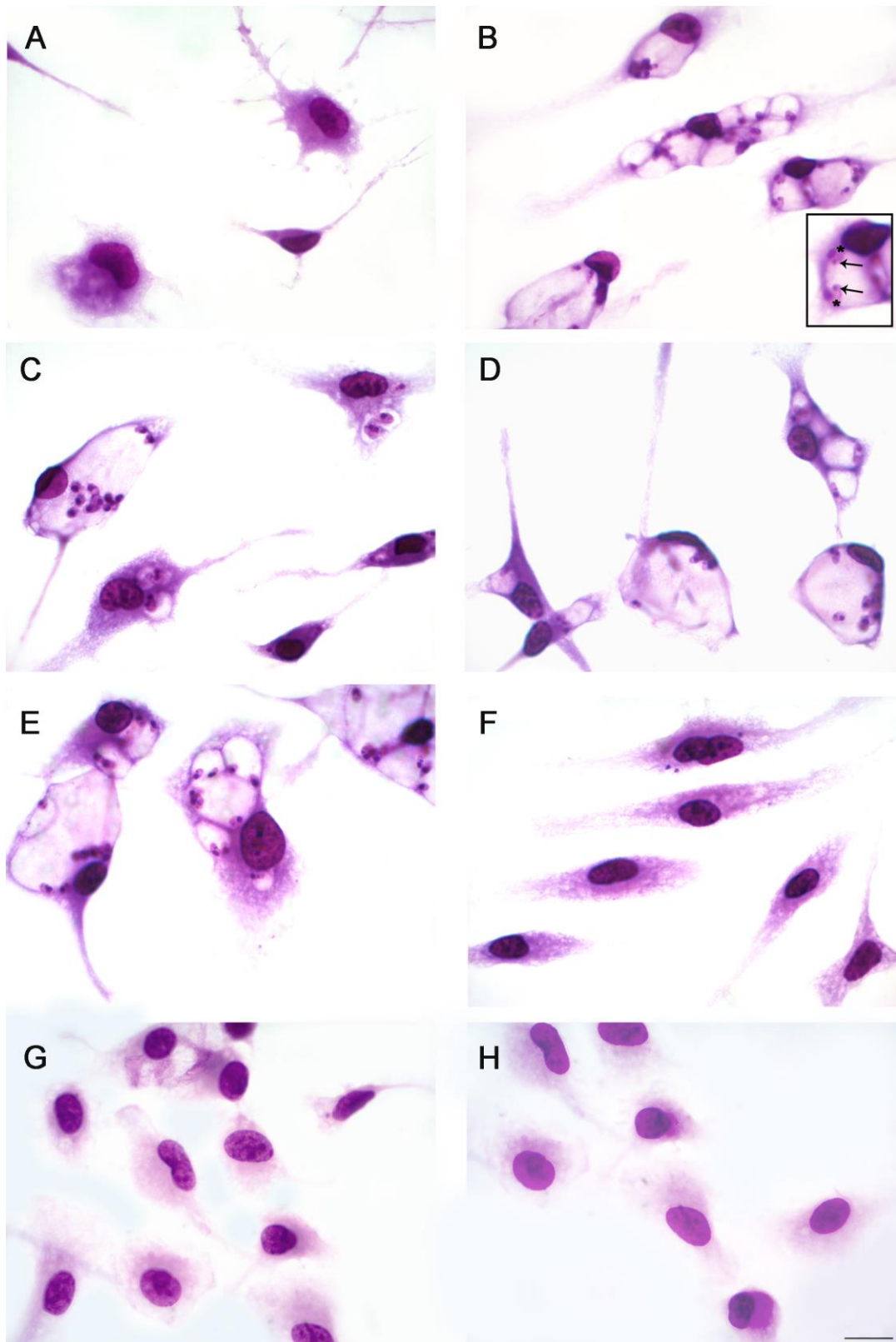


Figura 10. (A-H): Imagem por microscopia de luz de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados ou não com os compostos testados, fixados com Boiun e corados com Giemsa. A: Macrófagos não infectados e sem tratamento; B: Macrófagos infectados e sem tratamento, podendo ser vistos o núcleo do parasito (*) e seu kDNA (seta); C: Macrófagos infectados e tratados com 10 μ M de miltefosina; D: Macrófagos infectados e tratados com 10 μ M de pentamidina; E: Macrófagos infectados e tratados com 7,5 μ M de NPD001; F: Macrófagos infectados e tratados com 7,5 μ M de NPD3126; G e H: Macrófagos infectados e tratados com 7,5 μ M de NPD008. Barra: 10 μ M.

Foi demonstrado nos ensaios de monoterapia com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (Tabela 8) que os compostos NPD008 e NPD3126 exibiram superior ação leishmanicida em relação as amastigotas livres obtidas de lesão de animais infectados (Tabela 4), assim como também para a pentamidina, sendo respectivamente: pentamidina (0,35 μM e 1,5 μM); NPD008 (2,38 μM e 10,8 μM) e NPD3126 (5,0 μM e 10,15 μM).

Vale ressaltar que a NPD008 teve o valor de EC_{50} (2,38 μM) menor do que a miltefosina (5,0 μM).

MÉDIA EC_{50} amastigota intracelular (μM)

	#1	#2	Média \pm Desvio Padrão
Miltefosina	6,13	4,00	5,0 \pm 1,5
Pentamidina	0,46	0,24	0,35 \pm 0,1
NPD001	12,17	8,7	10,43 \pm 2,4
NPD008	3,58	1,18	2,38 \pm 1,7
NPD3126	5,29	4,71	5,0 \pm 0,4

Tabela 8. Análise da atividade (EC_{50}) de compostos em ensaio de monoterapia com macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa LTB0016.

No ensaio de combinação do composto NPD008 com pentamidina (combinação mais promissora de acordo com os demais experimentos) sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, foi confirmado o resultado de aditividade ou ausência de interação, de acordo com a classificação de Odds (2003), como observado nos ensaios de combinação com amastigotas livres, tendo como média ΣFICI o valor de 1.39. Nesta combinação, algumas concentrações foram bastante ativas tendo 100 % de redução do índice de infecção, como 19,04 μM e 9,52 μM de NPD008 (NPD 100%), 15,23 μM de NPD008 + 0,56 μM de Pt, 7,61 de NPD008 + 0,28 μM de Pt, 11,42 μM de NPD008 + 1,12 μM de Pt e 7,62 μM de NPD008 + 1,68 μM de Pt. Também tiveram alta porcentagem de inibição, as concentrações 4,76 μM de NPD008 (97 %), 5,71 μM de NPD008 + 0,56 μM de Pt (98 %) e 3,81 μM de NPD008 + 2,24 μM de Pt (94 %) (Tabela 9).

Proporção	Redução do índice de infecção (%)	Concentrações (µM)
NPD008 100%	100	19,04
	100	9,52
	97	4,76
NPD008 80% + Pt 20%	100	15,23 + 0,56
	100	7,61 + 0,28
NPD008 60% + Pt 40%	100	11,42 + 1,12
	98	5,71 + 0,56
NPD008 80% + Pt 20%	100	7,62 + 1,68
NPD008 20% + Pt 80%	94	3,81 + 2,24

Tabela 9. Análise da atividade (redução do índice de infecção) de compostos em ensaio de combinação do composto NPD008 com pentamidina sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa LTB0016.

Outras concentrações demonstradas na imagem a seguir tiveram baixa inibição da infecção, como 3,81 µM de NPD008 + 0,84 µM de Pt (68 %), 1,90 µM de NPD008 + 1,12 µM de Pt (52 %) e 1,4 µM de Pt (39 %) (Figura 11).

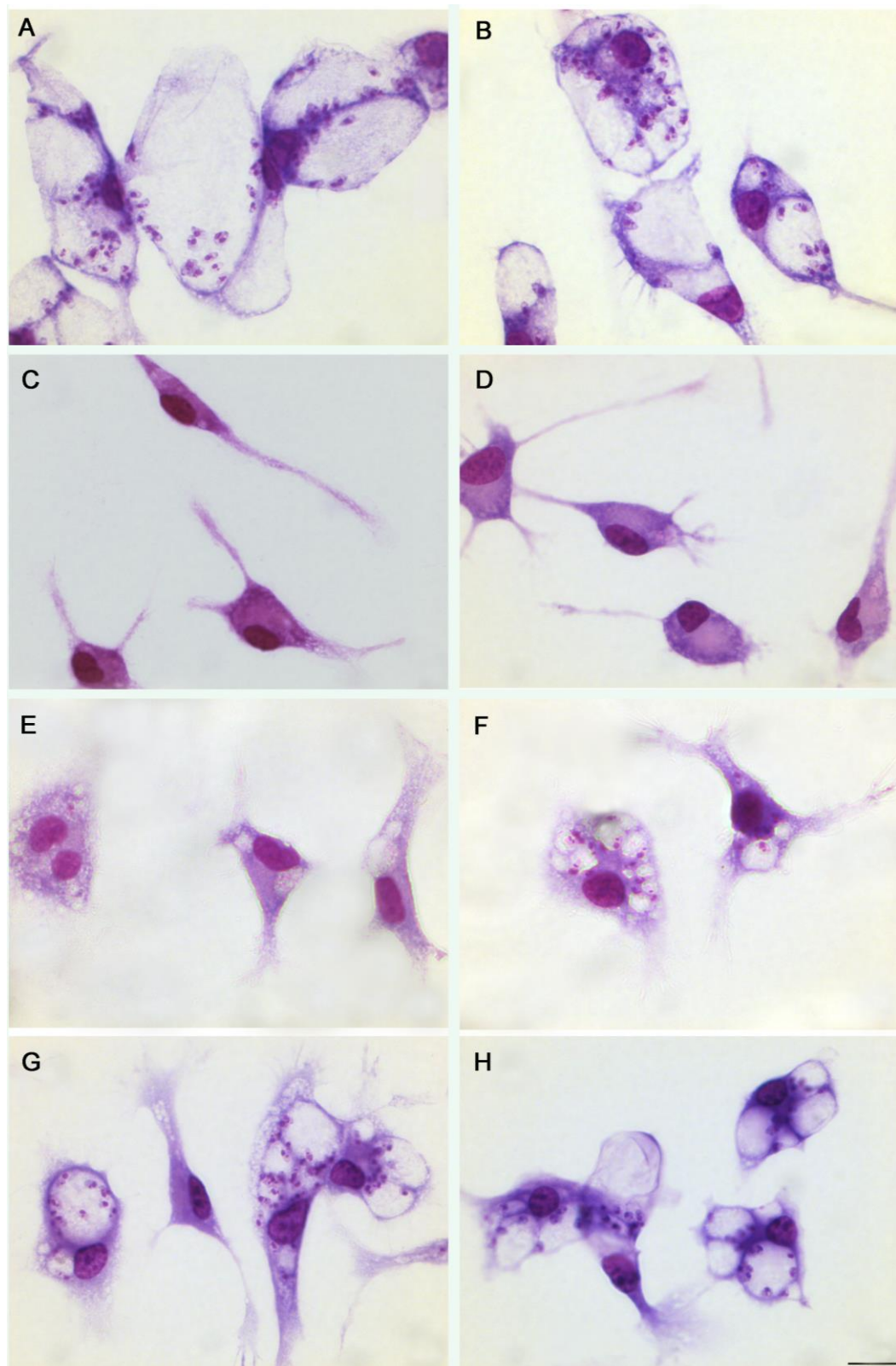


Figura 11. (A-H): Imagem por microscopia de luz de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados ou não com as combinações testadas, fixados com Boiun e corados com Giemsa. A e B: Macrófagos infectados e sem tratamento; C: Macrófagos infectados e tratados com 9,52 μM de NPD008; D: Macrófagos infectados e tratados com combinação de 7,61 μM de NPD008 + 0,28 μM de pentamidina (80 % de NPD008 + 20 % de Pt); E: Macrófagos infectados e tratados com combinação de 5,71 μM de NPD008 + 0,56 μM de pentamidina (60 % de NPD008 + 40 % de Pt); F: Macrófagos infectados e tratados com combinação de 3,81 μM de NPD008 + 0,84 μM de pentamidina (40 % de NPD008 + 60 % de Pt); G: Macrófagos infectados e tratados com combinação de 1,90 μM de NPD008 + 1,12 μM de pentamidina (20 % de NPD008 + 80 % de Pt) e H: Macrófagos infectados e tratados com 1,4 μM de pentamidina. Barra: 10 μM .

O índice de seletividade (IS) com relação ao EC₅₀ dos ensaios sobre amastigotas intracelulares também foi calculado, podendo ser observado que os compostos testados também tiveram o IS menor que os dois fármacos de referência (miltefosina e pentamidina), como visto com amastigotas livres, porém NPD008 foi o composto que teve o IS mais alto comparado aos demais inibidores de PDE testados, sendo os valores: Mt: 31,5; Pt: 43,4; NPD001: 3,3; NPD 008: 17,1 e NPD 3126: 6,6 (Tabela 10).

**Atividade, toxicidade e seus respectivos índices de seletividade (IS)
sobre amastigotas intracelulares**

	EC ₅₀ (µM)	LC ₅₀ (µM)	IS
Miltefosina	5,0	157,6	31,5
Pentamidina	0,35	15,2	43,4
NPD001	10,43	34,8	3,3
NPD008	2,38	40,7	17,1
NPD3126	5,0	32,8	6,6

Tabela 10. Identificação da toxicidade dos compostos isolados (LC₅₀) sobre culturas não infectadas de macrófagos intraperitoneais e seus respectivos índices de seletividade (IS) sobre amastigotas intracelulares, demonstrando a razão entre valores de LC₅₀ e EC₅₀.

Também foi feito ensaio de microscopia eletrônica de varredura com amastigotas livres tratadas ou não por 24 h e 48 h com as combinações de NPD008 e pentamidina e de NPD008 com miltefosina. Podemos observar que os controles (24 h e 48 h) exibem morfologia característica e não há alterações no perfil morfológico das amastigotas tratadas por 24 h com a combinação de NPD008 + pentamidina (Figura 12).

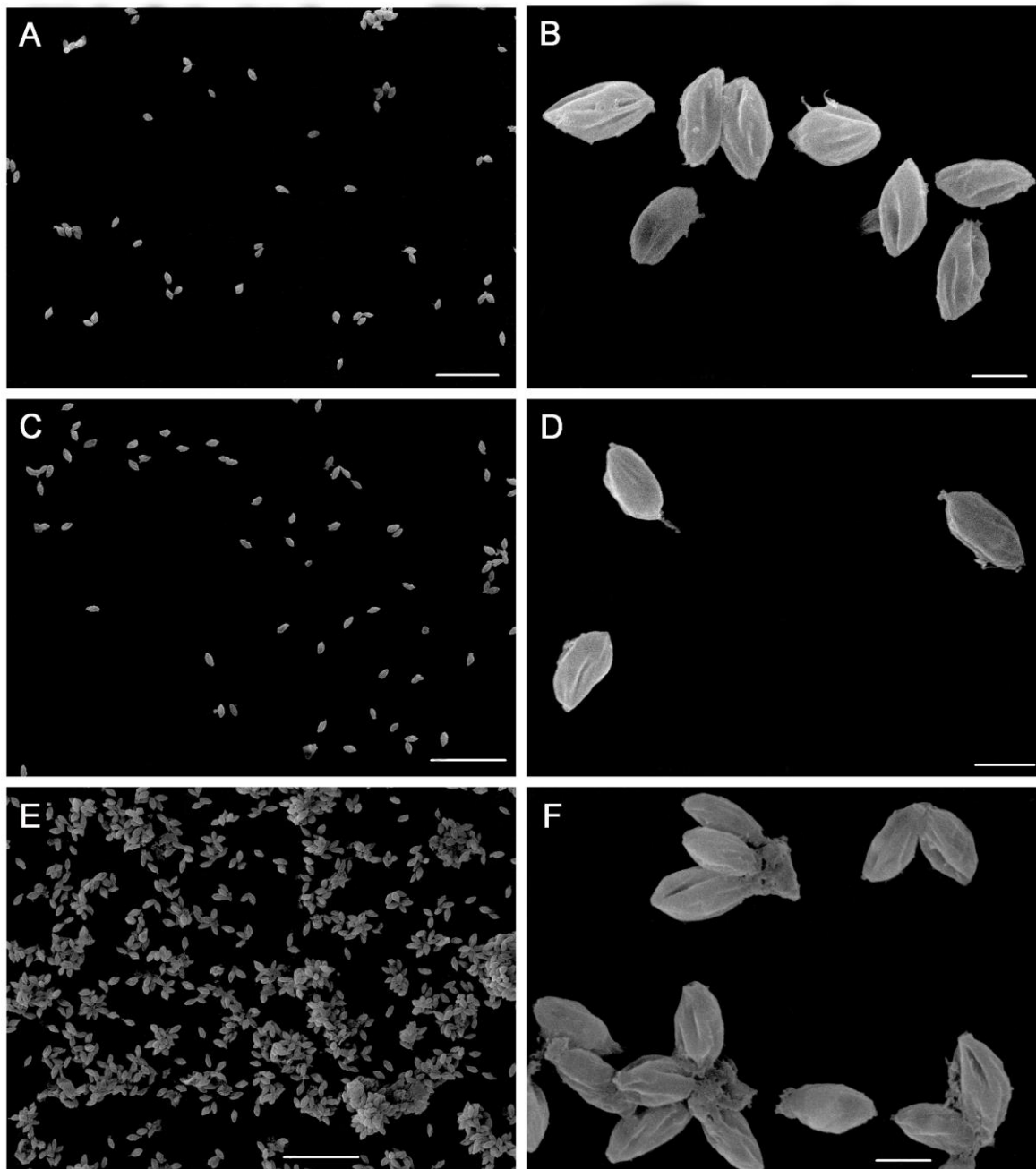


Figura 12. (A-F): Imagem por microscopia eletrônica de varredura de amastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com as combinações testadas, incubadas por 24 h, fixadas com 2,5 % de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato e processadas para MEV. A e B: Amastigotas não tratadas (controle); C e D: Amastigotas tratadas com a combinação de NPD008 + pentamidina; E e F: Amastigotas tratadas com a combinação de NPD008 + miltefosina. Barra: A, C e E: 20 μ M; B, D e F: 2 μ M.

Já nas amastigotas tratadas com ambas as combinações e incubadas por 48 h observamos um maior número de parasitos agrupados (cachos de uva) em relação ao controle não tratado, com alta frequência na quantidade de 2 ou mais parasitos unidos, o que pode indicar alterações no processo de citocinese (Figura 13). Este evento pode ser também observado em tempos mais iniciais de incubação com miltefosina + NPD008, no tempo de 24 horas (Figura 12).

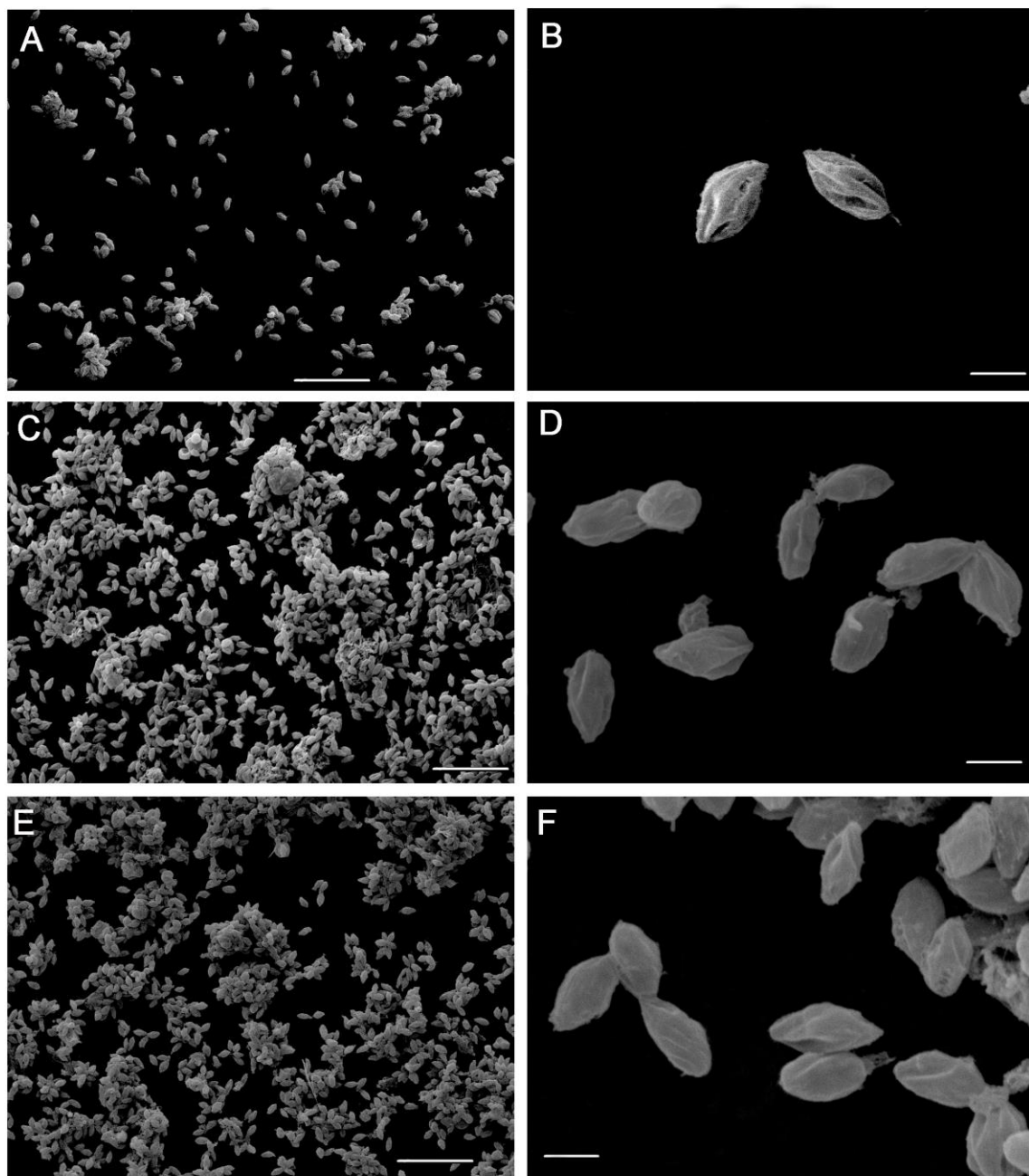


Figura 13. (A-F): Imagem por microscopia eletrônica de varredura de amastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com as combinações testadas, incubadas por 48 h, fixadas com 2,5 % de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato e processadas para MEV. A e B: Amastigotas não tratadas (controle); C e D: Amastigotas tratadas com a combinação de NPD008 + pentamidina; E e F: Amastigotas tratadas com a combinação de NPD008 + miltefosina. Barra: A, C e E: 20 μ M; B, D e F: 2 μ M.

5 DISCUSSÃO

Leishmanioses são um grande problema de saúde pública, já que acometem um grande número de pessoas no mundo todo, principalmente de países pobres e sem condições de custear o tratamento, que em geral, não é eficiente, requer longos períodos de administração, e induz diversos e sérios efeitos colaterais além de casos de resistência a terapia. Isso gera uma alta taxa de morbidade e mortalidade, principalmente pela forma visceral, que é fatal se não tratada. Além disso, devido a ocorrência de deformidade, principalmente na região facial, há um envolvimento psicológico com geração de estigmas. A leishmaniose tegumentar (LT), por exemplo, é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela sua elevada incidência e capacidade de produzir deformidades (SVS/MS, 2017). Por esse motivo, a procura por novos tratamentos que sejam seguros, não-invasivos, de curta duração, eficazes e acessíveis é tão importante. Para selecionar os melhores compostos que possam representar os futuros candidatos a novos fármacos para tratamento das leishmanioses, deve-se atentar aos critérios fenotípicos, de “drogabilidade” e farmacológicos sugeridos pela literatura corrente advindos da experiência na área de quimioterapia experimental por parte de instituições de pesquisa e desenvolvimento tecnológico de instituições públicas e privadas, assim como das indústrias farmacêuticas, definidos por “hit” e “lead” (Tabela 2). Os candidatos a novos fármacos para leishmanioses devem ter assim várias características incluindo potência de cerca de 10 μM sobre amastigotas intracelulares e seletividade de 20. Outros aspectos importantes que vêm sendo incentivados, como abordagens para terapias de diversas doenças, incluindo de origem infecciosa, incluem o reposicionamento de medicamentos e a utilização de combinação de fármacos. O reposicionamento permite reduzir custos e tempo nas fases pré-clínicas e clínicas haja visto que as etapas de desenvolvimento (ex. síntese, formulação e testes de segurança) já foram anteriormente conduzidos. Já a abordagem de combinação entre diferentes agentes farmacológicos permite redução da concentração, fazendo assim a diminuição da toxicidade e reações adversas, aumentando a adesão ao tratamento pelo paciente, além da diminuição da possibilidade de resistência aos medicamentos por atuarem sobre distintos alvos celulares.

Neste trabalho, foram testados compostos de 03 classes diferentes: ftalazinonas e imidazóis (inibidores de fosfodiesterases - PDEs), quinolinas e imidazóis (inibidores de CYP51) para verificar a atividade destes em esquemas de monoterapia e em combinação com fármacos de referência já utilizados no tratamento das leishmanioses: pentamidina e miltefosina. Nossos estudos foram conduzidos ainda sobre dois diferentes modelos fenotípicos: diretamente sobre amastigotas livres purificadas de leões cutâneas de camundongos infectados, além das formas intracelulares de *Leishmania amazonensis* presentes em culturas de macrófagos peritoneais infectadas. Verificamos ainda a toxicidade destes compostos, sozinhos e em combinação, sobre as culturas não infectadas das células hospedeiras (macrófagos peritoneais).

Entre os compostos testados na presente dissertação, os inibidores de PDEs foram os mais ativos, corroborando dados da literatura que os identificam como potenciais candidatos a fármacos para doenças causadas por tripanossomatídeos (Blaazer et al., 2018; Veerman et al., 2016), sobretudo quando testamos sobre a infecção de macrófagos peritoneais com *L. amazonensis*, segundo o critério fenotípico de "hit", com valores de EC₅₀ na faixa de 10 µM. Neste sentido, os mais ativos seguiram para testes de combinação com fármacos de referência para terapia das leishmanioses, visando contribuir para geração de novos conhecimentos e desenvolvimento futuro de novas abordagens terapêuticas para esta grave enfermidade. De fato, dos 12 inibidores de PDE testados sobre amastigotas livres, somente 04 não foram ativos. Dos mais potentes, 05 exibiram valores de EC₅₀ de 10,15 até 14,7 µM, sendo selecionados para a realização das combinações com pentamidina e miltefosina. Embora o EC₅₀ dos inibidores de PDE tenha sido maior do que o EC₅₀ da Mt ($4 \pm 0,41$) e da Pt ($1,5 \pm 0,3$) sobre amastigotas livres de *Leishmania amazonensis*, nossos dados de ensaios de combinação apontaram aditividade quando os associamos a Pt e Mt. Já com relação a atividade sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigota de *L. amazonensis*, destacamos as NPD008 e NPD3126, que alcançaram valores de EC₅₀ inferior ou semelhante a miltefosina, apesar de ambos serem menos ativos que a pentamidina. Porém, um aspecto positivo foi que ambos também foram menos tóxicos para células de mamíferos em comparação a este último fármaco.

Frente à similaridade entre PDEs humanas e de tripanossomatídeos, a busca pelo possível reposicionamento tem sido feita a partir de quimiotecas desenhadas como inibidores para PDEs humanas. Assim, identificou-se o inibidor NPD001

(denominado inicialmente de composto A), que é um potente inibidor de PDE4 humana, mas que revelou-se ativo sobre *T. brucei*, assim como foi capaz de inibir PDEB1 ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$) e PDEB2 ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$) deste parasito, inibindo a proliferação das formas sanguíneas e tendo EC_{50} na faixa nanomolar ($0,08 \text{ }\mu\text{M}$) (Veerman et al., 2016). Houve um aumento da concentração de AMPc nos parasitos tratados, demonstrando que o NPD001 atua pela inibição da atividade de PDEs (De Koning et al., 2012). Na presente dissertação, a ftalazinona NPD001 foi uma das mais ativas sobre amastigotas livres ($EC_{50} = 13 \pm 1,84 \text{ }\mu\text{M}$) e intracelulares ($EC_{50} = 10,43 \pm 2,4 \text{ }\mu\text{M}$) de *L. amazonensis*. Além dela, a NPD008, que exerceu ação leishmanicida também já havia sido caracterizada como um inibidor seletivo de TbrPDEB1 (Blaazer et al., 2018). A inibição do metabolismo de AMPc causa importantes impactos celulares e alguns dos descritos em tripanossomatídeos (*T. brucei*) inclui alterações no ciclo celular (Blaazer et al., 2018). Foi descrito que formas sanguíneas incubadas com inibidores de PDE ($10 \text{ }\mu\text{M}$ por 6 h) resultou na inibição da citocinese, resultando na observação de um grande número de parasitos com flagelos duplicados sem, contudo, finalizar o processo de divisão binária. A incubação por longos períodos (12 h) resultou numa maior frequência de parasitos arredondados com múltiplos flagelos e, após 24 h, apenas alguns mantinham motilidade e refringência, mas todos severamente disformes (Blaazer et al., 2018). A atividade tripanocida da NPD008 sobre *T. brucei* foi relatada com valor de $EC_{50} = 5,5 \pm 3,3 \text{ }\mu\text{M}$ (Blaazer et al., 2018). No nosso estudo, também observamos por microscopia eletrônica de varredura que, após 48 h de incubação de pentamidina e nos tempos de 24 e 48 h de combinação com miltefosina, muitos parasitos apresentavam-se duplicados mas ainda conectados, formando grandes grupos parasitários, sugestivo de alteração no processo de divisão celular. NPD008 também foi um dos compostos mais ativos sobre amastigotas livres ($EC_{50} = 10,8 \pm 1,5 \text{ }\mu\text{M}$) e intracelulares ($EC_{50} = 2,38 \pm 1,7 \text{ }\mu\text{M}$) de *L. amazonensis*, sendo neste último caso mais ativo que sobre *T. brucei* e, portanto, promissora para futura prospecção como candidato leishmanicida.

Comparando os resultados de atividade em amastigotas livres e intracelulares, observamos que em alguns dos compostos testados, a ação antiparasitária foi superior sobre as formas presentes no fagossoma das células hospedeiras. Diferenças na potência de compostos naturais e sintéticos tem sido relatadas por outros grupos como, por exemplo, quanto a atividade do posaconazol e do itraconazol sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (Macedo-Silva et al., 2013). Neste estudo, após 48 h de incubação,

posaconazol obteve $EC_{50} = 3,94 \mu\text{M}$ (promastigotas) e $1,95 \mu\text{M}$ (amastigotas intracelulares) e o itraconazol obteve $EC_{50} = 0,88 \mu\text{M}$ (promastigotas) e $0,64 \mu\text{M}$ (amastigotas intracelulares). Já para 72 h de incubação, posaconazol obteve $EC_{50} = 2,74 \mu\text{M}$ (promastigotas) e $1,63 \mu\text{M}$ (amastigotas intracelulares) e itraconazol obteve $EC_{50} = 0,44 \mu\text{M}$ (promastigotas) e $0,08 \mu\text{M}$ (amastigotas intracelulares) (Macedo-Silva et al., 2013). Em outro trabalho, pode-se observar que até os medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses tiveram esse perfil de diferença na atividade sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. major*, além do composto testado (luliconazol) (Shokri et al., 2018). Observaram que sobre promastigotas: $EC_{50} = 0,19 \mu\text{M}$ (luliconazol), $538 \mu\text{M}$ (antimoniato de meglumina), $135 \mu\text{M}$ (ketoconazol) e $2,52 \mu\text{M}$ (anfotericina B). Sobre amastigotas intracelulares, observou-se $EC_{50} = 0,07 \mu\text{M}$ (luliconazol), $90,44 \mu\text{M}$ (antimoniato de meglumina), $24,04 \mu\text{M}$ (ketoconazol) e $0,74 \mu\text{M}$ (anfotericina B) (Shokri et al., 2018). A superior atividade sobre amastigotas intracelulares em relação ao nosso modelo *ex vivo* pelo uso de amastigotas isoladas de lesão de animais infectados, pode ser devido a diversos fatores, e algumas possibilidades podem ser levantadas como: uma facilitação da entrada do composto pela membrana plasmática e membrana do vacúolo parasitóforo do macrófago, resultando em elevadas concentrações e acúmulo dos compostos em contato com os parasitos intracelulares, e/ou potencialização da capacidade microbicida de macrófagos pela elevação de mediadores com ação leishmanicida como, por exemplo, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. De fato, dados do nosso grupo sobre ação de compostos amidínicos aromáticos revelou que um mesmo composto (DB569), na concentração de $2 \mu\text{M}$, foi capaz de reduzir em cerca de 78 % a infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*, enquanto que somente cerca de 30 % de redução da carga parasitaria foi observado quando utilizamos como célula hospedeira cultivos primários de células cardíacas (De Souza et al., 2004). Estes dados sugerem que a ação dos compostos sobre as células hospedeiras deva ser considerado nas etapas de descoberta e desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, além do efeito sobre o patógeno.

Assim, sugerimos que o uso de amastigotas obtidas de lesão seja um filtro inicial nas etapas de descoberta de novos agentes leishmanicidas, por facilitar a dinâmica de estudos de quimioterapia experimental por permitir o uso de marcadores de viabilidade celular, como a resazurina, mas que à semelhança dos estudos conduzidos com promastigotas por outros grupos, a seguir os dados sejam

validados utilizando modelo de amastigotas intracelulares em macrófagos, por ter maior semelhança à infecção *in vivo*. Assim, o modelo de amastigotas livres pode ser útil para que possamos selecionar compostos ativos e inativos a partir de uma quantidade grande de amostras a serem avaliadas. Isso faz com que sejam reduzidos o número de animais utilizados e quantidade de material e compostos, reduzindo tempo e custo.

A ação de moléculas aromáticas incluindo análogos e derivados da pentamidina, como as arilimidamidas (AIAs), tem sido muito estudado por nosso grupo (Soeiro et al., 2013). As amidinas clássicas, como a pentamidina, reconhecem e se associam a sequências ricas em bases A e T do DNA (em especial do kDNA ricos nesta sequência). As AIAs representam promissores agentes microbicidas sobre modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* por diferentes parasitos intracelulares, incluindo espécies de *Leishmania* em modelos de infecção de hamster e camundongos (Zhu et al., 2016; Soeiro et al., 2013). Além delas, temos avaliados pela via de reposicionamento, a atividade de moléculas quinolínicas. Dados da literatura mostram, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, a atividade de derivados quinolínicos sobre *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (Di Pietro et al., 2015). De fato, moléculas quinolínicas, como a cloroquina, são utilizados ainda hoje na terapia de infecções parasitárias como malária (por 07 décadas), e alguns destes derivados têm sido testados contra diferentes espécies de *Leishmania*, revelando ação leishmanicida sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, propondo que o mecanismo de ação possa estar relacionado a estresse oxidativo (Coimbra et al., 2016). Os autores observaram ainda que um destes compostos testados foi 139 vezes mais ativo que a miltefosina, inibindo a proliferação de amastigotas de *L. amazonensis* (Coimbra et al., 2016). Outro grupo de pesquisadores testou a atividade antileishmanial *in vitro* sobre promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania mexicana* de alguns compostos sintéticos derivados de quinolina. Todos os 07 compostos testados tiveram $EC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ sobre as promastigotas. Com relação às amastigotas intracelulares, a carga parasitária de macrófagos infectados foi reduzida em quase 50 % após o tratamento por 48 h com um dos derivados (composto 1) (Hernández-Chinea et al., 2015).

Nosso presente estudo não revelou atividade leishmanicida promissora das quinolinas testadas, apesar de terem sido ativas sobre modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção por *T. cruzi* e *T. brucei* (Nefertiti et al., 2018). Sobre as formas sanguíneas

de *T. cruzi* (cepa Y), todas as quinolinas testadas foram mais ativas que o medicamento de referência (o benznidazol - Bz), exceto a DB2171 e DB2192. As quinolinas DB2187, DB2131, DB2186, DB2191 e DB2217 apresentaram $EC_{50} < 3 \mu M$ sobre *T. cruzi*. Nove das 10 quinolinas foram mais efetivas que Bz sobre formas amastigotas de *T. cruzi* e todas mais potentes *in vitro* sobre *T. brucei*. Testes *in vivo*, revelaram que DB2186 se sobressaiu das demais quinolinas testadas, exibindo 70 % de redução da parasitemia sobre modelos de infecção aguda por *T. cruzi* e obteve cura em 2 de 4 camundongos infectados com *T. brucei*. Resultados ainda mais promissores foram obtidos com a quinolina DB2217, que alcançou 100 % de cura *in vivo* em camundongos infectados com *T. brucei* (Nefertiti et al., 2018).

Porém, no presente trabalho, nenhum dos 4 compostos quinolínicos testados (DB2131, DB2186, DB2191 e DB2217) foi ativo em concentrações de até $50 \mu M$ ($EC_{50} > 50 \mu M$) sobre amastigotas de *L. amazonensis* livres obtidas de lesões na pata de camundongos. Outros grupos também observaram atividade de derivados de quinolinas com $EC_{50} > 50 \mu M$ sobre *Leishmania amazonensis*. Em um desses trabalhos, os autores testaram a atividade de 10 derivados quinolínicos sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Dentre esses, somente dois (os compostos 2a e 2j) tiveram atividade sobre as promastigotas (EC_{50} de 52,5 e 21,1 μM , respectivamente), os demais não tiveram atividade em concentrações de até $100 \mu M$. Sobre amastigotas, só tiveram atividade os compostos 2a e 2c (EC_{50} de 8,1 e 15,6 μM , respectivamente), os demais não tiveram atividade em concentrações de até $100 \mu M$ (Antinarelli et al., 2016).

Outras promissoras moléculas são os inibidores de biossíntese de lipídeos, como os inibidores da enzima 14α -demetilase (CYP51) (Lepesheva & Waterman, 2011). A semelhança de fungos, em tripanossomatídeos a rota sintética de esteróis resulta na produção de ergosterol, diferentemente de mamíferos, cujo produto é o colesterol (Mccall et al., 2015). Apesar de terem semelhanças, fungos e tripanossomatídeos possuem diferenças metabólicas (e variabilidade), que fazem com que os medicamentos utilizados no tratamento contra fungos (principalmente azóis) tenham requisitos para serem selecionados para o reposicionamento do tratamento contra protozoários (Friggeri et al., 2018). Assim, inibidores de metabolismo lipídico, como o inibidor da CYP51, o VFV, mostraram-se ativos sobre diferentes espécies de *Leishmania*, sendo capazes de reduzir de modo significativo a carga parasitária sobre modelos de leishmaniose visceral (Lepesheva et al., 2015, Mccall et al., 2015). Apesar de VNI e VFV serem dois potentes inibidores

experimentais de CYP51 de tripanossomatídeos e efetivos *in vivo* contra modelos experimentais de doença de Chagas, leishmaniose visceral e doença do sono, VNI é menos potente contra *Leishmania* e cepas do *Trypanosoma cruzi* resistentes a medicamentos, mas VFV é metabolicamente menos estável (Friggeri et al., 2018). VFV foi sintetizado a partir do VNI para ampliar o espectro e atividade antiprotozoária, já que o encaixe deste não era perfeito na CYP51 de protozoários (VNI foi sintetizado para fungos e identificado a partir de uma quimioteca da Novartis pela nossa colaboradora, Dr^a Galina Lepesheva, Vanderbilt University/USA). No VFV, o anel fenil adicional preencheu mais completamente a cavidade do sítio ativo do CYP51, aumentando ainda mais a força da interação (Friggeri et al., 2018).

No presente trabalho, o inibidor de biossíntese de ergosterol VFV não foi ativo em concentrações de até 50 μM ($\text{EC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) sobre amastigotas de *L. amazonensis* obtidas de lesões na pata de camundongos. Já o composto VNI teve atividade leishmanicida moderada ($\text{EC}_{50} = 29,4 \pm 2,9$), porém foi menos efetivo que Mt e Pt.

Nosso grupo já havia utilizado esses dois compostos anteriormente em modelos de infecção experimental por *T. cruzi*. O VNI induziu uma redução de 86 % no número de tripomastigotas sanguíneos nos camundongos machos, enquanto na infecção de fêmeas, a supressão da parasitemia alcançou mais de 99,8 % (Guedes-da-Silva et al., 2015). Em outro trabalho do nosso grupo foi feita uma investigação comparativa dos dois compostos, VNI e VFV, utilizando mais uma vez modelo *in vivo* de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento com VNI com início na positivação da parasitemia (5^o dpi) resultou em redução de 91 % na parasitemia de camundongos machos e uma redução de 99 % em fêmeas. Já o efeito supressor do VFV foi de $\pm 99,8$ % em ambos os sexos, com o início do tratamento no 5^o dpi, atingindo 100 % de supressão parasitária quando o tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção, ou seja, em modelos de profilaxia e não de terapêutica, demonstrando a importância de se utilizar modelos mais preditivos no curso dos estudos de quimioterapia experimental (Guedes-da-Silva et al., 2017).

O tratamento com VFV e VNI por 10 ou 20 dias consecutivos iniciado 1 semana após a infecção de camundongos com amastigotas de *L. donovani* (separadamente) em infectados, revelou que administração por 20 dias com VNI e VFV resultou em 60 % (VNI) e 89 % (VFV) de redução da parasitemia, e 100 % de sobrevivência dos animais, e nenhum efeito colateral. Diferente do observado por nós, na presente dissertação, este estudo ainda mostra a atividade de VNI e VFV sobre

amastigotas de *L. donovani* axênicas ($EC_{50} = 2.29 \pm 0.40$ e 6.32 ± 0.91 , respectivamente) e intracelulares em macrófagos ($EC_{50} = 6.68 \pm 0.97$ e 0.42 ± 0.02 , respectivamente) (Lepesheva et al., 2015). Esta diferença em especial do VFV pode ser relacionada a espécie do parasita, pois somente trabalhamos com *L. amazonensis*, enquanto que o outro grupo o fez com modelo de infecção por *L. donovani*. Outra verificação importante no trabalho de Lepesheva e colaboradores foi a observação dos efeitos de VNI/VFV nos esteróis do parasito e os resultados mostraram que, ao contrário de fungos ou *T. cruzi*, onde a inibição da CYP51 para a via no estágio de lanosterol/eburicol, em *Leishmania* esses esteróis C4-dimetilados não se acumulam. Em vez disso, eles sofrem conversões adicionais, levando ao aparecimento de outros intermediários. Não se sabe se esses intermediários são capazes de produzir ergosterol, mas a ramificação da via biossintética do esterol pode ser a causa do efeito mais fraco (mais lento) dos inibidores do CYP51 em *Leishmania* (Lepesheva et al., 2015).

Apesar dos exemplos de sucesso da ação leishmanicida com compostos VNI e VFV sobre *L. donovani*, a literatura relata que a atividade de compostos azólicos pode ainda depender, além da genética do parasito (espécie de *Leishmania*), da genética do hospedeiro e do tipo de infecção. Um dos exemplos se deve a um estudo com pacientes adultos com lesões cutâneas de leishmaniose e que, após isolamento, detectou-se *L. guyanensis*. Os pacientes foram tratados com uma dose oral de 400 mg/dia de cetoconazol por 30 dias. O acompanhamento clínico durante o tratamento mostrou que as lesões permaneceram sem alteração em cinco pacientes, tiveram piora em seis, melhoraram em apenas um caso e três pacientes desenvolveram novas lesões. Ao final do tratamento, não foi observada cura clínica e oito pacientes ainda tinham lesões com parasitos (esfregaços positivos). Um mês após o término do tratamento, um único paciente foi clinicamente curado e em um segundo paciente a primeira lesão foi curada, mas na segunda ainda havia parasitos. Um terceiro paciente foi curado no segundo mês após o final do tratamento (Dedet et al., 1986). Em outro trabalho, os autores fizeram a comparação do uso de cetoconazol e bis-triazol D0870 em promastigotas de *L. braziliensis* e *L. mexicana*, onde a primeira foi naturalmente resistente (redução de parasito somente a 10 μ M) e a segunda susceptível aos fármacos. Também foi testado a terbinafina, um inibidor da esqualeno epoxidase, da qual foi visto o resultado inverso ao anterior. Porém, somente quando *L. braziliensis* foi cultivada na presença de terbinafina, o parasito tornou-se altamente suscetível aos azóis (Rangel et al., 1996),

demonstrando também o quanto a terapia combinada é um importante alvo de estudos.

Estudos recentes revelaram o potencial sinérgico de associação entre inibidores de CYP51 (como posaconazol) e bis-AIAs, como a DB766, sobre amastigotas axênicas e intracelulares de *L. donovani*, sugerindo que a combinação entre moléculas com diferentes alvos possa representar promissores esquemas antiparasitários (Pandharkar et al., 2014).

Na presente dissertação também avaliamos esta abordagem de quimioterapia experimental de combinação de agentes antiparasitários. Apesar de não termos visto este mesmo potencial sinérgico nas combinações testadas no presente trabalho das NPD e Mt e Pt, observamos efeito aditivo, que representa a soma da atividade primeiro composto + a atividade do segundo composto, o que também pode trazer os mesmos benefícios reduzindo possibilidade de resistência a fármacos, custos, doses e perfil de toxicidade.

Além disso, na combinação sobre amastigota intracelular, observamos que NPD008 + pentamidina, respectivamente nas proporções de 80 % + 20 %, (concentrações de 15,23 μM de NPD008 + 0,56 μM de Pt e concentrações de 7,61 μM de NPD008 + 0,28 μM de Pt), proporção de 60 % + 40 % (concentração de 11,42 μM de NPD008 + 1,12 μM de Pt) e na proporção de 40 % + 60 % (concentração de 7,62 μM de NPD008 + 1,68 μM de Pt) houve 100 % de redução do índice de infecção, o que representa um dado bastante promissor. Já na proporção de 60 % de NPD008 e 40 % de pentamidina, a concentração de 5,71 μM de NPD008 + 0,56 μM de Pt também alcançou 98 % de redução no índice de infecção e na proporção de 20 % de NPD008 e 80 % de Pt, a concentração de 3,81 μM de NPD008 + 2,24 μM de Pt teve 94 % de redução do índice de infecção, sendo estas as concentrações mais ativas desta combinação. Em todas estas concentrações que obtivemos supressão da carga parasitária *in vitro* nos esquemas de combinação não foi visto toxicidade sobre macrófagos peritoneais, sendo então estas combinações candidatas a futuros ensaios *in vivo*, considerando estas proporções. De fato, sobre amastigotas intracelulares alcançamos maiores níveis de seletividade quando comparamos com as análises sobre amastigotas livres. Com os parasitos intracelulares, a NPD008 alcançou seletividade de cerca de 17, o que representa um dos critérios satisfatórios para mover compostos de estudos *in vitro* para modelos animais.

Outras proporções também tiveram alto percentual de redução no número de parasitos nos ensaios em combinação sobre amastigotas livres, não sendo visto também, nestas concentrações e proporções, sinais de toxicidade sobre macrófagos peritoneais. Assim sendo: na combinação entre NPD001 e miltefosina, a proporção de 60 % de NPD001 e 40 % de Mt (concentração de 56,16 μM de NPD001 + 12,8 μM de Mt) observamos 89 % de redução do número de parasitos, na proporção de 40 % de NPD001 e 60 % de Mt (concentração de 37,44 μM de NPD001 + 19,2 μM de Mt) obtivemos 88 % de redução e na proporção de 20 % de NPD001 e 80 % de Mt (concentração de 18,72 μM de NPD001 + 25,6 μM de Mt), 90 % de redução. Na combinação entre NPD3126 e miltefosina, a proporção de 80 % de NPD3126 e 20 % de Mt (concentração de 16,24 μM de NPD3126 + 1,6 μM de Mt) observamos 85 % de redução e na proporção de 20 % de NPD3126 e 80 % de Mt (concentrações de 16,24 μM de NPD3126 + 25,6 μM de Mt), índices de 93 % de redução, e com 8,12 μM de NPD3126 + 12,8 μM de Mt, 87 % de redução. Quando avaliamos a combinação entre NPD3126 e pentamidina, a proporção de 80 % de NPD3126 e 20 % de Mt (concentração de 32,48 μM de NPD3126 + 0,8 μM de Pt), alcançamos 92 % de redução da infecção, na proporção de 60 % de NPD3126 e 40 % de Pt (concentração de 24,36 μM de NPD3126 + 1,6 μM de Pt), índices de 92 % de redução e na proporção de 40 % de NPD3126 e 60 % de Pt (concentração de 16,24 μM de NPD3126 + 2,4 μM de Pt), redução de 92 %. Apesar destes resultados otimistas, será interessante realizar ensaios com essas combinações sobre amastigotas intracelulares para confirmar estes resultados e validá-los para futuros ensaios com animais experimentalmente infectados com *L. amazonensis*.

6 CONCLUSÕES

- O uso de AlamarBlue com leitura em espectrofotômetro foi padronizado, mostrando-se reprodutível como método para verificação da atividade leishmanicida de novos compostos sobre amastigotas de *Leishmania amazonensis* isoladas de lesão. Esta metodologia reproduziu dados obtidos, com protocolos de rotina, através da quantificação ao microscópio de luz. Assim, uso de amastigotas livres avaliadas por AlamarBlue viabiliza a análise, em grande escala, de quimioterapia experimental para leishmaniose, em esquemas de mono e de terapia combinada, otimizando recursos e tempo para processamento e análise das amostras;
- Os estudos sobre amastigotas livres de *L. amazonensis* revelaram que as ftalazinonas e o imidazol NPD3126 (inibidores de PDE) exibiram ação leishmanicida superior que as quinolinas e os imidazóis (inibidores da biossíntese de ergosterol), exibindo ainda seletividade promissora (17), porém foram menos potentes que os fármacos de referência;
- Sobre o perfil de toxicidade, os compostos testados tiveram valores de LC₅₀ superiores a pentamidina, sendo, portanto, menos tóxicos que esta, porém, os inibidores de PDEs foram mais citotóxicos do que a miltefosina e tiveram o IS menor que os dois fármacos de referência (miltefosina e pentamidina);
- Nas formas amastigotas livres, as combinações entre inibidores de PDE e fármacos de referência resultaram em valores de χ^2 FICI entre 0,5 - 4 (natureza de perfil “sem interação” ou “aditividade”);
- As imagens da microscopia eletrônica de varredura indicam uma maior frequência de dois ou mais amastigotas unidas entre si o que sugere alterações nas etapas de citocinese tanto na combinação de NPD008 com pentamidina quanto de NPD008 com miltefosina;
- Com relação aos compostos em combinação, foi observado que houve alta toxicidade nas proporções de 80 % do composto teste e 20 % do fármaco de referência e 60 % do composto teste e 40 % do fármaco de referência, como também em todas as proporções nas maiores concentrações da combinação de NPD008 e pentamidina. A combinação de NPD3115 e miltefosina não houve perda de viabilidade celular, fato talvez observado provavelmente devido à baixa solubilidade do imidazol inibidor de PDE;

- Nos ensaios de monoterapia com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* os compostos NPD008, NPD3126 e a pentamidina exibiram maior atividade leishmanicida sobre as formas intracelulares em comparação às formas de amastigotas livres, sendo ainda o NPD008 mais ativo do que a miltefosina sobre a forma intracelular; demonstrando a relevância de se avaliar a ação de novos agentes sobre o modelo de infecção dos fagócitos com os parasitos, que apresentam maior similaridade aos processos *in vivo*;
- A combinação entre NPD008 e pentamidina também mostrou valores de χ^2_{FICI} entre 0,5 – 4 (1.39), tendo perfil aditivo ou “sem interação”, sobre amastigotas intracelulares em macrófagos; porém alcançando em algumas proporções a erradicação do parasitismo das culturas celulares, estimulando a continuidade em estudos de combinação *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, et al. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. História Ciências Saúde, Mangueiras;10(3):852–882, 2003.

Antinarelli LM, Souza IDO, Glanzmann N, et al. Aminoquinoline compounds: effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. Exp Parasitol;171:10–16, 2016.

Arevalo I, Ward B, Miller R. et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. Clin Infect Dis;33:1847–51, 2001.

Asilian A, Sadeghinia A, Faghihi G, et al. Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. International journal of dermatology. 43(4):281–3, 2004.

Audisio D, Messaoudi S, Cojean S, et al. Synthesis and antikinoplastid activities of 3-substituted quinolinones derivatives. Eur J Med Chem; 52:44–50, 2012.

Batista DG, Batista MM, Oliveira GM, et al. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. Antimicrob Agents Chemother. 54:2940-2, 2010.

Beavo, JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol.Rev. 75, 725–748, 1995.

Bhattacharya A, Biswas A, Das PK. Role of a differentially expressed cAMP phosphodiesterase in regulating the induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. Free Radical Biology & Medicine. 47: 1494-1506, 2009.

Biswas A, Bhattacharya A, Das PK. Role of cAMP Signaling in the survival and infectivity of the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. Molecular Biology International. 2011, 2011.

Blaazer AR, Singh AK, Edink E et al. Targeting a subpocket in *Trypanosoma brucei* B1 assists structure-based drug Discovery for African sleeping sickness. J. Med. Chem.; 6, 3870–3888, 2017.

Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. British Journal of Pharmacology. 147: S252–S257, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention, Life cycle. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 11/01/2019.

Centers for Disease Control and Prevention, Resources for Health Professionals. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html>. Acesso em: 19/01/2019.

Chanquia SN, Larregui F, Puente V, et al. Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. Bioorganic Chemistry; 83:526–534, 2019.

Coimbra ES, Antinarelli LM, Silva NP, et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. Chemico-Biological Interactions: 260:50-57, 2016.

Da Silva CF, Batista DDGJ, de Araújo JS, et al. Phenotypic evaluation and in silico ADMET properties of novel arylimidamides in acute mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection. Drug Des Devel Ther.;11:1095-1105, 2017.

De Araújo JS, Da Silva CF, Batista DG, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 58(7):4191-5, 2014.

De Araújo JS, Garcia-Rubia A, Sebastian-Perez V, et al. Imidazole derivatives as promising agents for the treatment of Chagas disease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy Jan AAC.02156-18, 2019.

De Araújo, JS. Ensaio biológicos *in vitro* e *in vivo* de novos compostos sintéticos sobre infecção por *Trypanosoma cruzi*. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

De Koning HP, Gould MK, Sterk GJ et al. Pharmacological Validation of *Trypanosoma brucei* Phosphodiesterases as novel drug targets. The Journal of Infectious Diseases: 206(2):229-37, 2012.

De Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, et al. *In Vitro* Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. PLoS ONE 8(12): e83247, 2013.

De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, et al. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Biochemical Pharmacology 15, 593-600, 2004.

De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, et al. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Biochem Pharmacol. 68(4):593-600, 2004.

Dedet JP, Jamet P, Esterre P et al. Failure to cure *Leishmania braziliensis* guyanensis cutaneous leishmaniasis with oral ketoconazol. Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene 80, 176, 1986.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis; 27: 305-318, 2004.

Di Pietro O, Vicente-García E, Taylor MC, et al. Multicomponent reaction-based synthesis and biological evaluation of tricyclic heterofused quinolones with multi-trypanosomatid activity. Eur J Med Chem: 105:120-37, 2015.

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 141(1):140-6, 2014.

Drugs for Neglected Diseases *initiative*, Clinical Trials. Disponível em: <<https://www.dndi.org/2009/clinical-trials/clinical-trial-protocol-malaria/>>. Acesso em: 11/01/2019.

Drugs for Neglected Diseases *initiative*, Clinical Trials. Disponível em: <<https://www.dndi.org/2016/clinical-trials/clinical-trials-leish/>>. Acesso em: 11/01/2019.

Drugs for Neglected Diseases *initiative*, Current Treatment. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/hat/hat-current-treatments/>>. Acesso em: 19/01/2019.

Duarte MC, Lage LMR, Lage DP et al. An effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. Veterinary Parasitology 217: 81–88, 2016.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhust DC et al. 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: 48(11):4097-4102, 2004.

Friggeri L, Hargrove TY, Rachakonda G et al. Sterol 14 α -Demethylase Structure-Based Optimization of Drug Candidates for Human Infections with the Protozoan Trypanosomatidae. *J. Med. Chemical* 61, 10910–10921, 2018.

Friggeri L, Hargrove TY, Wawrzak Z et al. Sterol 14 α -Demethylase Structure-Based Design of VNI ((R)-N-(1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl)-4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamide)) Derivatives To Target Fungal Infections: Synthesis, Biological Evaluation, and Crystallographic Analysis. *J. Med. Chemical* 61, 5679–5691, 2018.

Gancedo JM. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.* 88: 645–668, 2013.

Garcia HH, Gonzales I, Lescano AG, et al. Efficacy of combined antiparasitic therapy with praziquantel and albendazole for neurocysticercosis: a double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Disease*: 14(8): 687-95, 2014.

Godinho JL, Simas-Rodrigues C, Silva R, et al. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. *International Journal of Antimicrobial Agents*: 39(4):326-31, 2012.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, da Silva CF, et al. Antitrypanosomal activity of sterol 14 α - demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrob Agents Chemother* 61(4). pii: e02098-16, 2017.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, da Silva CF, et al. Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 59(12):7564-70, 2015.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 169(1):59-72, 1989.

Hernández-Chinea C, Carbajo E, Sojo F et al. *In vitro* activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on *Leishmania mexicana*. *Parasitology International* 64: 479–483, 2015.

Jha TK, Olliaro P, Thakur CP et al. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ.* Apr 18;316(7139):1200-5, 1998.

Jha TK. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. *Indian J Med Res.* 123(3):389-98, 2006.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*;22:439-45, 2006.

Kato KC, Morais-Teixeira E, Reis PG, et al. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. *Antimicrob Agents Chemother*;58(1):481-8, 2014.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*: 14(11):751-8, 2015.

Kaufer A, Ellis J, Stark D & Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors* 10:287, 2017.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections A practical review. *Dermatol Clin*: 33(3):579-93, 2015.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal Society of London B.* 199, 309-320, 1977.

Laura C, Celina E, Sergio SB, et al. Combined flubendazole-nitazoxanide treatment of cystic echinococcosis: Pharmacokinetic and efficacy assessment in mice. *Acta Tropica*: 148: 89-96, 2015.

Lepesheva GI, Hargrove TY, Rachakonda G, et al. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Disease*: 212(9):1439-48, 2015.

Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*: 11(16): 2060-71, 2011.

Long T, Rojo-Arreola L, Shi D et al. Phenotypic, chemical and functional characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 (PDE4) as a potential anthelmintic drug target. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(7), 2017.

Marella A, Tanwar OP, Saha R, et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 1–12, 2013.

Marzochi MCA. & Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro*, 10 (supplement 2): 359-375, 1994.

Mccall LI, El Aroussi A, Choi JY, et al. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. PLoS Negl Trop Dis: 9(3), 2015.

Mcquarrie S, Kasper K, Moffatt DC, et al. Relapse of visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient successfully treated with a combination of miltefosine and amphotericin B. Cananian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology: 26(6):325-9, 2015.

Mears ER, Modabber F, Don R, et al. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases 9(9), 2015.

Menna-Barreto RF, Gonçalves RL, Costa EM, et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radical Biology & Medicine: 47(5):644-53, 2009.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology. 63(2):309-22, 2010.

Nefertiti ASG, Batista MM, Da Silva PB. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal effect of novel quinolines. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 62 (2), 2018.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger: 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Nosten F, Brasseur P. Combination therapy for malaria: the way forward? Drugs: 62(9):1315-29, 2002.

Nwaka S, Ramirez B, Brun R, et al. Advancing drug innovation for neglected diseases-criteria for lead progression. PLoS Negl Trop Dis. 3(8):e440, 2009.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy: 52(1):1, 2003.

Oumeish OY. Cutaneous Leishmaniasis: A Historical Perspective. Clinics in Dermatology 17:249–254, 1999.

Pandey K, Ravidas V, Siddiqui NA, et al. Pharmacovigilance of Miltefosine in Treatment of Visceral Leishmaniasis in Endemic Areas of Bihar, India. Am J Trop Med Hyg. Nov 2;95(5):1100-1105, 2016.

Pandharkar T, Zhu X, Mathur R, et al. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the arylimidamide DB766: azole interactions and role of CYP5122A1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 58(8): 4682-9, 2014.

Parvizi MM, Handjani F, Moein G et al. Efficacy of cryotherapy plus topical *Juniperus excelsa* M. Bieb cream versus cryotherapy plus placebo in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: A triple-blind randomized controlled clinical trial. PLOS Neglected Tropical Diseases: 11 (10), 2017.

Perez-Mazliah DE, Alvarez MG, Cooley G, et al. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy: 68(2): 424-37, 2013.

Ramesh V, Avishek K, Sharma V et al. Combination therapy with amphotericin-B and miltefosine for post-kala-azar dermal leishmaniasis: a preliminary report. Acta Dermato-Venereologica: 94(2):242-3, 2014.

Ramírez-Prada J, Robledo SM, Vélez ID et al. Synthesis of novel quinoline-based 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as potential anticancer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents. Eur J Med Chem. 131:237-254, 2017.

Rangel H, Dagger F, Hernandez A et al. Naturally Azole-Resistant *Leishmania braziliensis* Promastigotes Are Rendered Susceptible in the Presence of Terbinafine: Comparative Study with Azole-Susceptible *Leishmania mexicana* Promastigotes. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, p. 2785–2791, 1996.

Ribeiro-Dias F, Russo M, Nascimento FR, et al. Thioglycollate-elicited murine macrophages are cytotoxic to Mycoplasma arginini-infected YAC-1 tumor cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research: 31(11):1425-8, 1998.

Schroeder J & Aebischer T. Vaccines for leishmaniasis: from proteome to vaccine candidates. Human Vaccines, 7:sup1, 10-15, 2011.

Scott P & Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. Nat Rev Immunol: 16(9):581-92, 2016.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL et al. Immunoregulation Of Cutaneous Leishmaniasis T Cell Lines that Transfer Protective Immunity or Exacerbation Belong to Different T Helper Subsets and Respond to Distinct Parasite Antigens. J. Exp. MED. 168: 1675-1684, 1988.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral – 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Seebeck T, Sterk GJ, Ke H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Med Chem.* 3 (10): 1289-1306, 2011.

Shokri A, Abastabar M, Keighobadi M et al. Promising antileishmanial activity of novel imidazole antifungal drug luliconazole against *Leishmania major*: *In vitro* and *in silico* studies. *J Glob Antimicrob Resist.* 14:260-265, 2018.

Silva CF, Batista MM, Mota RA, et al. Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "*in vitro*". *Biochemical Pharmacology.* 15, 1939-46, 2007.

Soeiro MN, Werbovets K, Boykin DW, et al. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology:* 140(8): 929-51, 2013.

Stauber LA. Host resistance to the Kharthoum strain of *Leishmania donovani*. *The Rice Institute Pamphlet*, v.45, p.80-96, 1956.

Sueth-Santiago V, Franklim TN, Lopes ND et al. CYP51: Uma Boa Ideia? *Rev. Virtual Quim.*, 7 (2), 539-575, 2015.

Sullivan DJ Jr, Matile H, Ridley RG et al., A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 273, No. 47, pp. 31103–31107, 1998.

Tagoe DNA, Kalejaiye TD, De Koning HP et al. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! *Frontiers in pharmacology:* 6 (185), 2015.

ThermoFisher, alamarBlue – Reliable and Accurate Cell Health Indicator. Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alamarblue-rapid-and-accurate-cell-health-indicator.html>>. Acesso em: 19/01/2019.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, et al. Leishmaniasis: a review. *F1000Research:* 6:750, 2017.

Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC et al. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy:* 71(5):1314-22, 2016.

Vandekerckhove S & D'hooghe M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 5098–5119, 2015.

Veerman J, Van Den Bergh T, Orrling KM et al. Synthesis and evaluation of analogs of the phenylpyridazinone NPD-001 as potent trypanosomal TbrPDEB1

phosphodiesterase inhibitors and *in vitro* trypanocidals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*: 24: 1573-1581, 2016.

World Health Organization, Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 14/01/2019.

Yamey G & Torreele E. The world's most neglected diseases. *BMJ* 325: 176–177, 2002.

Zhu X, Farahat AA, Mattmana M et al. Synthesis and pharmacological evaluation of monoarylimidamides as antileishmanial agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*: 26(10):2551-6, 2016.

