



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação da atividade antileishmania de fármacos antimaláricos
in vitro e em modelo murino de leishmaniose tegumentar**

VINÍCIUS PINTO COSTA ROCHA

Salvador – BA
2012

VINÍCIUS PINTO COSTA ROCHA

**Avaliação da atividade antileishmania de fármacos antimaláricos
in vitro e em modelo murino de leishmaniose tegumentar**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Milena Botelho Pereira Soares

Co-orientadora: Dr^a Fabiana Regina Nonato

DEDICATÓRIA

À minha Mãe, Mara Rosani Pinto Costa Rocha, pelo amor, dedicação e cuidado.

“Não importa o que você seja, quem você seja, ou o que deseja na vida, a ousadia em ser diferente esta na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim que as pessoas lembrarão de você.”

(Ayrton Senna)

AGRADECIMENTOS

A sensação de completar mais uma etapa dentro desta trajetória profissional é algo indescritível. Devo isso não somente ao meu esforço e dedicação, mas, certamente, a inúmeras pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para que este objetivo fosse cumprido. Dessa forma, gostaria de agradecer, manifestar o meu carinho e admiração, e dedicar este trabalho àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que o mesmo se concretizasse:

- À minha orientadora, Dra. Milena Botelho Pereira Soares, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, pela orientação, ensinamentos, discussões científicas e dedicação ao trabalho;
- À minha co-orientadora, Dra. Fabiana Regina Nonato, pelos ensinamentos durante a iniciação científica, pela análise dos resultados e suporte para que este trabalho fosse desenvolvido;
- À Lucyvera Imbroinise pela organização administrativa do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia;
- À Dra. Despina Smirlis que contribuiu para o meu conhecimento através de discussões científicas, apesar do pouco tempo que estive no laboratório;
- À Dra. Simone Garcia Macambira pela ajuda e organização dos projetos do CEUA no nosso laboratório;
- Ao curso de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa e ao grupo de professores;
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela infra-estrutura disponibilizada, fundamental para a realização deste trabalho, e pelo apoio financeiro;
- Aos professores membros da banca de qualificação (Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas e Dra. Fernanda Grassi) pelas sugestões ao trabalho;
- À Unidade de Microscopia Eletrônica composta por Luciana Lanfredi Rangel, Cláudio Pereira Figueira e Maria Lúcia Vieira Moreno, muito obrigado pelos ensinamentos em microscopia eletrônica e disponibilidade para receber e orientar os estudantes;
- Aos amigos do Laboratório de Patologia e Biointervenção pela ajuda dada a mim durante o mestrado;
- Aos funcionários do biotério;

- Aos amigos do laboratório, Cássio Santana, Nanashara Carvalho, Taís Macedo, Tanira Matutino, Juliana Senra, Daniele Brustolim, Clarissa Cunha, Helena Barreto, Flávia Lima, Elisalva Guimarães, Pâmela Daltro, Gabriela Cruz, Kelly Gama, Rebeca Imbroinise, Murilo Fagundes obrigado pelos momentos de discussão e descontração no nosso laboratório, vocês significam bastante para mim;
- Aos amigos do ChemBioFight, Philippe Eugster, Nikitia Mexia, Katerina Travararou e Tonia Efstathiou;
- À Marlene Cerqueira pela organização do nosso laboratório;
- À Gisele Graça Leite pelo carinho e incentivo e
- Aos meus pais e ao meu irmão, obrigado pela educação dada a mim, a todo o investimento e dedicação (espero retribuir isso um dia), e aos momentos inesquecíveis que já vivemos e viveremos como uma família.

Por fim, agradeço a todos aqueles que fizeram parte do meu dia-a-dia ao longo destes dois anos, minha eterna admiração e gratidão.

ROCHA, Vinícius Pinto Costa. Avaliação da atividade antileishmania de fármacos antimaláricos *in vitro* e em modelo murino de leishmaniose tegumentar. 76 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

RESUMO

A leishmaniose compreende um complexo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, e é endêmica em 88 países, com uma população de 350 milhões de indivíduos sob o risco de contrair a infecção. O tratamento convencional da leishmaniose é realizado com antimoniais pentavalentes, e está associado a inúmeros efeitos adversos e falha terapêutica. Dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas para esta doença é de extrema relevância. O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antileishmania de fármacos antimaláricos *in vitro* e em modelo murino de leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania amazonensis*. Os fármacos antimaláricos testados foram o artesunato, a cloroquina, a hidroxicloroquina, a mefloquina e a primaquina. Destes, a cloroquina e a hidroxicloroquina não reduziram, de forma significativa, o crescimento de formas promastigotas do parasito na concentração de 50 μM . Entretanto, estes dois fármacos foram eficazes em reduzir o número de amastigotas em macrófagos murinos, apresentando valores de IC_{50} de $0,78 \pm 0,08 \mu\text{M}$ e $0,67 \pm 0,12 \mu\text{M}$, respectivamente. A mefloquina apresentou valor de IC_{50} de $8,4 \pm 0,70 \mu\text{M}$ contra promastigotas do parasito, enquanto que, contra formas amastigotas o IC_{50} foi $1,56 \pm 0,19 \mu\text{M}$. A análise ultraestrutural de células infectadas e tratadas com a cloroquina ou com a mefloquina mostrou o acúmulo de corpos multivesiculares no citoplasma do parasito. Este resultado sugere o comprometimento da via endocítica da *Leishmania* após o tratamento com estas moléculas. O tratamento oral de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* reduziu a lesão e o parasitismo nos animais infectados. Diferente destes resultados, o tratamento com a mefloquina não reduziu o parasitismo nos animais infectados, apesar de ter reduzido o tamanho da lesão. Com base nestes resultados é possível concluir que a cloroquina pode representar uma alternativa terapêutica ao tratamento convencional da leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania amazonensis*. Macrófagos. Fármacos. Antimaláricos. Tratamento.

ROCHA, Vinícius Pinto Costa. Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis 76 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a complex of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and is endemic in 88 countries, with a population of 350 million individuals at risk of contracting the infection. The conventional treatment of leishmaniasis based on pentavalent antimonials is associated with several adverse effects and treatment failure. Thus, the search for new therapeutic alternatives for this disease is extremely relevant. This study aims to evaluate the antileishmanial activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. The antimalarial drugs tested were artesunate, chloroquine, hydroxychloroquine, mefloquine and primaquine. Of these, chloroquine and hydroxychloroquine did not reduce, significantly, the growth of promastigotes of the parasite at a concentration of 50 μM . However, these two drugs were effective in reducing the number of amastigotes in murine macrophages, with IC_{50} values of $0.78 \pm 0.08 \mu\text{M}$ and $0.67 \pm 0.12 \mu\text{M}$, respectively. Mefloquine had an IC_{50} value of $8.4 \pm 0.70 \mu\text{M}$ against promastigote forms, whereas the IC_{50} against amastigotes was $1.56 \pm 0.19 \mu\text{M}$. The ultrastructural analysis of infected cells and treated with chloroquine or mefloquine showed accumulation of multivesicular bodies in the cytoplasm of the parasite. This result suggests the involvement of the endocytic pathway of *Leishmania* after treatment with these molecules. Oral treatment of CBA mice infected with *L. amazonensis* reduced lesion size and parasitism in infected animals. In contrast, treatment with mefloquine did not reduce the parasite load in infected animals, although it did reduce the size of the lesion. Based on these results we conclude that chloroquine may represent a therapeutic alternative to conventional treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis. *Leishmania amazonensis*. Macrophages. Drugs. Antimalarials. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas clínicas da leishmaniose.	12
Figura 2 - Ciclo de vida de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .	15
Figura 3 - Estruturas moleculares dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.	18
Figura 4 - Estruturas moleculares dos fármacos antimaláricos.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies de *Leishmania* que causam doença em humanos e formas clínicas.

14

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i>
IC ₅₀ PRO	Concentração inibitória para 50% das promastigotas
LC ₅₀	Concentração letal para 50% das células
IC ₅₀ AMA	Concentração inibitória para 50% das amastigotas
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
NNN	Novy-Nicolle-MacNeal
S.E.M.	Erro padrão da média
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbeco
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
IS	ndice de seletividade
H&E	Hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
TNF- α	Fator de necrose tumoral
IFN- γ	Interferon gama
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NO	xido nítrico
IL	Interleucina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Leishmaniose	12
1.2 Epidemiologia	16
1.3 Tratamento	17
1.4 Reposicionamento de medicamentos	21
2. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS	23
2.1 Antimaláricos e leishmaniose	23
2.2 Artemisinina e seus derivados	24
2.3 Primaquina	26
2.4 Cloroquina e hidroxicloroquina	26
2.5 Mefloquina	28
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. CAPÍTULO 1	33
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose compreende um complexo de doenças infecciosas, causadas por parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. Tais protozoários têm como vetores inúmeras espécies de insetos genericamente denominados flebotomíneos. A doença pode se manifestar sob duas formas clínicas distintas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT) (Figura 1). Estas duas formas clínicas apresentam ampla distribuição pelo mundo, sendo que algumas espécies dos parasitos são restritas a determinadas localidades. Sendo assim, existe a classificação de leishmaniose do “Velho Mundo” (Europa, Ásia e África) e do “Novo Mundo” (América Latina) (GOTO et al., 2010).

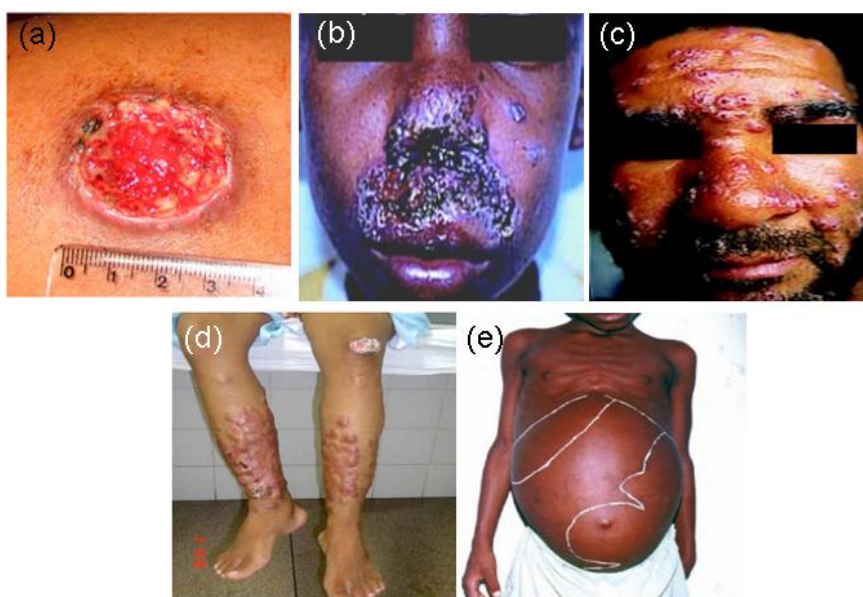


Figura 1. Formas clínicas da leishmaniose. Diferentes formas clínicas da doença podem ocorrer dependendo da espécie do parasito envolvida na infecção e da interação parasito-hospedeiro: (a) leishmaniose cutânea localizada; (b) leishmaniose mucocutânea; (c) leishmaniose cutânea disseminada; (d) leishmaniose cutânea difusa e (e) leishmaniose visceral. Fonte: Adaptado de Unger et al., 2009; Guimarães et al., 2005; Costa et al., 2009; Brasil, 2006.

A LV é caracterizada pela disseminação dos parasitos para órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, sendo potencialmente letal (10% dos casos) caso não seja instituído rapidamente o tratamento. A LV apresenta diferentes manifestações clínicas, variando entre a forma assintomática, a oligoassintomática e a forma clássica da doença, caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (DRUMOND, 2011). A doença acomete indivíduos de faixa etária distintas, entretanto observa-se que, em áreas endêmicas, aproximadamente, 80% dos casos são registrados em crianças menores de 10 anos. Inúmeros casos de co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Leishmania* estão sendo documentados em diversas regiões do mundo, somando 35 países, como consequência da sobreposição das áreas de risco para as duas doenças. A co-infecção pode acelerar o curso clínico da infecção pelo HIV, bem como resultar em forma mais grave da LV, em consequência do comprometimento da resposta imunológica nos indivíduos acometidos (WHO, 2011b).

A LT é caracterizada pelo acometimento de estruturas cutâneas, de forma localizada ou difusa, podendo acometer também as mucosas oral e/ou nasal (COSTA, 2005). Logo, diferentes formas clínicas da doença podem ser observadas como reflexo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do perfil genético e imunológico do hospedeiro. Dessa forma, a doença pode variar entre a forma benigna, caracterizada pela presença de uma única úlcera cutânea localizada que pode evoluir para cura espontânea, e doença crônica, latente e com tendência de disseminação (BITTENCOURT, 2005). No “Novo Mundo”, a LT, denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA) é classificada segundo as manifestações clínicas, características histopatológicas e a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito. Sendo assim, a LTA pode ser classificada em cutânea localizada, mucocutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa (GONTIJO, 2003; SILVEIRA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2009).

Diversas espécies de *Leishmania* são reconhecidas por causarem doença em humanos, com distribuições geográficas distintas. Na Tabela 1 estão listadas as diversas espécies do parasito e as respectivas formas clínicas que podem causar, ressaltando o fato da importância da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, bem como da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (KAYE, 2011).

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* que causam doença em humanos e formas clínicas[§]

Forma Clínica	Espécies
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania chagasi</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania chagasi</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanol</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania panamensis</i>

[§] Adaptada de KAYE, 2011.

Independente da espécie do parasito envolvida na infecção natural, a porta de entrada do patógeno é a mesma durante a infecção por *Leishmania* (MURRAY et al., 2005). A transmissão ocorre, como demonstrado na Figura 2, no momento em que formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são inoculadas na derme do hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo de fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* (“Velho Mundo”) ou *Lutzomyia* (“Novo Mundo”) (SANTOS et al., 2008). As promastigotas metacíclicas são fagocitadas principalmente por células do sistema mononuclear fagocítico. Entretanto, eventos iniciais, tais como a interação entre parasitos e neutrófilos, bem como destas células com macrófagos, parecem desempenhar um papel importante na sobrevivência do parasito e no estabelecimento da infecção. Peters et al. (2008) demonstraram que *L. major* utiliza o rápido influxo de neutrófilos induzido pela lesão tecidual após a inoculação do parasito para o estabelecimento da infecção (PETERS et al., 2008). Apesar da relação dinâmica entre neutrófilos e promastigotas metacíclicas logo após o inóculo, os macrófagos são as células hospedeiras definitivas dos parasitos (PETERS et al., 2008). No interior destas células, as promastigotas transformam-se em amastigotas, formas arredondadas do parasito,

com flagelo internalizado e que se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo. Com a intensa multiplicação parasitária, ocorre a lise das células, liberando os parasitos que serão novamente internalizados por outros fagócitos. O ciclo biológico do parasito é completado no momento em que o inseto, ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, ingere células contendo amastigotas ou parasitos livres no sangue ou na linfa. No intestino do hospedeiro invertebrado, as amastigotas se diferenciam em promastigotas curtas, largas e de vida livre na luz do intestino do inseto, e em paramastigotas arredondadas, que se ligam à parede intestinal até que se diferenciem em promastigotas metacíclicas e migrem para a porção anterior do aparelho digestivo do inseto, tornando-se aptas para a infecção (MICHALICK, 2005). Com base no ciclo biológico, as amastigotas são responsáveis pela manutenção da infecção no hospedeiro mamífero, constituindo o alvo para a ação de moléculas com atividade antileishmania.

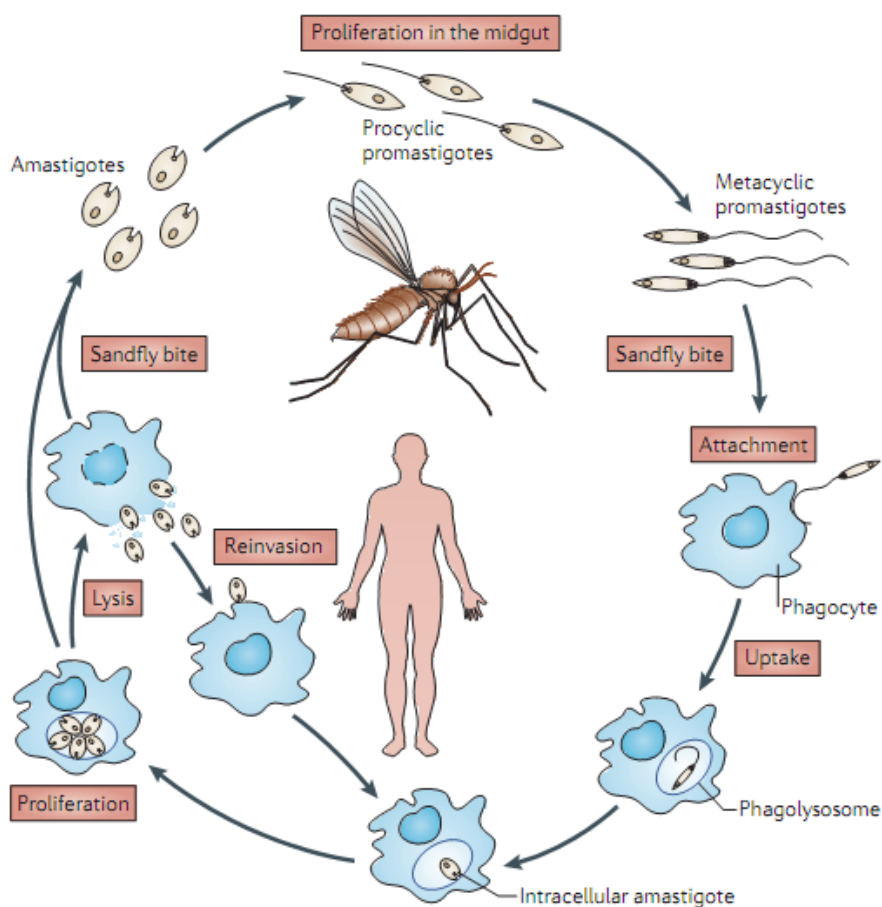


Figura 2. Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: Kaye (2011).

1.2 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é considerada endêmica em 88 países, com uma população de 350 milhões de indivíduos sob o risco de contrair a infecção e uma incidência de 2 milhões de casos, incluindo os casos de LT (1,5 milhões de novos casos por ano) e LV (500.000 novos casos por ano). Atualmente, estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito, sendo que este cenário pode estar sendo influenciado por sub-notificações, uma vez que a notificação é compulsória em apenas 32 dos 88 países afetados (WHO, 2011a). Em relação à forma cutânea da doença, estima-se que a mesma seja endêmica em 82 países, sendo que destes apenas 10 contribuem com mais de 90% dos casos, entre eles o Brasil, totalizando, aproximadamente, 10 milhões de pessoas doentes no mundo (WHO, 2007). Portanto, a doença merece atenção devido à sua magnitude, ao risco de desenvolvimento de deformações, assim como pelo envolvimento psicológico, com reflexos em aspectos sociais e econômicos que ela causa (BRASIL, 2007).

Diante das constantes mudanças ambientais causadas pelo homem, como a urbanização e o desmatamento, observa-se a expansão da LT, caracterizada pela transmissão da doença, antes restrita a áreas rurais e agora também presente nas zonas urbanas. Além disso, a constante migração de um número crescente de indivíduos contribui para a disseminação da doença, sendo que forma tegumentar está presente entre as 10 doenças de pele que mais acometem turistas que retornam de países tropicais (PAVLI, 2010).

No Brasil, a LTA tem ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões do país. A partir da década de 80 verifica-se o aumento do número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995), quando houve a implantação das ações de vigilância e controle da leishmaniose no país. Entre 1995 e 2005 verifica-se uma média anual de 28.568 casos. Indivíduos do sexo masculino (74% dos casos) maiores de 10 anos (90% dos casos) são os mais acometidos (BRASIL, 2007). No Brasil, os principais agentes causais da LTA são a *Leishmania braziliensis*, a *L. amazonensis* e a *L. guyanensis*. Estas espécies são associadas ao desenvolvimento de quatro formas clínicas da doença: a leishmaniose cutânea localizada, a leishmaniose mucocutânea, a leishmaniose cutânea difusa e a leishmaniose disseminada (GUIMARÃES et al., 2005). As diferentes espécies de parasitos são transmitidas por variadas espécies de vetores, com hábitos distintos e, possivelmente, adaptados a áreas peridomésticas (BASSANO, 2004).

Diante do exposto, fica evidente a importância da LT no mundo, e mais especificamente no Brasil, tornando de extrema necessidade medidas de controle da doença,

através da vigilância epidemiológica e entomológica, e o estabelecimento de tratamentos eficazes, seguros e viáveis economicamente.

1.3 Tratamento

O tratamento de primeira escolha da leishmaniose é realizado com os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), incluindo o stibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metil glucamina (Figura 3). O tratamento inicial é baseado na administração diária de 20 mg/kg durante 20 dias, nos casos de LT, e 30 dias para o tratamento da LV (WHO, 2010). Estes fármacos foram introduzidos na terapia da leishmaniose em 1940, mostrando-se menos tóxicos do que o seu análogo trivalente. O mecanismo exato de ação do antimonial pentavalente ainda não foi completamente elucidado. Sendo assim, é possível que a molécula seja bioativada, através do seu metabolismo *in vivo*, ou possua atividade antiparasitária intrínseca. Neste contexto, inúmeros mecanismos de ação são propostos para os antimoniais pentavalentes (FRÉZARD et al., 2009). A molécula pode ser reduzida em antimonial trivalente através da atividade de enzimas contidas em diferentes tipos e compartimentos celulares, como glutatona, presente em células de mamíferos, cisteína e cisteinil-glicina nos lisossomos e pela tripanotona, predominante em células parasitárias (FERREIRA et al., 2003; FLOHÉ, 2011). É proposto um modelo de redução da molécula em compartimentos ácidos e por amastigotas, visto que a oxidação-redução é favorecida em temperatura elevada e baixo pH intracelular (FRÉZARD et al., 2009). Além disso, a participação de enzimas do parasito na bioativação do fármaco é observada, conferindo suscetibilidade de amastigotas ao tratamento (ZHOU et al., 2004; DENTON et al., 2004).

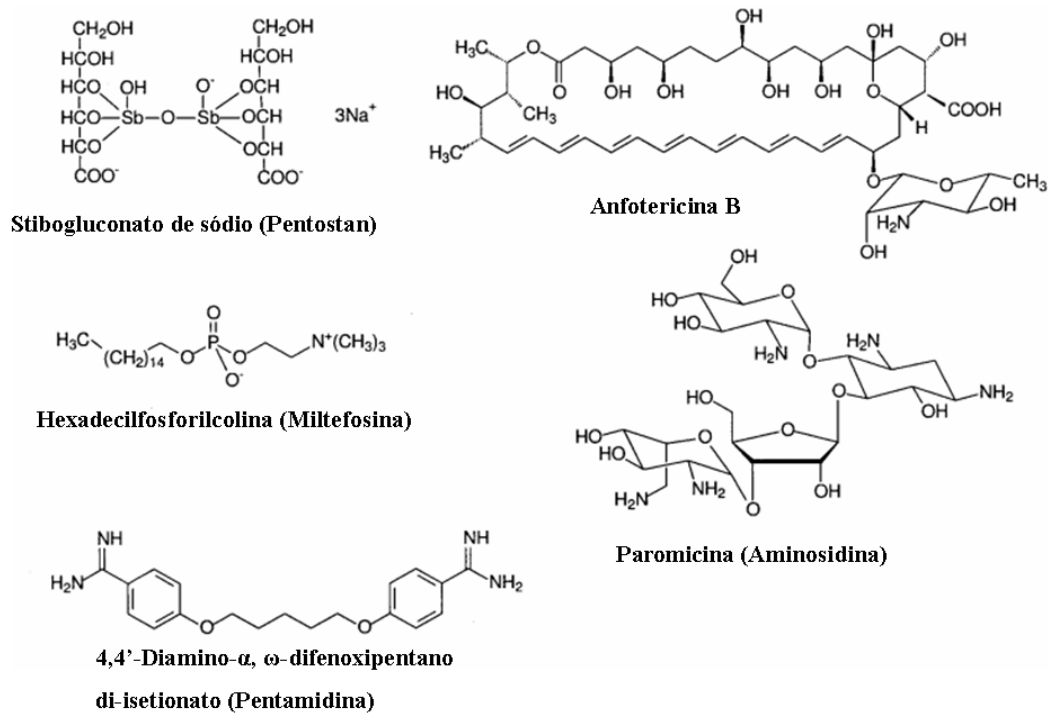


Figura 3: Estruturas moleculares dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose. Fonte: Adaptado de Croft et al., 2006.

Mesmo sendo o tratamento de primeira escolha para leishmaniose, o uso clínico dos antimoniais pentavalentes é associado a inúmeras limitações, requerendo supervisão cuidadosa de profissionais de saúde (FRÉZARD et al., 2009). O tratamento é acompanhado de dor no local da administração do medicamento (intramuscular ou intravenosa), além de efeitos adversos sistêmicos como mialgia, vômito, cólica abdominal, diarreia, rash cutâneo, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (OLIVEIRA et al., 2011). Indivíduos com morbidades cardíaca, renal, hepática ou pancreática pré-existente, assim como pacientes com idade avançada e risco de mortalidade associado à toxicidade do medicamento, não devem ser tratados de forma sistêmica com os antimoniais (WHO, 2010). Associado a estas limitações, observa-se o aumento nos casos de falha terapêutica resultante da baixa sensibilidade intrínseca ou adquirida de algumas espécies de *Leishmania* aos antimoniais, variações farmacocinéticas e da condição imunológica do indivíduo infectado. Este último aspecto está relacionado com a falha do tratamento em pacientes com a forma anérgica difusa ou portadores de co-infecção pelo HIV (CROFT et al., 2006).

Outros fármacos, tais como a anfotericina B, a paromicina e a pentamidina (Figura 3), também são utilizados na terapia, porém, assim como os antimoniais, apresentam efeitos adversos significativos e necessitam de administração parenteral e monitoramento (CROFT et al., 2006). Diante da problemática envolvendo o tratamento sistêmico com os antimoniais, como efeitos adversos graves, alto custo, administração intramuscular ou intravenosa e necessidade de monitoramento médico, muito tem sido feito para o desenvolvimento de formulações mais seguras e de administração oral. Os principais produtos gerados foram a formulação lipossomal da anfotericina B e a miltefosina que foi originalmente desenvolvida como um antineoplásico, mas útil no tratamento da leishmaniose visceral e administrada por via oral (FRÉZARD et al., 2009). Entretanto, o alto custo associado ao uso da anfotericina B lipossomal, assim como a teratogenicidade e o baixo índice terapêutico da miltefosina, foram fatores que contribuíram para a não resolução dos problemas associados ao tratamento da leishmaniose por esses fármacos.

Especificamente em relação à forma tegumentar da doença, uma alternativa ao tratamento sistêmico é o tratamento local. Segundo a OMS, determinados critérios devem ser considerados antes da escolha deste tipo de tratamento: menos de quatro lesões que requerem tratamento imediato e com diâmetro menor do que cinco centímetros; presença de lesões sem o potencial de causar mutilação ou incapacidade do indivíduo, como lesões na face e articulações; pacientes sem comprometimento do sistema imunológico e passível de acompanhamento médico (WHO, 2010). Apesar de a OMS considerar o tratamento tópico inadequado nos casos de infecção por *L. braziliensis* e *L. panamensis* devido ao risco de disseminação do parasito, é estabelecido que o tratamento local seja viável em casos selecionados de LTA, já que o próprio tratamento sistêmico não previne o surgimento da forma mucosa da doença em aproximadamente 5% dos casos (WHO, 2010). Utilizando esta via de administração, o tratamento com paromicina se mostra eficaz durante a infecção causada por *L. major*, além de ser simples e barato, resultando em benefício para o sistema público de saúde (SALAH et al., 2009; ASSILIAN et al., 2003). Sabendo-se das vantagens do tratamento tópico em relação às terapias sistêmicas, como menos efeitos adversos, menor custo e maior facilidade de adesão do paciente ao tratamento, o desenvolvimento de fármacos com atividade tópica pode representar um avanço para o controle farmacológico da LT. Injeções intralesionais do antimonial pentavalente representam outra modalidade de tratamento local, entretanto são dolorosas, difíceis de serem administradas em crianças e em pacientes com múltiplas lesões (BLUM et al., 2004).

Além da quimioterapia local, a termoterapia mostra-se como uma ferramenta importante no tratamento de lesões cutâneas, utilizando ondas de radiofrequência. Esta modalidade de tratamento resultou na cura de lesões cutâneas causadas por *L. major* com a eficácia terapêutica igual ao tratamento intralesional com antimônio pentavalente, superioridade em relação à terapia com antimônio sistêmico e efeitos adversos significativamente menos graves quando comparada com o tratamento de primeira escolha, incluindo apenas edema local e eritema (REITHIGER et al., 2005; ARONSON et al., 2010). Além disso, a termoterapia apresentou um efeito modulador da resposta imunológica em pacientes, semelhante ao observado durante o tratamento com antimônio em indivíduos com leishmaniose cutânea (LOBO et al., 2006). Portanto, a termoterapia também representa uma ferramenta importante no tratamento de algumas formas da LT sendo mais segura do que o tratamento convencional.

Apesar de novas terapias sistêmicas estarem em desenvolvimento, ainda há um custo exorbitante associado à investigação e comercialização de novos fármacos. O sequenciamento do genoma de parasitos como a *Leishmania* proporcionou a expansão do conhecimento molecular e bioquímico destes microrganismos. No entanto, o desenvolvimento de novos medicamentos para este tipo de doença ainda é limitado (WHO, 2003). Segundo Croft e Olliaro (2011), atualmente existem avanços significativos no tratamento da LV, entretanto este avanço é menor em relação à LT localizada ou à forma mais complexa da doença. Estes mesmos autores destacam que o objetivo das pesquisas envolvendo a quimioterapia da leishmaniose tem como objetivo o busca por medicamentos mais seguros, baratos, de administração oral, curto período de tratamento (10-14 dias) e, apesar dos avanços, tais objetivos ainda estão distantes de serem alcançados para as duas formas clínicas da doença (Croft, 2011).

Sabe-se que existe uma necessidade crescente de novos medicamentos para o tratamento das doenças negligenciadas, incluindo a leishmaniose. Entre 1975 e 1999, de 1393 novas moléculas introduzidas no mercado mundial, somente 13 foram especificamente para o tratamento de doenças infecciosas negligenciadas (WHO, 2003). Estima-se que o custo envolvido em estudos clínicos com uma molécula candidata a um novo fármaco destinado a humanos seja da ordem de 500 milhões a 2 bilhões de dólares, dependendo da classe terapêutica, com duração de 10 a 15 anos para que o produto seja disponibilizado no mercado (ADAMS, 2006). Além disso, regulamentos mais rigorosos estabelecidos pelas agências sanitárias também estão conduzindo a um aumento significativo no tempo e custo de desenvolvimento de novos medicamentos (ASHBURN, 2004).

Para as doenças negligenciadas o principal problema é a ausência de suporte financeiro e mecanismos de gestão adequados para o desenvolvimento de medicamentos, o que normalmente é financiado pelas indústrias farmacêuticas. Este alto custo associado à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, aliado à ausência de um retorno financeiro significativo, resulta na falta de investimentos destas indústrias neste campo de pesquisa relacionado com as doenças tropicais (WHO, 2003). Como consequência, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos acontecem, principalmente, em companhias de biotecnologia e centros acadêmicos de pesquisa (EKINS et al., 2011).

1.4 Reposicionamento de medicamentos

Diante desta problemática, a estratégia conhecida como reposicionamento de medicamentos pode representar uma forma de desenvolvimento mais barato e rápido de novos tratamentos para doenças como a leishmaniose. O reposicionamento de fármacos consiste em desenvolver novas indicações para medicamentos já existentes, ainda disponíveis ou não no mercado, que tenham indicação para outras doenças e/ou alvos terapêuticos já descobertos (ASHBURN, 2004). O longo processo de pesquisa e desenvolvimento pelo qual uma molécula candidata a novo fármaco passa é composto, basicamente, de três estágios: a descoberta, onde o novo composto passará pelo processo de triagem e será identificado; os testes pré-clínicos, nos quais o composto será testado *in vitro* e em modelo animal e os testes clínicos, em que o composto será testado em humanos. Além desta longa trajetória, o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é extremamente arriscado, em vista da falta de garantia de retorno financeiro baseado em resultados de testes clínicos. De acordo com Kaitin (2010), dos compostos candidatos a novos fármacos que passaram por estudos clínicos entre 1999 e 2004 apenas 16% provavelmente chegarão ao mercado. É evidente que a produtividade da indústria farmacêutica está insuficiente com base nos investimentos neste campo de pesquisa, que foi estimado em 50 bilhões de dólares em 2008, com a aprovação de no máximo 20 medicamentos no mesmo período. Além disso, destes produtos aprovados, apenas a metade compensará o investimento realizado (ASHBURN, 2004; KATIN, 2010). Com o objetivo de reaver os custos durante o processo de pesquisa e desenvolvimento, os investidores tendem a focar em pesquisas para o tratamento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, endócrinas, psicológicas, neurológicas e cânceres, que representam um forte mercado consumidor. Este cenário traz como consequência o paradigma do baixo investimento em pesquisa e desenvolvimento em medicamentos para o

tratamento de doenças infecciosas emergentes, causadas por microrganismos multirresistentes e doenças tropicais negligenciadas. Apesar de receberem pouco investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos pelas indústrias farmacêuticas, estas doenças constituem um sério problema de saúde pública, principalmente em países menos favorecidos economicamente e países emergentes (CHONG, 2007).

A estratégia do reposicionamento de medicamentos apresenta vantagens em relação ao método convencional de descoberta de novos fármacos. Existe a redução substancial do custo (em até 40%) e do tempo (3-12 anos), visto que dados sobre farmacocinética, toxicidade e segurança dos medicamentos estão disponíveis, resultando em menos riscos de descontinuidade do estudo durante o desenvolvimento da etapa clínica (ASHBURN, 2004). Como resultado final, não somente as companhias farmacêuticas são beneficiadas, mas também agências não comerciais como centros acadêmicos e laboratórios do setor público (PADHY, 2011).

As idéias para o reposicionamento de medicamentos podem surgir a partir de observações casuais, baseadas no mecanismo de ação do composto que pode ser útil para o objetivo do tratamento proposto ou através de novas plataformas estabelecidas para identificar tais oportunidades de reposicionamento. O espectro de tecnologias aplicadas nesta modalidade de desenvolvimento de fármacos inclui a análise bioinformática de banco de dados, triagem *in vitro* (“high-throughput”), seguida de testes em modelos experimentais (PADHY, 2011). Dessa forma, a análise *in silico* das interações entre possíveis alvos terapêuticos e compostos bioativos, associados com a triagem *in vitro*, informações previamente disponíveis sobre o composto e a validação dos resultados em modelos *in vivo*, constituem a base do reposicionamento de fármacos (EKINS et al., 2011). Baseada nesta estratégia, o reposicionamento de fármacos é considerada uma ferramenta valiosa para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose. Sendo assim, inúmeros medicamentos, como antifúngicos azóis, alopurinol, aminosidina, azitromicina, buparvaquona e sitamaquina, apresentaram eficácia terapêutica no tratamento da leishmaniose, com base em estudos clínicos, alguns deles já são úteis como tratamentos de segunda escolha para a doença ou ainda encontram-se sob investigação em estudos de fase clínica (URBÁ et al, 2009). A miltefosina representa o principal exemplo de reposicionamento relacionado com a leishmaniose. Este medicamento foi desenvolvido para o tratamento de câncer mama, mas atualmente representa o único fármaco utilizado por via oral para o tratamento da leishmaniose, após apresentar baixa eficácia na redução de tumores durante testes clínicos de fase II (CHONG, 2007). Portanto,

esta estratégia é fundamental para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose com melhor perfil de eficácia e segurança, associada ao baixo custo para o seu desenvolvimento.

2. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

2.1 Antimaláricos e leishmaniose

O estudo da atividade antileishmaniana de fármacos utilizados no tratamento da malária foram iniciados na década de 60 (NANDIM et al. 1972). Após a observação da redução de lesões cutâneas em pacientes com leishmaniose e tratados para a malária com hidrocloreto de cicloguanida, Chavarria et al. (1965) utilizaram o pamoato de cicloguanida para o tratamento de indivíduos infectados com *L. braziliensis* obtendo a cura de 26 dos 30 pacientes tratados. No ano seguinte, Beltran et al. (1966) utilizaram o mesmo medicamento em pacientes refratários ao tratamento convencional, no México. Os resultados deste estudo mostraram a cura de 76% dos pacientes (BELTRAN et al., 1966 apud NANDIM et al. 1972). No Velho Mundo, Salen et al. (1969) obtiveram a cura de aproximadamente 48% dos pacientes tratados com este mesmo medicamento, após seis semanas. Dos pacientes não curados, observou-se melhora clínica em 31%. Entretanto, no mesmo ano, Bryceson et al. (1969) não obtiveram resultados promissores com o cicloguanil no tratamento da leishmaniose cutânea na Etiópia (BRYCESON et al., 1969 apud NANDIM et al. 1972).

Além desse, fármacos antimaláricos de diferentes classes já tiveram a sua atividade avaliada contra diferentes espécies de *Leishmania*, sobretudo aquelas encontradas no Velho Mundo. Estes estudos possibilitaram o desenvolvimento de compostos derivados com o potencial de se tornarem novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose. No presente estudo, cinco fármacos desta classe foram selecionados: artesunato, cloroquina, hidroxicloroquina, mefloquina e primaquina (Figura 4).

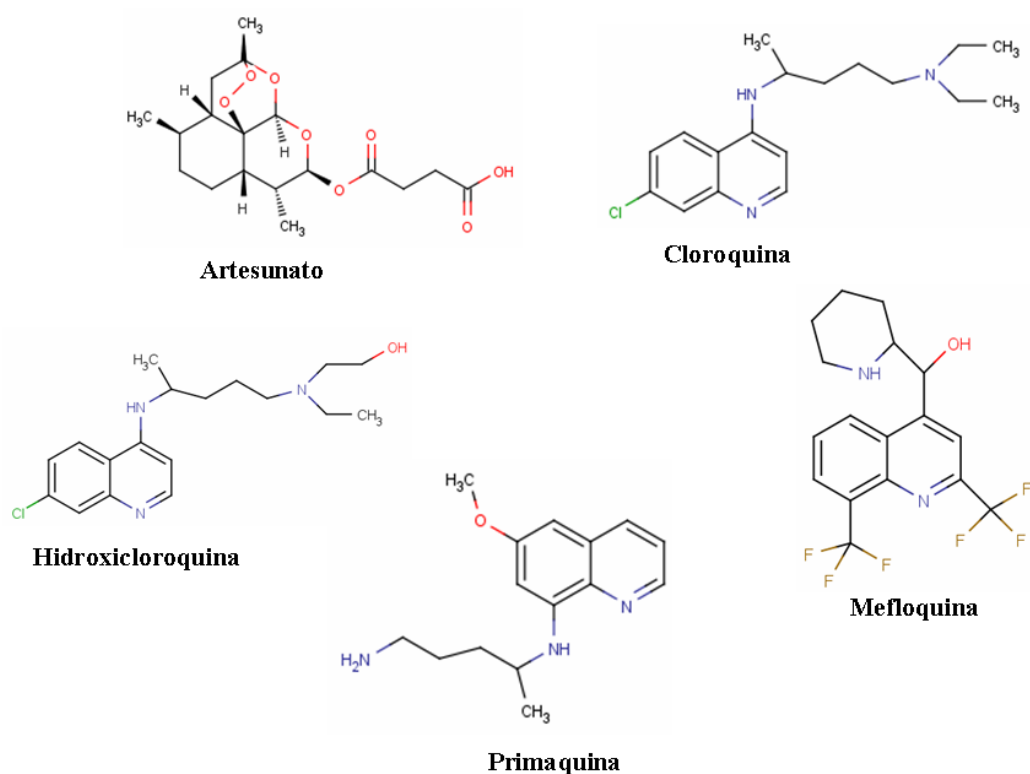


Figura 4. Estruturas moleculares dos fármacos antimaláricos.

2.2 Artemisinina e derivados

Um dos fármacos antimaláricos estudados quanto à sua atividade anti-leishmania foi a artemisinina. Este composto é uma lactona sesquiterpenóide com endoperóxido derivada da semente da *Artemisia annua* que possui valor medicinal atribuído pelos chineses há mais de 2000 anos. Este composto foi isolado em 1972 e, a partir desta data, três moléculas derivadas da artemisinina foram sintetizadas: a diidroartemisinina, a artemeter e o artesunato, todos eles com potência antimalárica superior a da artemisinina. Os fármacos da artemisinina possuem ação rápida, eficaz e segura para o tratamento de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, agindo nas formas eritrocíticas assexuadas destes parasitos. Os compostos de artemisinina são eficazes no tratamento da malária grave causada por *Plasmodium falciparum* multirresistente, especialmente quando utilizados juntamente com

fármacos esquizotomicas de ação duradoura, como a mefloquina. O mecanismo de ação dos fármacos da artemisinina envolve a formação de radicais induzida pelo ferro da hemoglobina. A formação destes radicais na molécula induz modificações covalentes em proteínas do parasito e promove o efeito antiparasitário do fármaco (TRACY, 2006).

Os estudos de avaliação da atividade anti-leishmania da artemisinina e seus derivados apresentaram resultados promissores em diferentes espécies do parasito. Yang e Liew (1993) demonstraram que a artemisinina e derivados, como a diidroartemisinina e o artesunato, foram eficazes no tratamento da leishmaniose cutânea experimental, causada por *L. major*, quando administrados pelas vias intralésional, intramuscular e oral (YANG, 1993). Este trabalho serviu de base para a análise da atividade anti-leishmania de 70 derivados da artemisinina contra promastigotas de *L. donovani*. O estudo da relação estrutura-atividade mostrou que o aumento da lipossolubilidade destes derivados estava relacionado com a potência das moléculas derivadas. Além disso, o mecanismo da atividade leishmanicida baseava-se na presença do grupamento endoperoxido, sugerindo a semelhança entre os mecanismos de ação contra *Leishmania* e *Plasmodium* (AVERY et al., 2003). Baseado nestes dados, Chollet et al. (2008) avaliaram a atividade de 19 compostos derivados. Apesar dos resultados promissores em relação à atividade contra formas promastigotas, tais derivados não apresentaram atividade contra formas amastigotas de *L. donovani* (CHOLLET et al., 2008).

Outros estudos também demonstraram a atividade da artemisinina contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. Este fármaco teve a capacidade de provocar alterações no ciclo celular do parasito e induzir morte celular por apoptose através de um mecanismo independente de caspase, que possui atividade aumentada na presença de íons ferro (SEN et al., 2007; SEN et al., 2010a). Estes dados reforçam o mecanismo de formação de uma molécula radicalar pode estar mediando o efeito da artemisinina contra promastigotas de *Leishmania*. Além disso, a artemisinina foi capaz de restaurar os níveis de produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. donovani* e eficaz em modelo experimental de leishmaniose visceral. Após o tratamento oral com 10 e 25 mg/Kg/dia durante 5 dias, camundongos Balb/c infectados com *L. donovani* apresentaram redução do parasitismo, assim como a restauração dos níveis de IFN- γ e IL-2 (SEN et al., 2010b).

Em modelo de leishmaniose visceral causado por *L. donovani*, os animais tratados com a diidroartemisinina por via oral apresentaram uma tendência de redução do parasitismo em órgãos como fígado e baço, após o tratamento com 25 e 50 mg/kg (YING et al., 2004).

Desta forma, os fármacos derivados da artemisinina representam uma alternativa em potencial para o desenvolvimento de medicamentos seguros e de fácil administração, devido à

biodisponibilidade por via oral, para o tratamento da leishmaniose. Além disso, os compostos citados acima estão disponíveis para uso clínico e, portanto, apresentam suas características de farmacocinética e de segurança descritas. Logo, pode existir a redução no tempo e no custo associados com os testes pré-clínicos de toxicidade, caso estes fármacos seja utilizados no tratamento da leishmaniose.

2.3 Primaquina

A busca de fármacos antimaláricos mais potentes e menos tóxicos resultou na descoberta da primaquina, no período da segunda guerra mundial. Ao contrário dos outros fármacos antimaláricos, a primaquina apresenta atividade contra os estágios tissulares do *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*. Portanto, este fármaco é eficaz na cura da malária e evita a forma recidivante da doença (TRACY, 2006).

Os estudos da atividade anti-leishmania da primaquina mostraram que este fármaco apresenta atividade relevante em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com *L. donovani*, apresentando IC₅₀ igual a 2 µg/mL. Além disso, o uso da primaquina encapsulada em nanopartículas mostrou-se eficaz neste mesmo modelo de infecção. O uso deste fármaco contido em um carreador aumentou de forma significativa a potência do mesmo quando comparada à molécula livre. (HEURTAULT et al., 2001).

Baseada na atividade antileishmania da primaquina, uma série de 8-aminoquinolinas derivadas foi desenvolvida e representam uma fonte importante de possíveis novos fármacos para o tratamento da leishmaniose. A sitamaquina representa um dos fármacos derivados da primaquina mais promissores no tratamento da leishmaniose. Esta molécula esteve em estudo clínico de fase II na Índia (TARA et al., 2005) e no Kenia (WASUNNA et al., 2005), e apresentou resultados promissores no tratamento oral da leishmaniose visceral em cada um dos países. No Brasil, os testes clínicos com a sitamaquina não apresentaram os mesmos resultados e observou-se o desenvolvimento de nefrotoxicidade após o uso oral da molécula durante o tratamento da leishmaniose visceral (DIETZE et al., 2001).

2.4 Cloroquina e hidroxicloroquina

A cloroquina é uma das inúmeras moléculas pertencentes ao grupo das 4-aminoquinolinas estudadas durante a Segunda Guerra Mundial na busca incessante para o

tratamento da malária. Este fármaco é útil para o tratamento de infecções por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, assim como para o tratamento profilático de infecções por *Plasmodium malariae* e cepas susceptíveis de *Plasmodium falciparum* (TRACY, 2006). O mecanismo de ação da cloroquina consiste no seu acúmulo no vacúolo digestivo do *Plasmodium*, prevenindo a polimerização do heme, altamente tóxico ao parasito, e a formação da hemozoína (KAUR et al., 2010). Dessa forma, a capacidade da molécula em se acumular no interior de compartimentos ácidos é essencial para a sua habilidade de inibir o crescimento deste microrganismo. O tratamento com a cloroquina é economicamente acessível, o medicamento é amplamente disponível, bem tolerado e apresenta mecanismo de ação rápido. Devido a estas características, o uso da cloroquina foi indiscriminado no passado, resultando em resistência parasitária e dificuldade no uso deste medicamento para o tratamento da malária nos dias atuais.

A cloroquina é uma molécula lipofílica que atravessa facilmente a membrana plasmática por difusão. Quando administrada por via oral, a molécula é rapidamente absorvida e apresenta biodisponibilidade de 75-80%. Devido às suas características físico-químicas, a cloroquina é amplamente distribuída e acumulada nos tecidos, com tempo de meia-vida de 3-6 dias em humanos (COOPER, 2008). A capacidade da molécula de se acumular em compartimentos ácidos de forma não seletiva, seguindo o gradiente de prótons, contribui para o elevado volume de distribuição (160-800 L/kg) do medicamento. Portanto, os efeitos adversos associados ao uso da cloroquina em altas doses, como toxicidade ocular, podem ser em consequência de tais propriedades farmacocinéticas da molécula, devido à alta concentração do fármaco nos tecidos, durante um longo período. Dessa forma, tornou-se evidente a necessidade de alterar as propriedades farmacocinéticas da cloroquina, reduzindo o tempo de meia-vida do medicamento, mas mantendo sua propriedade de se acumular em compartimentos com pH reduzido, já que este mecanismo é imprescindível para sua atividade anti-*Plasmodium*. Foi nesse contexto que o derivado hidroxilado da cloroquina, a hidroxicloroquina, é sintetizada. Esta molécula é metabolizada mais rapidamente do que a cloroquina, sem alteração significativa na atividade antimalárica (O'NEILL et al., 1998). Portanto, esta modificação estrutural na molécula da cloroquina teve como objetivo alterar as propriedades farmacocinéticas da mesma e representou uma forma de aumentar o índice terapêutico deste medicamento.

O mecanismo de ação destas 4-aminoquinolinas sugere, juntamente com evidências da sua ação terapêutica, de que estas moléculas são efetivas no tratamento de infecções causadas por microrganismos intracelulares capazes de multiplicar em vacúolos acidificados, como

bactérias e fungos (ROLAIN et al., 2007). Neste contexto, estudos anteriores já demonstraram que o tratamento com cloroquina inibiu a multiplicação de *Legionella pneumophila* em células mononucleares infectadas (BYRD et al., 1991), assim como o crescimento de *Francisella tularensis* em macrófagos infectados (FORTIER et al., 1995), através do mecanismo de redução da disponibilidade de íons ferro para o microrganismo. Associado a isto, sabe-se que a aquisição de íons ferro é de extrema importância para a manutenção da viabilidade da *Leishmania* e para a sua multiplicação no interior do vacúolo parasitóforo (HUYNH et al., 2006). Assim, a cloroquina e a hidroxicloroquina podem representar uma nova estratégia para o tratamento da leishmaniose, como demonstrado por estudos clínicos no Paquistão em que a cloroquina foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea após a administração intralesional (NOOR et al., 2005) ou oral (KHAN et al., 2007).

Diante desta abordagem, torna-se evidente que estas 4-aminoquinolinas podem representar uma fonte promissora de fármacos para o tratamento da leishmaniose. Portanto, o conceito de reposicionamento de medicamentos, abordado anteriormente, aplica-se a cloroquina e a hidroxicloroquina e motiva a avaliação da sua atividade anti-leishmania em diferentes espécies do parasito.

2.5 Mefloquina

A mefloquina é classificada como uma 4-quinolina metanólica, sintetizada durante a busca de moléculas para o tratamento da malária causada por cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes aos medicamentos convencionais. Atualmente, este fármaco é recomendado exclusivamente para a profilaxia e quimioterapia oral da malária causada por *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina ou multirresistente. O mecanismo de ação da mefloquina ainda não está totalmente elucidado. Assim como outras quinolinas, a mefloquina interfere na aquisição de nutrientes pelo *Plasmodium*. A mefloquina é capaz de aumentar o pH intravacuolar do parasito, em baixa concentração, e inibir a formação do pigmento malárico (TRACY, 2006). Diferente da cloroquina, a mefloquina não é uma molécula dibásica, dessa forma a sua capacidade de atingir altas concentrações em compartimentos ácidos nas células é reduzida. Estima-se que esta concentração seja aproximadamente 80 vezes a concentração da molécula no meio extracelular. A mefloquina apresenta características farmacocinéticas importantes e que devem ser consideradas no tratamento de infecções por microrganismos intracelulares, como tempo de meia-vida prolongada e ampla distribuição tecidual (BERMUDEZ et al., 1999).

Os estudos da atividade anti-leishmania da mefloquina mostraram que este fármaco antimalárico foi eficaz no tratamento de indivíduos infectados com *Leishmania guyanensis* no Equador (LANDIRES et al., 1995). Entretanto, um desfecho clínico oposto foi observado após o uso deste fármaco no tratamento de indivíduos com leishmaniose cutânea em área endêmica de *L. braziliensis* (LAGUNA-TORRES et al., 1999). Em modelo experimental de leishmaniose cutânea utilizando a infecção de camundongos C57BL/6 com *Leishmania amazonensis*, o tratamento oral com mefloquina apresentou atividade moderada (GALVÃO et al., 2000). Portanto, observa-se uma variação nestes resultados envolvendo o tratamento com a mefloquina, que podem ser conseqüência da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, assim como na utilização de um determinado modelo experimental e metodologia de tratamento.

Diante do exposto, a mefloquina pode ser um fármaco útil para o tratamento da leishmaniose. Assim como para a cloroquina, o reposicionamento da mefloquina pode representar uma fonte promissora para o tratamento de outras doenças, incluindo a infecção por *Leishmania*.

3. JUSTIFICATIVA

A LT constitui um grave problema de saúde pública atingindo, principalmente, indivíduos em idade economicamente ativa em países tropicais e subtropicais. Além disso, a doença merece atenção devido à sua magnitude e ao risco de desenvolvimento de deformações (WHO, 2003; BRASIL, 2007).

O tratamento de primeira escolha para a LT está associado a efeitos adversos graves (OLIVEIRA et al., 2010), alto custo para o sistema público de saúde e, mais recentemente, ao desenvolvimento de resistência do parasito em algumas localidades do mundo (CROFT et al., 2006). Diante desta problemática, torna-se primordial a busca por novas moléculas bioativas que possam ser empregadas no tratamento da LT. Além disso, novas alternativas ao tratamento convencional devem ter um melhor perfil de eficácia e segurança do que a quimioterapia convencional, além de ser de fácil administração e custo-efetiva para o sistema público de saúde.

A LT está contida no grupo de doenças de pouco interesse de financiamento de estudos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos por parte da indústria farmacêutica, as chamadas doenças infecciosas negligenciadas. Sabe-se que os estudos envolvidos neste campo de pesquisa estão associados a um longo período de estudos que

demanda investimentos exorbitantes e ainda está associado ao risco de que uma pequena porcentagem das moléculas em análise chegue ao mercado (16%) (KATIN, 2010). Dessa forma, a maior parte da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o controle destas doenças torna-se restrita a centros acadêmicos de pesquisas e laboratórios públicos de saúde (PADHY, 2011).

Baseado neste cenário e na necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de tais doenças, como a LT, o reposicionamento de medicamentos surge como uma alternativa promissora. Esta estratégia apresenta a vantagem de reduzir, significativamente, o tempo e o gasto associado aos estudos de fase clínica, visto que já estão disponibilizadas as características toxicológicas e farmacocinéticas dos medicamentos analisados (ASHBURN, 2004). Uma das estratégias utilizadas para o reposicionamento de fármacos é baseada no mecanismo de ação do composto e nas propriedades da molécula estudada, que podem ser úteis para o objetivo do tratamento proposto. Dessa forma, sabe-se que os fármacos da classe dos antimaláricos são moléculas que apresentam mecanismos de ação variados, bem como características farmacocinéticas que podem ser úteis para o tratamento de outras doenças causadas por microrganismos intracelulares. Os variados mecanismos de ação destas moléculas incluem a indução de estresse oxidativo, no caso da artemisinina e seus derivados, e a inibição da formação de hemozoína, etapa fundamental para a sobrevivência do *Plasmodium* no interior na hemácia, no caso da cloroquina. Este último mecanismo de ação é baseado na capacidade de moléculas da classe das 4-aminoquinolinas acumularem-se em compartimentos intracelulares ácidos, como o vacúolo digestivo no *Plasmodium* (TRACY, 2006). Este mesmo mecanismo também pode ser útil para conter a multiplicação e a viabilidade de parasitos do gênero *Leishmania* que são capazes de se multiplicar dentro do vacúolo parasitóforo que também constitui um microambiente propício para o acúmulo destas moléculas (ANTOINE et al., 1998). Além disso, os medicamentos da classe dos antimaláricos são seguros quando administrados em doses terapêuticas, apresentam biodisponibilidade pela via oral, são baratos e, em relação às espécies que causam LTA, existe um número limitado de estudos envolvendo estes fármacos.

Com base na necessidade de novos medicamentos para o tratamento da LT, no alto custo associado à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, no baixo investimento da indústria farmacêutica neste campo de pesquisa associado às doenças tropicais negligenciadas e na existência de mecanismos de ação que podem ser úteis para o tratamento da LT, um estudo com o objetivo de avaliar uma possível atividade antileishmania de moléculas representantes da classe de antimaláricos torna-se relevante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania de fármacos antimaláricos *in vitro* e em modelo murino de leishmaniose tegumentar causada por *L. amazonensis*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antileishmania de fármacos antimaláricos em promastigotas de *L. amazonensis* e determinar o valor da concentração inibitória para 50% da população de parasitos (IC₅₀ PRO);
- Avaliar o mecanismo de morte celular em promastigotas de *L. amazonensis*
- Avaliar a citotoxicidade dos fármacos antimaláricos *in vitro* e determinar a concentração letal para 50% da população celular (LC₅₀);
- Avaliar a atividade dos fármacos antimaláricos durante a infecção de macrófagos *in vitro* por *L. amazonensis* e determinar o valor da concentração inibitória para 50% da população de amastigotas (IC₅₀ AMA);
- Avaliar as alterações ultra-estruturais dos parasitos após o tratamento com os fármacos antimaláricos ativos nos experimentos de infecção *in vitro* por *L. amazonensis* e
- Avaliar a atividade do(s) fármaco(s) antimalárico(s) mais potente(s) em modelo murino de leishmaniose tegumentar causada por *L. amazonensis*;

MANUSCRITO

O manuscrito apresentado a seguir, no capítulo 1 desta dissertação, engloba todos os resultados obtidos durante o Mestrado, em cumprimento dos objetivos propostos.

Este manuscrito encontra-se submetido na revista Acta Tropica.

Título: *Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis*

Autores: Vinícius Pinto Costa Rocha, Fabiana Regina Nonato, Elisalva Teixeira Guimarães, e Milena Botelho Pereira Soares.

5. CAPÍTULO 1

Manuscrito

Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis

Vinícius Pinto Costa Rocha¹, Fabiana Regina Nonato¹, Elisalva Teixeira Guimarães^{1,2},

Milena Botelho Pereira Soares^{1,3*}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, CEP 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil.

²Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Rua Silveira Martins, 2555, CEP: 41.150-000 Salvador, Bahia, Brazil.

³Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Av. São Rafael 2152, CEP 41253-190 Salvador, Bahia, Brazil.

*Corresponding author. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121 - Candeal - Salvador, BA, Brazil. 40296-710.

Phone: 55-71-3176-2260; FAX: 55-71-3176-2272

E-mail: milena@bahia.fiocruz.br

Abstract

The current treatments of cutaneous leishmaniasis are associated with several side effects, high cost and resistance of *Leishmania* parasites. Thus, it is pivotal the development of more effective therapy against the disease. In this work we evaluated the antileishmanial activity of five antimalarial drugs against promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis*. The antileishmanial activity of antimalarial drugs was evaluated in promastigotes and amastigotes. For the *in vivo* studies, CBA mice were infected with *L. amazonensis* in the ear dermis and treated by oral and/or topical routes with active antimalarial drugs. Mefloquine was the only effective drug against promastigotes in axenic cultures and showed an IC₅₀ value of $8.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$. In addition, mefloquine, chloroquine and hydroxychloroquine were active against intracellular amastigotes in macrophage-infected cultures. These drugs presented IC₅₀ concentrations of $1.56 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $0.78 \pm 0.08 \mu\text{M}$ and $0.67 \pm 0.12 \mu\text{M}$, respectively. The ultrastructural analysis of chloroquine or mefloquine-treated amastigotes showed an accumulation of multivesicular bodies in the cytoplasm of the parasite, suggesting the impairment of endocytic pathway in amastigote, in addition to the formation of myelin-like figures and enlargement of Golgi cisternae. Treatment of *L. amazonensis*-infected mice with chloroquine by oral route caused a reduction of lesion size, associated with a decrease in the parasitism in the ear, as well as the parasite burden in the draining lymph nodes. Treatment with mefloquine also decreased the lesion size in infected mice, although this was not associated with a reduction in parasite burden. Our data revealed a promising antileishmanial effect of chloroquine in a murine model of cutaneous leishmaniasis. These results reinforce the use of chloroquine as a therapy against this disease.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, antimalarial drugs, cutaneous leishmaniasis, therapy.

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis is a disease complex caused by protozoan parasites belong to the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of the female sandfly vector. Several *Leishmania* species are responsible for the wide spectrum of clinical manifestations of cutaneous leishmaniasis including the mild cutaneous form (localized cutaneous leishmaniasis), multiple non-ulcerative nodules (diffuse cutaneous leishmaniasis) and the disfiguring mucosal form (muco-cutaneous leishmaniasis) (Kaye and Scott, 2011; Reithinger et al., 2007; Murray et al., 2005). Currently, the disease is present in 82 countries in tropical and subtropical regions affecting more than 10 million people, with significant social burden due its deformities and disfiguring scars (WHO, 2007).

The first-line drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis are the pentavalent antimonials. The two main antimonials under clinical use are N-methyl-D-Glucamine and sodium stibogluconate (Frézard et al., 2009). Although the pentavalent antimonials represent the first-line treatment against all forms of leishmaniasis, this treatment can be complicated by less sensitivity or resistance of some *Leishmania* species, variations in pharmacokinetics and drug-host immune response interaction (Croft et al., 2006), as well as difficult to administration by parenteral route. In addition, antimonials present several side effects, including pain at the injection site, myalgia, anorexia, cardiotoxicity, hepatic and renal insufficiency, requiring long-term treatments and increase of cost therapy (Oliveira et al., 2011).

Thus, it is pivotal development of a safer, cheaper and more effective therapy against leishmaniasis. In this context, drug repositioning is a strategy to identify and develop new uses for existing drugs, reducing expenditures and research time (Ashburn and Thor, 2004). Antimalarial drugs may represent a promising source of new molecules with antileishmanial activity. Some of these drugs have pharmacokinetic profiles that are important for the treatment of intracellular pathogens which multiply within acidified vacuoles. Moreover these drugs are cheap, well tolerated and have oral bioavailability (Rolain et al., 2007; Bermudez et al., 1999). Previous studies have showed the effect of these drugs against *Leishmania* parasite *in vitro*, in murine models of disease using different parasite species and in cutaneous leishmaniasis in humans, as in Ecuador (Landires et al., 1995) and Pakistan (Noor, et al., 2005; Khan et al., 2007).

The present study was undertaken to evaluate the activity of antimalarial drugs, *in vitro* and in murine model of cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. To accomplish this goal, five antimalarial drugs (artesunate, chloroquine, hydroxychloroquine,

mefloquine and primaquine) were selected, and their antileishmanial activity was evaluated against axenic promastigotes, intracellular amastigotes of *L. amazonensis* and in a cutaneous leishmaniasis mouse model caused by *L. amazonensis* infection.

2. Material and Methods

2.1. Drugs

The antileishmanial activity of five antimalarial drugs was analyzed in this study. Artesunate, chloroquine, mefloquine and primaquine were obtained from Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. Hydroxychloroquine was obtained from Galena/Química Farmacêutica Ltda (SP, Brazil). All antimalarial drugs were diluted in saline, with the exception of the artesunate, which was diluted in 100% DMSO. Amphotericin (Gibco Laboratories, Gaithersburg MD) was used as a positive control.

2.2. Mice

Male or female, 4 to 8 week old CBA, C57BL/6 and BALB/c mice were obtained from the Animal Facilities of Gonçalo Moniz Research Center-FIOCRUZ. Animals were housed in temperature-controlled rooms (22-25°C) under a 12:12 hour light-dark cycle and provided with rodent diet and water *ad libitum*. Animals were handled according to the NIH guidelines for animal experimentation. All procedures described here had prior approval from the local animal ethics committee.

2.3. Parasites

L. amazonensis (MHOM/BR88/BA-125) were periodically obtained from popliteal lymph node of resistant C57BL/6 mice (Pereira and Alves, 2008) and cultivated in Novy-Nicolle-MacNeal (NNN) containing Schneider's insect medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, Gaithersburg MD) and 50 µg/mL gentamicin (Hipolabor, Belo Horizonte, Brazil). The isolated cells were incubated at 24° C. The obtained promastigotes were transferred to Schneider's insect medium and cultivated during 3-5 days, until stationary growth phase.

2.4. Axenic culture of *L. amazonensis* promastigotes and treatment with antimalarial drugs

Promastigotes of *L. amazonensis* in stationary phase of growth were plated in 96-well plate at a density of 2×10^6 parasites/mL in 200 µL of Schneider's insect medium, in the absence or presence of the drugs at concentrations ranging from 0.6 to 50 µM. The parasite

number was evaluated using a Neubauer chamber, every 24 hours, during 3 days. At this point the percentage of parasite growth inhibition related to control was used to calculate the concentration of antimalarial drugs necessary to reduce the parasite growth by 50% (IC₅₀). The IC₅₀ was accessed through concentration logarithm values followed by nonlinear regression curve fit.

2.5. Analysis of cell death mechanism in promastigotes

Stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes were cultivated at 2x10⁶/mL in complete Schneider's medium and incubated at 24° C in the presence of antimalarial(s) drug(s) at the IC₅₀ concentration, during 24, 48 or 72 hours. The exposed phosphatidylserine on the outer membrane and plasma membrane integrity of promastigotes were assessed using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining (Biosources, Camarillo, CA). Preparation of samples was performed according to the manufacturer's instruction. A 10,000 events/sample were acquired using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using the Cell Quest Software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

2.6. Cytotoxicity assays

The lethal concentration for 50% of cells (LC₅₀) of the antimalarial drugs was determined in cultures of spleen cells obtained from BALB/c mice, according to the methodology described previously by Sá et al. (2009). Briefly, the drugs were tested at five concentrations ranging from 3.7 to 300 µM, in triplicate. One µCi/well of [methyl-³H]-thymidine (Perkin Elmer, Waltham, MA) was added to the cultures which were incubated during 24 hours at 37° C 5% CO₂. After this period, plates were harvested using a cell harvester (MPXRI 96TI; Brandel, Gaithersburg, MD) to determine the ³H-thymidine incorporation using a β-radiation counter (Multilabel Reader; Hidex, Turku, Finland). The viability of the cells was determined by ³H-thymidine incorporation and the cytotoxicity was calculated in relation to the ³H-thymidine incorporation of untreated cultures through concentration logarithm values, followed by nonlinear regression curve fit.

The macrophage viability was accessed using the Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad CA) assay, according to the manufacture's recommendations. The cells were treated with selected antimalarial drugs during 24 hours. After this time the Alamar Blue was added (20 µL/well) and macrophages were incubated at the same conditions during 24 hours. Colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm.

2.7. In vitro macrophage infection and treatment with antimalarial drugs

Macrophages from the peritoneal exudate were collected from CBA mice four days after injection of 3% thioglycolate medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The macrophage cultures were performed as described by Gomes et al. (2003) using 2×10^5 cells/mL in 24-well plates containing 13 mm-diameter glass coverslips. Peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes in stationary growth phase at a ratio of 10:1 during 6 hours at 37° C in 5% CO₂. Each well was then washed with saline to remove non-internalized parasites. Infected macrophages were treated with the drugs in a maximum concentration of 5 µM, during 24 and 48 hours. In another set of experiments, macrophages were infected for 6 hours and left untreated during 48 hours to allow the differentiation of parasites into amastigotes and their replication (Chaves et al., 2009). The macrophage cultures were then treated with the selected drugs at different concentrations, to access their IC₅₀ values. At the end of each treatment the cells were fixed with ethanol and stained with conventional hematoxylin and eosin. The selective index (SI) was defined as the ratio between LC₅₀ and IC₅₀ (Bézivin et al., 2003). In addition, some wells were washed with sterile saline and incubated with Schneider's insect medium at 24° C. Intracellular survival and viability of *L. amazonensis* was measured by counting motile promastigotes after 96 hours of culture.

2.8. Transmission electron microscopy

Peritoneal macrophages obtained from CBA mice were infected with *L. amazonensis*, as described above, and treated after amastigote differentiation with the selected antimalarial drugs. Infected macrophages were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde, 2% formaldehyde and 2.5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2, followed by a post-fixation in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer and dehydration in gradient of acetone. Finally the material was embedded in Polybed resin, thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEM 1320 transmission electron microscope (JEOL, Akishima, Japan).

2.9. In vivo infection with *L. amazonensis*

CBA mice, 4 to 6 week-old, female, were infected into the right ear dermis with $5 \times 10^5/10$ µl saline of *L. amazonensis* promastigotes in stationary growth phase. After one week of infection, mice were treated daily with the most potent drugs through oral, topical or combined administration route during four weeks. The ointment was formulated in commercially available Cold Cream and the topical treatment was performed by spreading the

ointment in the infected ear. The ear swelling was monitored weekly using a digital caliper (Mitutoyo, Yokohama, Japan) and was determined by difference between thickness of the infected and contra-lateral uninfected ear. The control groups received saline and base ointment formulation.

2.10. Parasite quantification

The parasite number in the draining lymph nodes was estimated by limiting dilution assay, as described previously by Guimarães et al. (2006), with some modifications. Briefly, the right auricular lymph node were removed and used to prepare a cell suspension in ice-cold saline solution. The cells were plated in Schneider's insect medium at a density of 5×10^5 cells/well in 24-well cell culture plate. The suspension was then serially diluted in 10-fold dilutions and distributed in 96-well culture plates. After 7 to 10 days of incubation at 24° C the wells were examined in an inverted microscope to evaluate the presence or absence of promastigote form. Results were expressed as -log of the highest cell suspension dilution with wells positive for *Leishmania* promastigotes.

2.11. Histopathologic and immunohistochemistry evaluation

Infected ears of CBA mice were removed after 5 weeks of infection and fixed in 10% formaldehyde. After 12-24 hours of fixation, tissue slices were embedded in paraffin. Sections 3-5 µm thick were stained with conventional hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy. To demonstrate the presence of parasites at the site of infection, we performed an immunostaining for *L. amazonensis* in 3-5 µm thick sections obtained from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue, according to Guimarães et al. (2006). Briefly, the sections were incubated with a rabbit polyclonal antibody against *Leishmania*. The primary antibody was detected using a biotinylated goat anti-rabbit antibody (American Qualex, San Clemente, CA) and streptavidin-conjugated peroxidase was used for secondary antibody detection. The reaction was revealed using 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in PBS. Tissue sections were then counterstained with Harris's hematoxylin and examined under light microscopy.

2.12. Statistical analyses

According to normality analysis (Kolmogorov-Smirnov), differences of means between groups were analyzed using either One-way analysis of variance or two-way

ANOVA, when one variable were evaluated or two independents variables were evaluated at the same time, followed by Bonferroni's multiple comparison test. Unpaired Student's *t* test was used to compare the means between only two groups. For non-parametric data, Mann Whitney test was used. All analyzes were performed using Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Data were presented as mean \pm SEM and statistical difference were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Activity of antimalarial drugs against axenic promastigotes of *L. amazonensis*

The activity of the antimalarial drugs was first evaluated against axenic promastigotes of *L. amazonensis*, in order to determine the kinetics of treatment and the IC₅₀ concentration of these molecules. Artesunate, chloroquine, hidroxichloroquine, mefloquine and primaquine were tested in five different concentrations, ranging between 0.6 to 50 μ M, during 72 hours. Chloroquine and hydroxychloroquine did not affect significantly the parasite growth even at 50 μ M (Fig. 1A and B). At this concentration, artesunate and primaquine significantly affected the parasite growth, but the inhibition was less than 50% (Fig. 1C and D). Mefloquine at 50 μ M, as well as amphotericin B (tested at 1 μ M), inhibited completely *Leishmania* growth compared to untreated controls (Fig. 1E and F, respectively). After 72 hours, mefloquine inhibited the promastigote growth with an IC₅₀ of 8.4 ± 0.7 μ M. However, this molecule was less potent than amphotericin B, which presented an IC₅₀ of 0.13 ± 0.01 μ M (Table 1). The treatment with mefloquine at the IC₅₀ concentration induced a cell death by impairment of plasma membrane integrity, as demonstrated by PI staining and analysis by flow cytometry (Sup. Fig. 1).

3.2. Effects of antimalarial drugs in *in vitro* macrophage infection with *L. amazonensis*

To test the effects of the antimalarial drugs in *L. amazonensis* infection, we first determined the cytotoxicity of the five compounds to mammalian cells. Artesunate, chloroquine, hydroxychloroquine, mefloquine and primaquine were tested in splenocyte cultures, in five different concentrations. All molecules tested presented lower cytotoxicity compared to gentian violet, a standard cytotoxic drug. Primaquine was the molecule with lowest cytotoxicity, while artesunate was the most toxic to splenocytes (Table 1).

The antileishmanial activity of the antimalarial drugs was then evaluated in *L. amazonensis*-infected peritoneal macrophages. Chloroquine and mefloquine significantly reduced the percentage of infected cells and the number of parasites 24 hours after treatment

(* $p < 0.0001$, Fig. 2A and B). When cultures incubated for 48 hours with the drugs were evaluated, we observed that treatment with chloroquine reduced the parasitism in 86.8%, while mefloquine had similar antileishmanial activity than amphotericin B (95% reduction of parasite numbers). At this time of treatment, hydroxychloroquine also reduced significantly the percentage of infected cells and parasitism, as well as artesunate and primaquine (* $p < 0.0001$, Fig. 2C and D). In cultures incubated for 96 hours with the drugs, we did not find a statistically significant difference between the activity of chloroquine and amphotericin B, whereas hydroxychloroquine inhibited the parasitism in 68.7% (Sup. Fig. 2). Based on these results, chloroquine, hydroxychloroquine and mefloquine were selected for following experiments.

To validate the activity of selected drugs against intracellular parasites, *L. amazonensis*-infected macrophages were incubated during 48 hours for complete amastigote differentiation and to allow parasite replication, followed by treatment with the antimalarial drugs during additional 48 hours. Treatment, chloroquine, hydroxychloroquine and mefloquine at 5 μM reduced the number of infected macrophages in 53%, 43% and 58%, respectively, (Fig. 3A). In addition, chloroquine and mefloquine decreased the parasite burden in 75% and 77%, while hydroxychloroquine was less effective, reducing 59% the number of amastigotes when compared to untreated controls (Fig. 3B). Amphotericin B reduced almost completely both parameters (Fig. 3A and B). The viability of the macrophages was confirmed by Alamar Blue metabolism after 48 hours of treatment (data not shown). Chloroquine reduced significantly the parasite burden at a concentration as low as 0.06 μM (* $p < 0.001$), while lowest active concentration of hydroxychloroquine and mefloquine tested was 0.56 μM (* $p < 0.001$, Fig. 3C). Based on the concentration-response curve, the IC_{50} concentration was calculated. Chloroquine and hydroxychloroquine showed the same activity, while mefloquine was less potent than these drugs. Amphotericin B, however, was more potent than the antimalarial drugs analyzed (Table 1).

To validate the effects of the antimalarial drugs on the survival of *Leishmania amazonensis*, the viability of the parasite was evaluated by transformation of intracellular amastigotes to promastigotes after changing the culture conditions. As expected, there were significantly less promastigotes in wells from infected macrophages treated with chloroquine and mefloquine when compared to the control group (* $p < 0.0001$). However, the remaining parasites were viable and proliferated proliferate (Fig. 3D).

3.3. Ultrastructural analysis of amastigotes treated with chloroquine and mefloquine.

The ultrastructural analysis of differentiated intracellular amastigotes treated with chloroquine or mefloquine was performed. As showed in Fig. 4A, the untreated-amastigotes had organelles with normal morphology and an organized cytoplasm. Treatment of *L. amazonensis*-infected cells with chloroquine caused an accumulation of multivesicular bodies in the parasite cytoplasm, a complete disorganization of parasite structure and disruption of the plasma membrane (Fig. 4B and C, respectively). Moreover, mefloquine was able to induce the formation of myelin-like figures and enlargement of Golgi cisternae, as well as the accumulation of multivesicular bodies (Fig. 4D, E and F).

3.4. Efficacy of antimalarial drugs in the treatment of CBA mice infected with *L. amazonensis*

CBA mice were infected in the right ear dermis with 5×10^5 promastigotes of *L. amazonensis* in stationary phase of growth, and after one week of infection, the animals were treated daily with chloroquine or mefloquine through oral and/or topical routes. The lesion development was monitored during five weeks. Four weeks after treatment, the group treated with chloroquine by oral route had lesions significantly smaller than animals treated by topical route, as well as than vehicle-treated mice ($*p < 0.01$, Fig. 5A). The parasite burden in the draining lymph node of mice orally treated with chloroquine with or without topical treatment were lower than that of control group ($*p = 0.01$, Fig. 5B). Moreover, oral chloroquine treatment was able to reduce lesion inflammation and intracellular parasite number in the infected ear, while vehicle-treated infected lesions had an extensive collection of vacuolated and heavily parasitized macrophages, as demonstrated by histopathologic analysis (Fig. 6A and B) and immunostaining (Fig. 6C and D). Regardless the route of administration, mefloquine-treated mice also had significantly smaller lesions than vehicle-treated mice ($*p < 0.01$, Fig. 5C). However, the parasite burden in the draining lymph nodes (Fig. 5D), as well as the parasitism in the infected ear (data not shown), did not differ from that of the control group.

4. Discussion

In this work we tested the drug repositioning strategy to evaluate the antileishmanial activity of five drugs currently used in the treatment of *Plasmodium spp.* infection. Five antimalarial drugs were tested against *L. amazonensis*, a parasite species that causes localized and diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World (Kaye, 2011).

According to the present study, artesunate was not capable of reducing the promastigote growth in axenic cultures, and presented a reduced activity against the intracellular form of the parasite. In a previous report, the antileishmanial activity of artesunate was demonstrated against *L. major* in an experimental model of cutaneous leishmaniasis (Yang and Liew, 1993). The difference between these results may be related to the susceptibility of the different species of parasite to the compound tested.

Primaquine also showed a reduced activity against promastigotes and intracellular *L. amazonensis*. A previous work showed the moderate activity of primaquine against intracellular *L. donovani* in an *in vitro* model of infection, unless loaded in nanocapsules (Heurtault et al., 2001).

Chloroquine and its derivative compound, hydroxychloroquine, had a significant activity against *L. amazonensis* amastigotes, despite their reduced effect against *L. amazonensis* promastigotes. On the other hand, mefloquine completely inhibited the growth of promastigotes, inducing cell death by affecting the plasma membrane integrity, as well as being active in infected macrophages. It is noteworthy that these quinoline molecules were more active against intracellular parasites than promastigotes. This may be explained by the fact that these molecules are able to accumulate in high concentrations within acidic compartments like the parasitophorous vacuoles (O'Neill et al., 1998). In addition, the modification of the physico-chemical properties of the acidic compartments, such as the increase of pH caused by chloroquine, may decrease the acquisition of iron ions and other nutrients (Taylor and Kelly, 2010), consequently inhibiting amastigote proliferation (Huynh et al., 2006). In this context, a previous work reported the pharmacological activity of chloroquine against intracellular microorganisms, such as bacteria and fungi, by affecting nutrient acquisition (Byrd and Horwitz, 1991; Fortier et al., 1995).

The ultrastructural analysis of amastigotes treated with chloroquine and mefloquine suggests an impairment of endocytic pathway, as showed by the accumulation of multivesicular bodies and alterations in Golgi complex. The endocytic pathway of amastigotes is related with parasite escape from the host cell immune response (De Souza Leão et al., 1995; Antoine et al., 1999), as well as with acquisition of macromolecules through the flagellar pocket (Borges et al., 1998). Moreover, the acidic profile of endocytic vesicles may be important to accumulate chloroquine and mefloquine molecules due to their lysosomotropic characteristic (Ghedini et al., 2001). The fact that chloroquine is able to inhibit nitric oxide (NO) production by macrophages and its NO-dependent antimicrobial functions (Hrabák et al., 1998), as well as the release of tumour necrosis factor- α (TNF- α) by

monocytic cells (Jang et al., 2006), favors the mechanism of drug action mentioned above rather than one based on cell activation. Further studies are necessary to evaluate if the impairment of macromolecules acquisition occur in macrophages infected with *L. amazonensis* after chloroquine or mefloquine treatment.

Chloroquine treatment by oral route showed a promising pharmacological effect in *L. amazonensis*-infected animals. In addition to reduce the lesion size, related with intense parasite multiplication in the infected ear, the treatment decreased the parasitism in the draining lymph nodes of CBA mice. This murine model of cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis* infection mimics some of the characteristics of the human infection (Awasthi et al., 2004). The antiinflammatory features of chloroquine, such as decreased TNF production (Jang et al., 2006) may be important to reduce tissue damage in cutaneous leishmaniasis lesions (De Oliveira Cardoso et al., 2010; Faria et al., 2005). Moreover, previous reports have suggested a large spectrum of action of chloroquine in infectious diseases (Rolain et al., 2007), including the efficacy of its oral and intralesional treatments in human cutaneous leishmaniasis (Khan et al., 2007; Noor et al., 2005).

In our study, treatment with mefloquine was not associated with a reduction of parasite burden in the draining lymph nodes, despite the reduction of the lesion size. Mefloquine also has a large spectrum of action against other parasite infection besides malaria, such as alveolar echinococcosis (Küster et al., 2011) and human schistosomiasis (Keiser et al., 2011; Ingram et al., 2012). However, the pharmacological effect of mefloquine in *Leishmania* infection remains controversial. According to Galvão et al. (2000) and Laguna-Torres et al. (1999), oral treatment with mefloquine had a limited therapeutic effect in C57BL/6 mice infected with *L. amazonensis*, as well as in the treatment of human cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*, respectively. On the other hand, Landires et al (1995) reported a promising therapeutic effect of mefloquine in human cutaneous leishmaniasis caused by *L. panamensis*. The positive results reported by Landires et al (1995) during infection by *L. panamensis* may be due the species of parasite involved in the infection, known to be related to better outcomes after treatment (Laguna-Torres et al., 1999). Moreover, the genetic and biological diversity of the parasites involved in such studies may contribute to differences observed (Smith et al., 2007).

Based on the results presented here, chloroquine showed a promising pharmacological effect for the treatment of cutaneous leishmaniasis. In addition, chloroquine has low toxicity and cost, and present bioavailability by oral route, making its use easier in endemic areas and improving patient compliance to the treatment. Chloroquine may also be used in combined

therapy with conventional first or second-line antileishmanial drugs, aiming reduction of dose, side effects and time of treatment. The investigation of the mechanism involved in the effect observed in this work will improve the understanding of the chloroquine action on the *Leishmania* parasites. This study may help the development of new therapies of leishmaniasis based on the use of chloroquine alone or as combined therapy.

Acknowledgements

V.P.C.R, F.R.N, E.T.G and M.B.P.S thank Dr. Hayne Felipe da Silva from Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos/Fiocruz, for providing the antimalarial drugs. This work was supported by FAPESB, FIOCRUZ and CNPq.

References

- Antoine, J.C., Lang, T., Prina, E., Courret, N., Hellio, R., 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J. Cell. Sci.* 112, 2559-2570.
- Ashburn, T.T., Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 673-683.
- Awasthi, A., Mathur, R.K., Saha, B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 119, 238-258.
- Bermudez, L. E., Kolonoski, P., Wu, M., Aralar, P. A., Inderlied, C. B., Young, L. S., 1999. Mefloquine is active in vitro and in vivo against Mycobacterium avium complex. [Antimicrob. Agents. Chemother.](#) 43, 1870-1874.
- Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le Dévéhat F., Boustie, J., 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.* 10, 499-503.
- Borges, V.M., Vannier-Santos, M.A., De Souza, W., 1998. Subverted transferrin trafficking in *Leishmania*-infected macrophages. *Parasitol. Res.* 84, 811-822.
- Byrd, T.F., Horwitz, M.A., 1991. Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. A potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J. Clin. Invest.* 88, 351-357.
- Chaves, S.P., Torres-Santos, E.C., Marques, C., Figliuolo, V.R., Persechini, P.M., Coutinho-Silva, R., Rossi-Bergmann, B., 2009. Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes. Infect.* 11, 842-849.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111-126.
- De Oliveira Cardoso, F., de Souza, C.S., Mendes, V.G., Abreu-Silva, A.L., Gonçalves da Costa, S.C., Calabrese, K.S., 2010. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J. Infect. Dis.* 201, 1933-1940.

De Souza Leão, S., Tang, T., Prina, E., Hellio, R., Antoine, J.C., 1995.

Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell. Sci.* 108, 3219-3231.

Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa, J. Jr., Schriefer, A., Machado, P.R., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., Dutra, W.O., 2005. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73, 7853-7859.

Fortier, A. H., Leiby, D. A., Narayanan, R. B., Asafodjei, E., Crawford, R. M., Nacy, C. A., Meltzer, M. S., 1995. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect. Immun.* 63, 1478-1483.

Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R.R., 2009. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*.14, 2317-2336.

Galvão, L.O., Moreira Júnior, S., Medeiros Júnior, P., Lemos, G. J., Cunha, N.F., Antonio, R. M., Santos Filho, B.S., Magalhães, A.V., 2000. Therapeutic trial in experimental tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A comparative study between mefloquine and aminosidine. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 377-382.

Ghedini, E., Debrabant, A., Engel, J.C., Dwyer, D.M., 2001. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic*. 2, 175-188.

Gomes, I.N., Calabrich, A.F., Tavares, R.S., Wietzerbin, J., de Freitas, L.A., Veras, P.S., 2003. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microb. Infect.* 5, 251 – 260.

Guimarães, E.T., Santos, L.A., Ribeiro dos Santos, R., Teixeira, M.M., dos Santos, W.L. C., Soares, M.B.P., 2006. The role of interleukin-4 and prostaglandin E₂ in *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 8, 1219-1226.

Heurtalt, B., Legrand, P., Mosqueira, V., Devissaguet, J.P., Barrat, G., Bories, C., 2001. The antileishmanial properties of surface-modified, primaquine-loaded nanocapsules tested

- against intramacrophagic *Leishmania donovani* amastigotes *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95, 529-533.
- Hrabák, A., Sefrioui, H., Vercruyse, V., Temesi, A., Bajor, T., Vray, B., 1998. Action of chloroquine on nitric oxide production and parasite killing by macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 83-90.
- Huynh, C., Sacks, D.L., Andrews, N.W., 2006. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J. Exp. Med.* 203, 2363-2375.
- Ingram, K., Ellis, W., Keiser, J., 2012. Antischistosomal activities of mefloquine-related arylmethanols. [Antimicrob. Agents Chemother.](#) 56, 3207-3215.
- Jang, C.H., Choi, J.H., Byun, M.S. Jue, D.M., 2006. Chloroquine inhibits production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology.* 45, 703-710.
- Kaye, P., Scott, P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604-615.
- Keiser, J., Manneck, T., Vargas, M., 2011. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1791-1797.
- Khan, I., Yasmin, R., Sidiki, I., 2007. Chloroquine in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists.* 17, 95-100.
- Küster, T., Stadelmann, B., Hermann, C., Scholl, S., Keiser, J., Hemphill, A., *In vitro* and *in vivo* efficacies of mefloquine-based treatment against alveolar echinococcosis. 2011. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 713-721.
- Laguna-Torres, V.A., Silva, C.A., Correia, D., Carvalho, E.M., Magalhães, A.V., Macedo, V.O., 1999. Mefloquine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 529-532.
- Landires, E.A.G., Andrial, M., Hosokawa, A., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 1995. Oral treatment of new world cutaneous leishmaniasis with anti-malarial drugs in Ecuador: a preliminary clinical trial. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 151-157.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saraiva, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366, 1561-1577.

- Nandim, A., Edrissian, Gh., Seyedi-Rashti, A., 1972. Treatment of urban cutaneous leishmaniasis in Iran with cycloguanil pamoate. *Acta Med. Iranica*. 15, 125-130.
- Noor, S.M., Khan, M.M., Hussain, D., 2005. Intralesional chloroquine in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*. 15, 18 -21.
- Oliveira, L.F., Schubach, A.O., Martins, M.M., Passos, S.L., Oliveira, R.V., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. *Acta Top*. 118, 87-96.
- O'Neil, P.M., Bray, P.G., Hawley, S.R., Ward, S.A., Park, B.K., 1998. 4-aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. *Pharmacol. Ther.* 77, 29-58.
- Pereira B.A., Alves C.R., 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet. Parasitol.* 158, 239-255.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet. Infect. Dis.* 7, 581-596.
- Rolain, J.M., Colson, P., Raoult, D., 2007. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 30, 297-308.
- Sá, M.S., Costa, J.F., Krettli, A.U., Zalis, M.G., Maia, G.L., Sette, I.M., Câmara, C.A., Filho, J.M., Giulietti-Harley, A.M., Ribeiro Dos Santos, R., Soares, M.B., 2009. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol. Res.* 105, 275-279.
- Smith, D.F., Peacock, C.S., Cruz A.K., 2007. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37, 1173–1186.
- Taylor, M.C., Kelly, J.M., 2010 Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology*. 137, 899-917.
- WHO, 2007. Informal consultative meeting for the control of cutaneous leishmaniasis in the Middle East and Maghreb. Cutaneous leishmaniasis: why you neglecting me? World Health Organ.
- Yang, D.M., Liew, F.Y., 1993. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 106, 7-11.

List of Figures and Tables

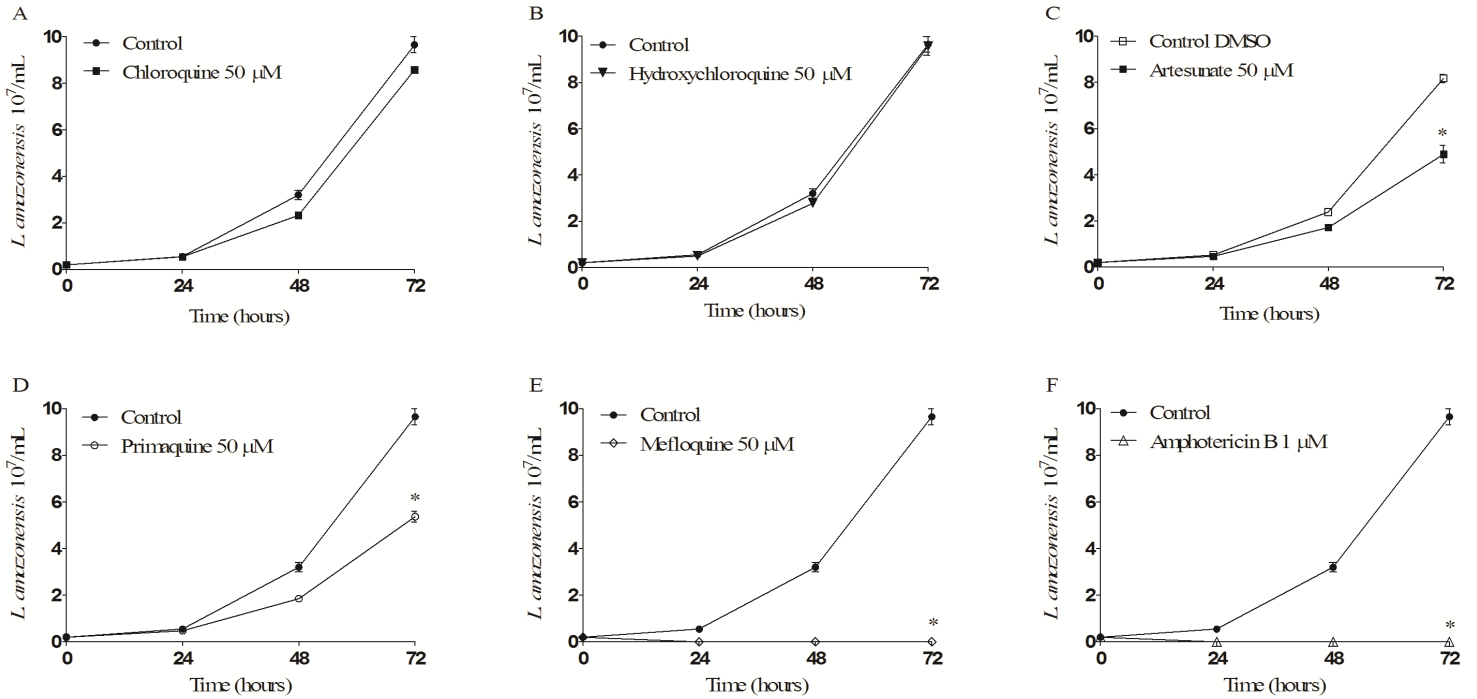


Fig. 1. Effects of antimalarial drugs on the growth of *L. amazonensis* axenic promastigotes. The parasites ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were cultivated in Schneider's medium with antimalarial drugs at a maximum concentration of 50 μM (A-E) or amphotericin B at a maximum concentration of 1 μM (F). The kinetics of growth was accessed by counting in Neubauer chamber every 24 hours. Results shown are means \pm SEM of sextuplicate, and represents one experiment of three performed. * $p < 0.0001$ compared to control group, unpaired Student's *t* test.

Table 1IC₅₀, LC₅₀ and selective index (SI) values of antimalarial drugs

Antimalarial drug	<i>L. amazonensis</i>		Splenocytes	SI
	Promastigotes	Amastigotes		
	IC ₅₀ (μM)			
Artesunate	> 50 ^a		17.10 ± 5.08	
Chloroquine	> 50 ^a	0.78 ± 0.08 [*]	22.24 ± 7.19	28.51
Hydroxychloroquine	> 50 ^a	0.67 ± 0.12 [*]	41.84 ± 12.43	62.45
Mefloquine	8.4 ± 0.7 [*]	1.56 ± 0.19 [*]	21.11 ± 1.12	13.53
Primaquine	> 50 ^a		115.75 ± 9.08	
Gentian Violet			0.28 ± 0.005	
Amphotericin B	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.02	37.15 ± 0.85	412.80

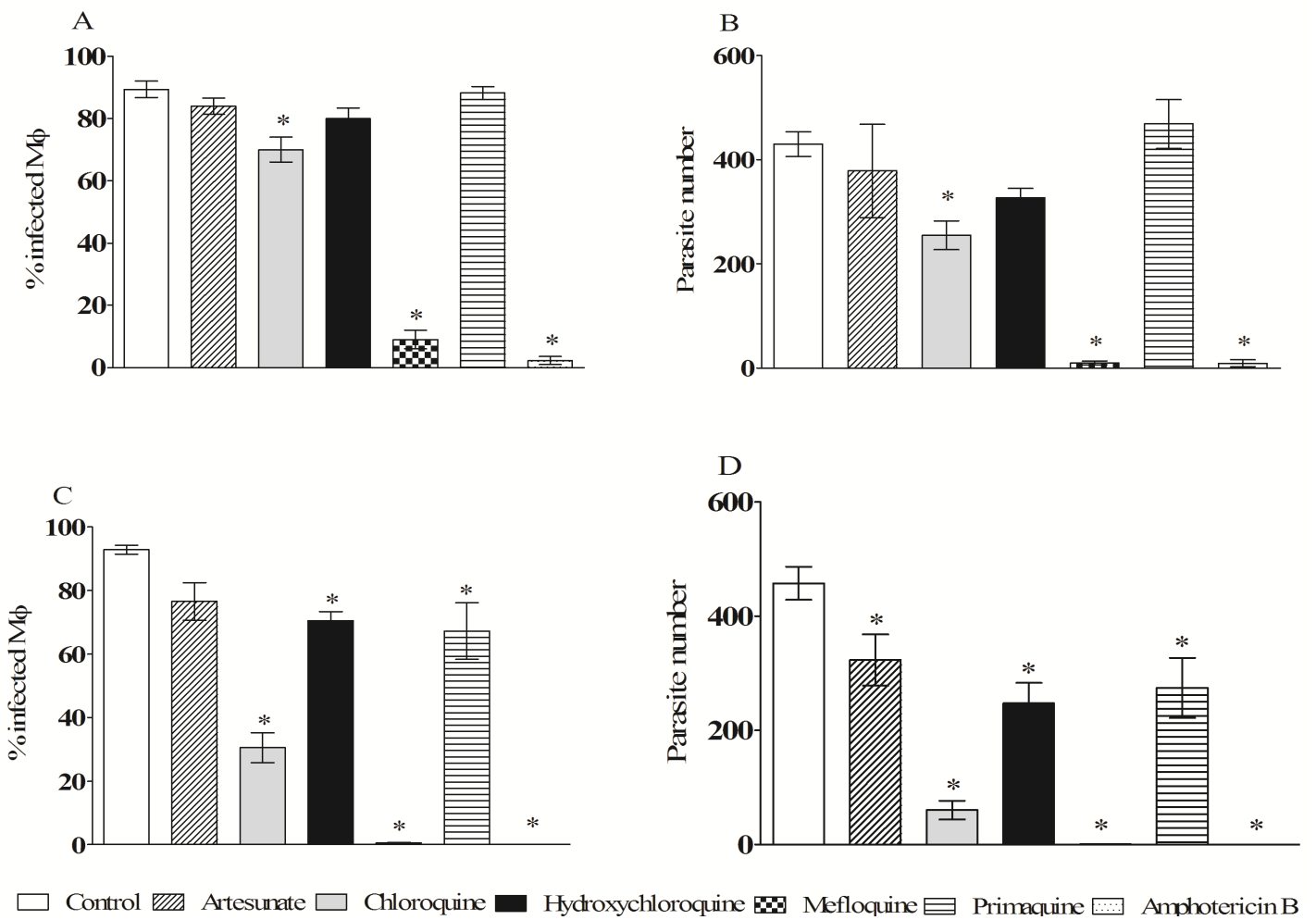


Fig. 2. Screening of antimalarial drugs against intracellular *Leishmania* parasites. Macrophages from peritoneal exudate were collected from CBA mice and infected with *L. amazonensis* promastigotes in the stationary phase of growth. The macrophages were treated with antimalarial drugs or amphotericin B at 5 μ M and the percentage of infected cells (A and C) and the parasitism (C and D) were measured 24 (A and B) and 48 (C and D) hours after treatment by counting of 100 macrophages. Results shown are means \pm SEM of triplicate, and represents one experiment of three performed. * $p < 0.0001$, compared to control group, by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test.

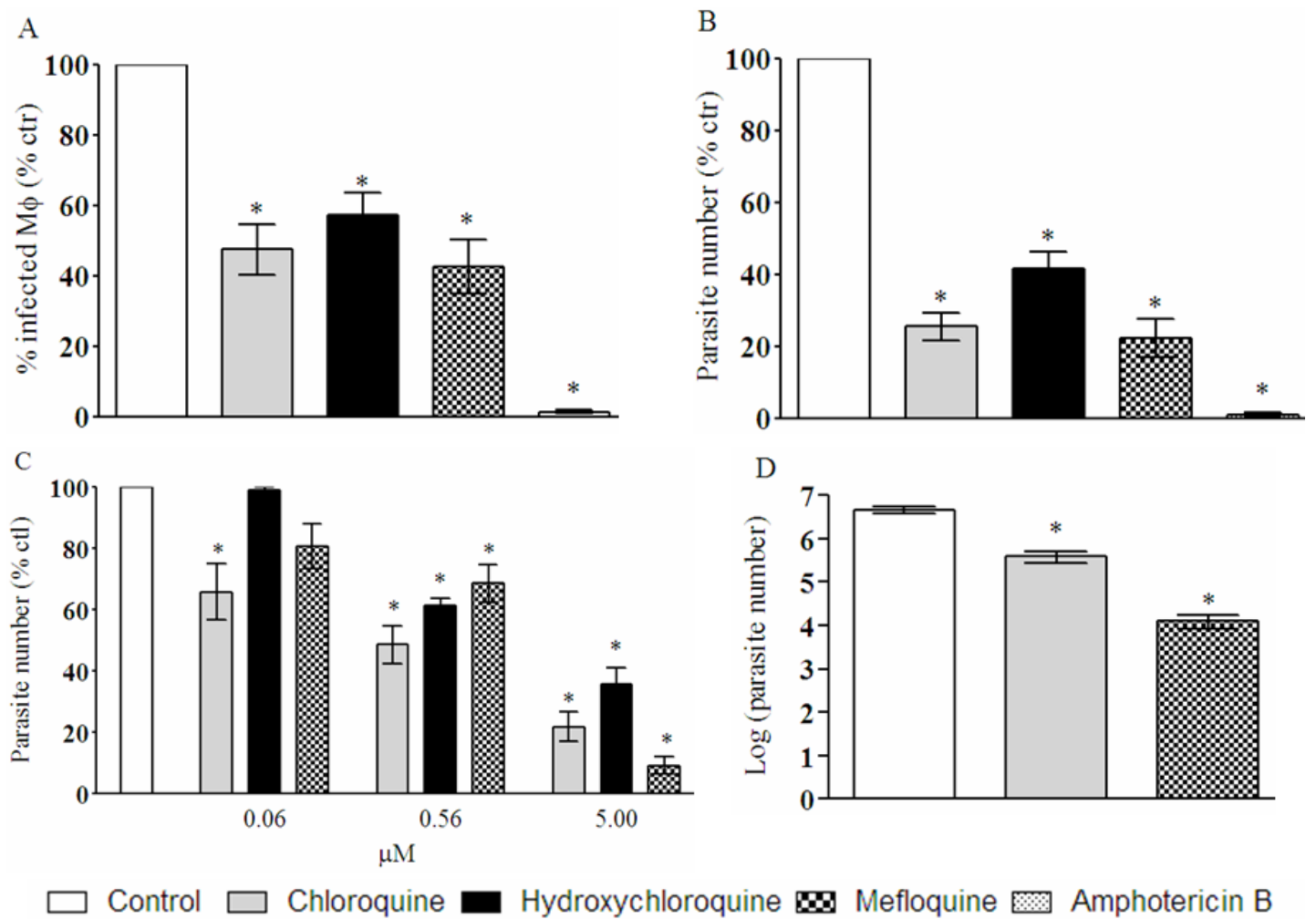


Fig. 3. Effects of antimalarial drugs against amastigotes of *L. amazonensis*. Macrophages from peritoneal exudate were collected from CBA mice and infected with *L. amazonensis* promastigotes in stationary phase of grown. The cells were incubated during 48 hours without treatment for amastigote differentiation and parasite replication. After this period, the macrophages were treated with selected antimalarial drugs at 5 μM or lower concentrations for 48 hours. Amphotericin B was used as a positive control at 5 μM . (A) Percentage of infected cells was evaluated by counting of 100 cells. Control group was considered 100% ($86.17 \pm 1.24\%$). (B) Parasite number was evaluated by counting of 100 cells. Control group was considered 100% (624.67 ± 65.18 amastigotes/100 macrophages). (C) Concentration-response curve. The number of amastigotes was evaluated as describe above in each concentration after treatment of infected macrophages. Control group was considered 100% (817.83 ± 52.31 amastigotes/100 macrophages). * $p < 0.0001$, repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Results shown are the means \pm SEM of the percentages related to control of three experiments performed in triplicate. (D) Parasite

viability was evaluated by transformation of amastigotes in motile promastigotes after medium changed. * $p < 0.0001$, One-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test. Results shown are the means \pm SEM of sextuplicate, and represent one of two experiments performed.

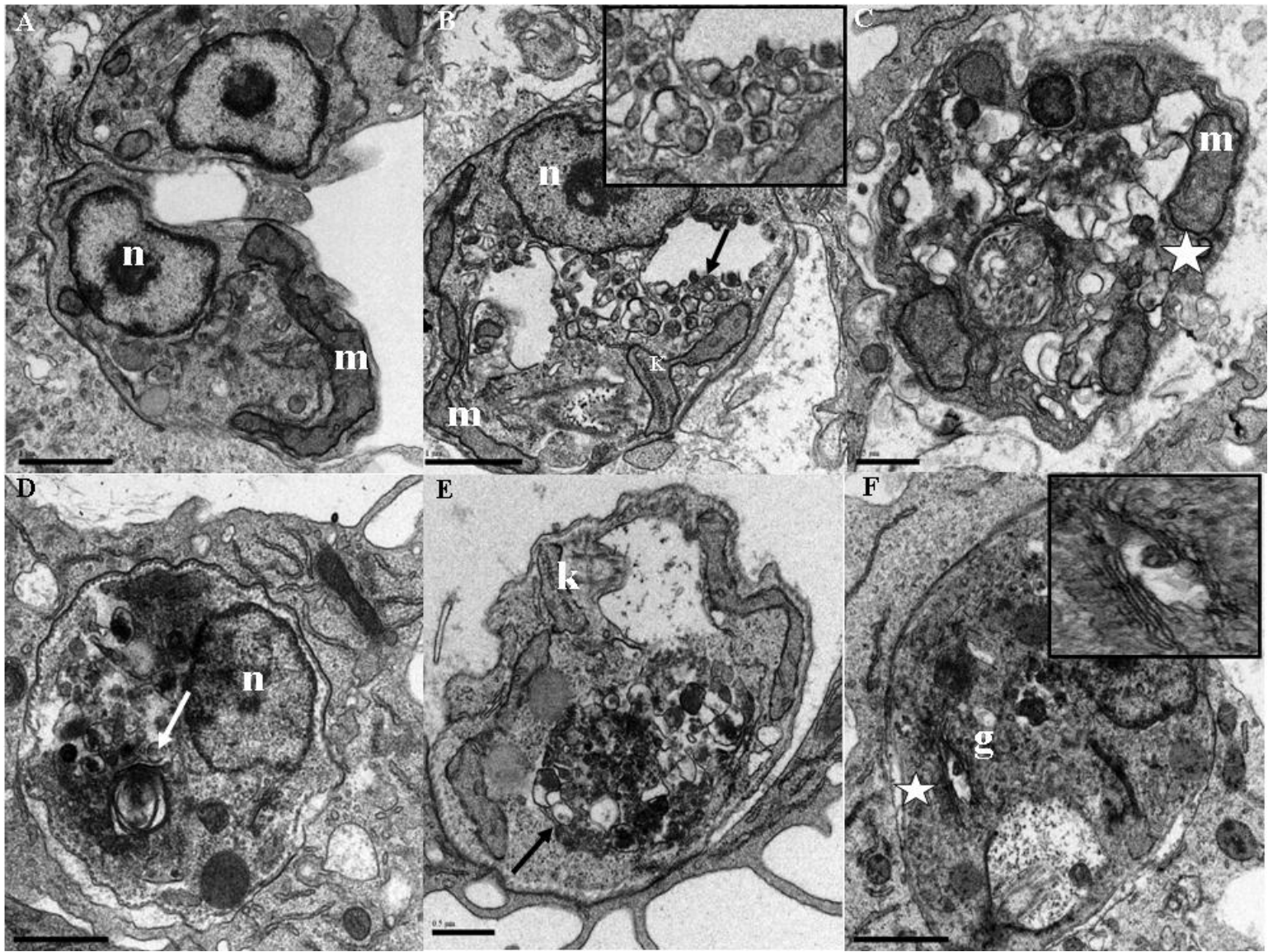


Fig. 4. Transmission electron microscopy images of amastigotes of *L. amazonensis* after treatment with chloroquine or mefloquine at 5 μ M for 48 hours. (A) Untreated intracellular parasite displaying organelles with normal morphology and an organized cytoplasm. (B and C) Parasites treated with chloroquine presents multivesicular bodies in the cytoplasm (arrow and insert), complete disorganization of cellular structure and disruption of plasma membrane (star). (D, E and F) Parasites treated with mefloquine shows myelin-like figures (white arrow), accumulation of multivesicular bodies in the cytoplasm (black arrow) and enlargement of Golgi cisternae (star and insert). **n**, nucleus; **m**, mitochondrion; **k**, kinetoplast; **g**; Golgi.

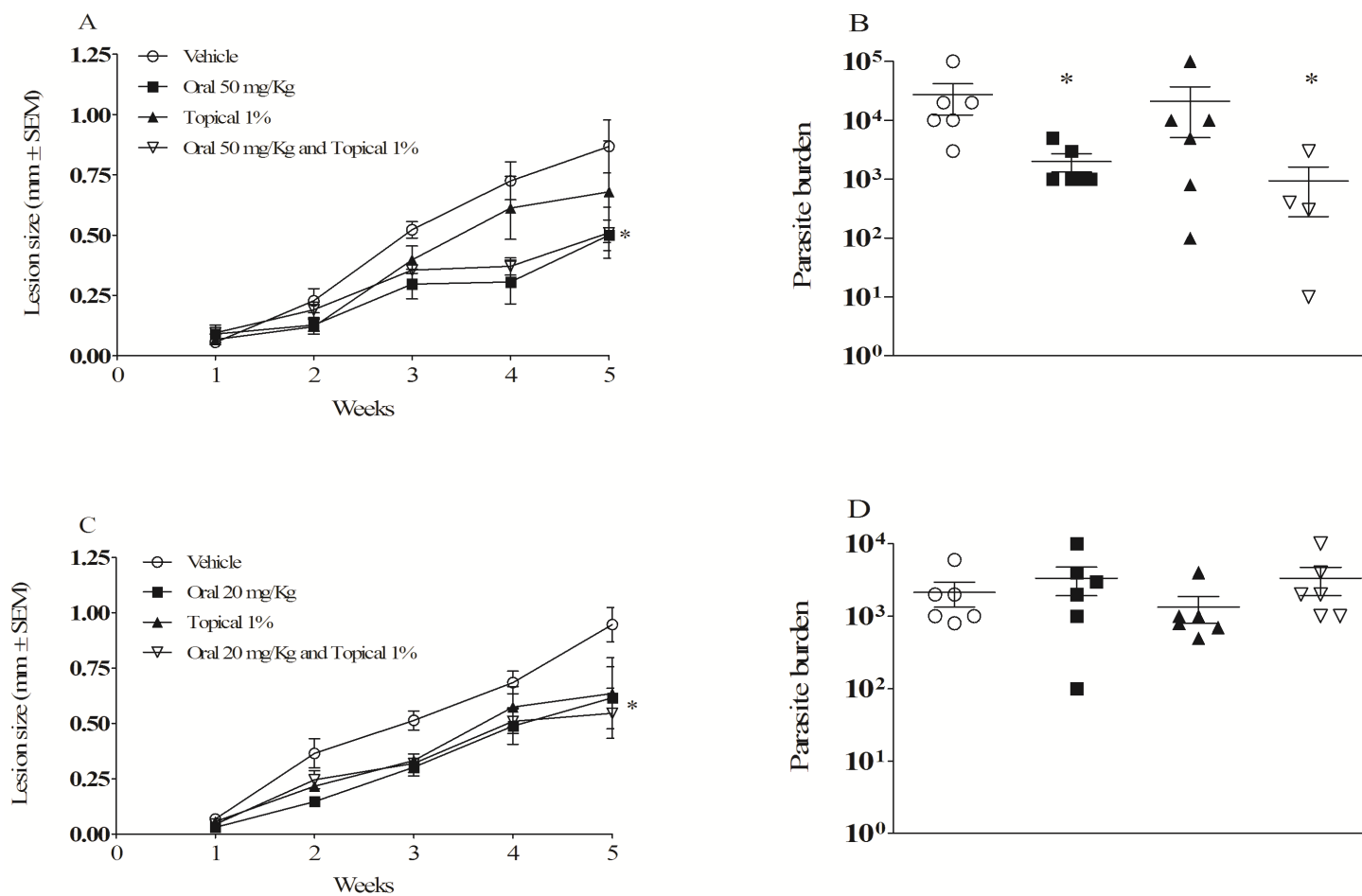


Fig. 5. Pharmacological effect of antimalarial drugs in an experimental model of cutaneous leishmaniasis. CBA mice were infected with 5×10^5 *L. amazonensis* promastigotes and the course of lesion development was monitored during 5 weeks as well as the parasitism in the end of experiment. (A and C) Lesion size expressed as mean \pm SEM of a representative experiment of two performed ($n=6$ per group) after treatment with chloroquine or mefloquine by oral, topical and both routs of administration. $*p < 0.01$, Two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. (B and D) Parasite burden in the draining lymph node after treatment with chloroquine or mefloquine were measured after 5 weeks post-infection via a limiting dilution assay. Data are expressed as mean \pm SEM of a representative experiment of two performed. $*p = 0.01$, Mann Whitney test.

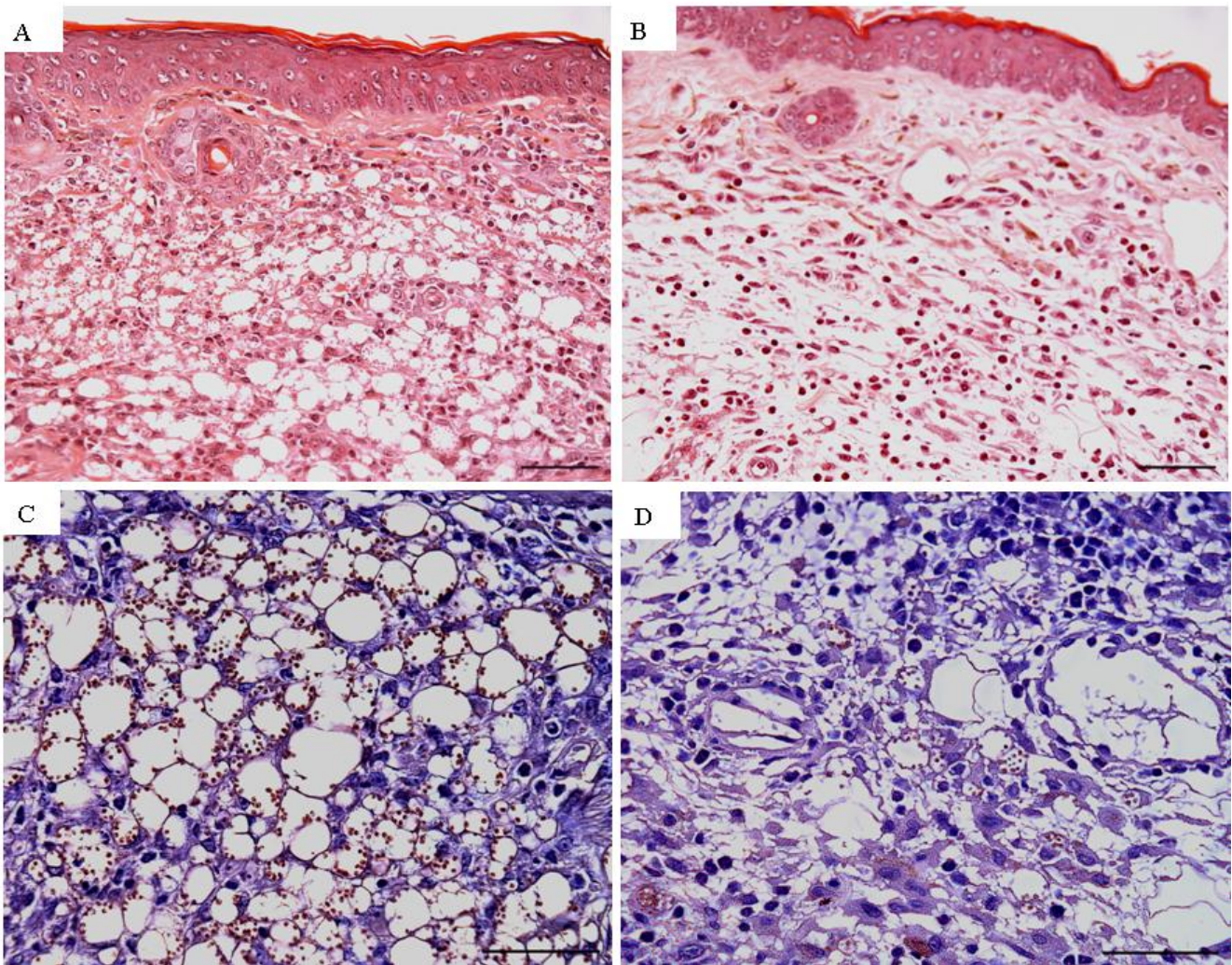
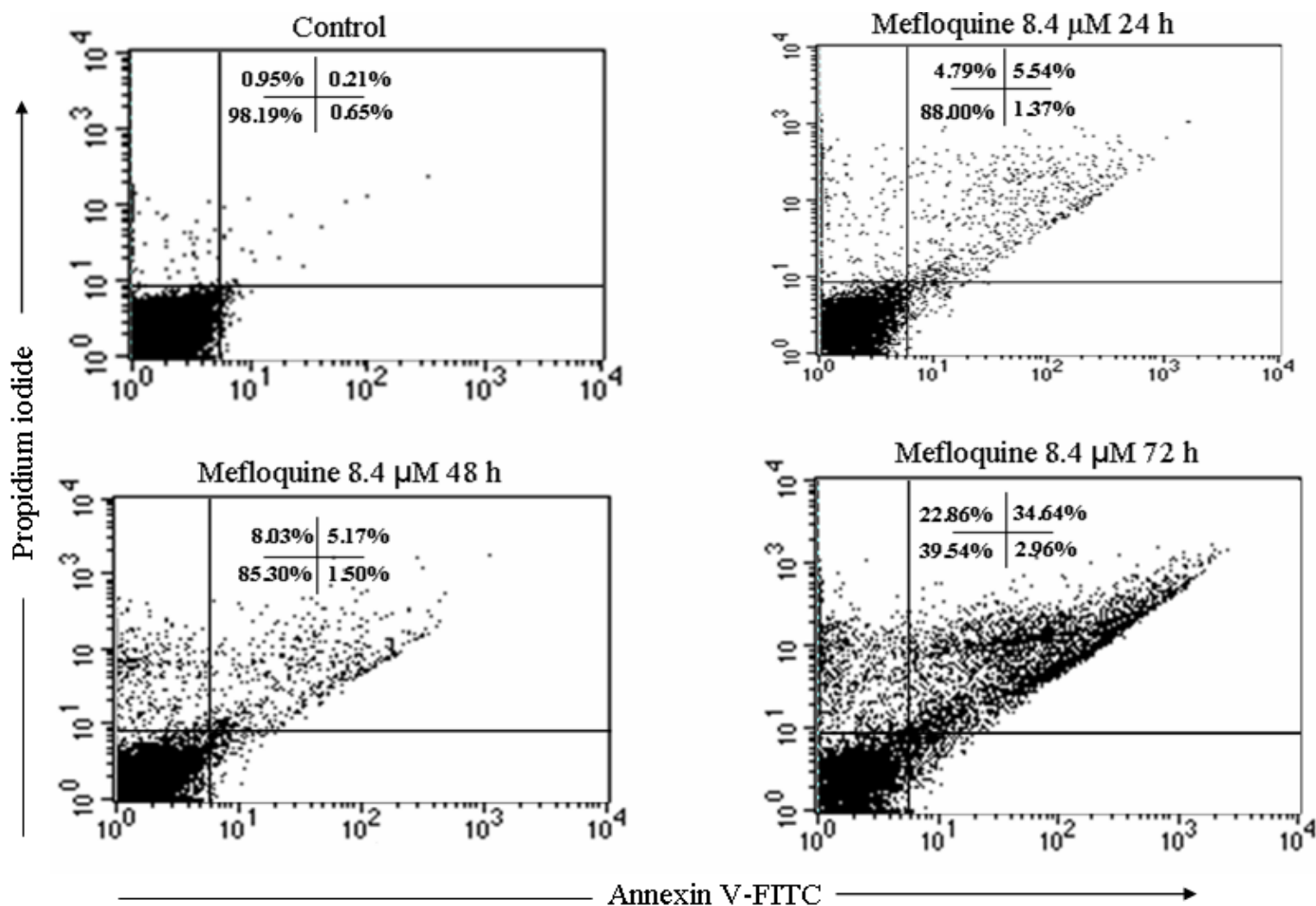
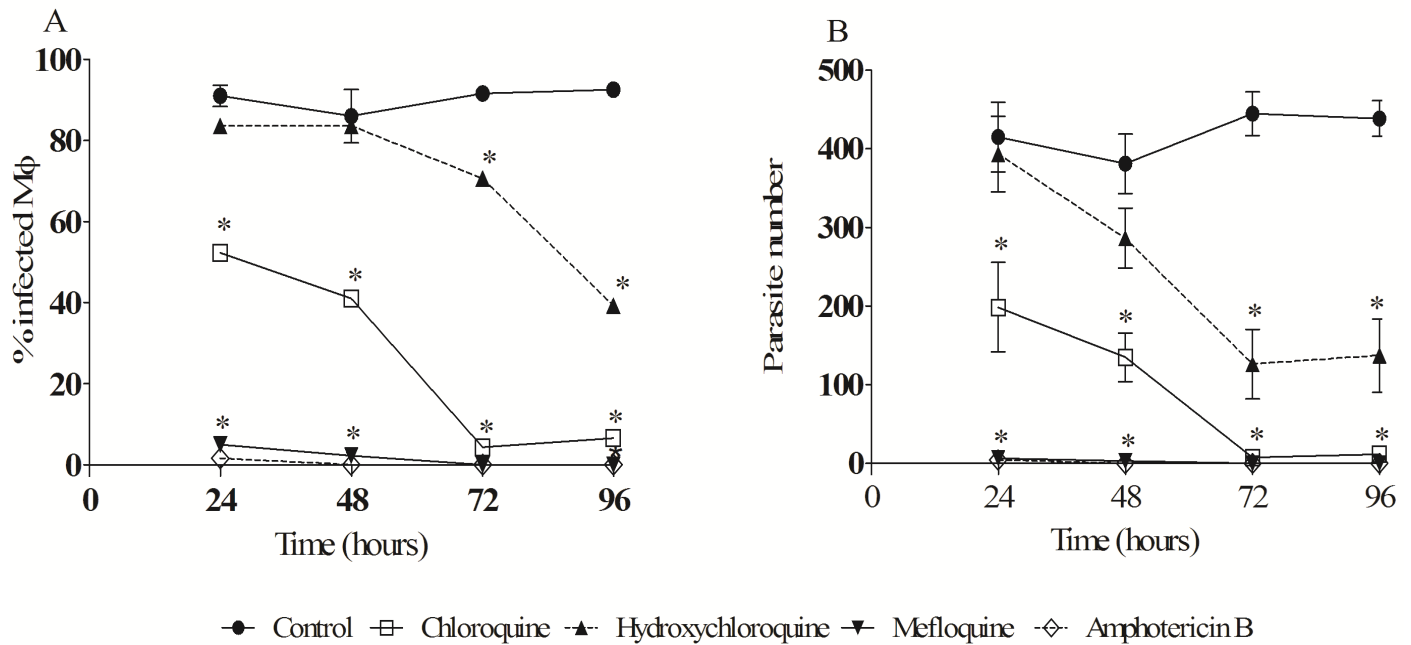


Fig. 6. Histological aspect of CBA mice infected ear after oral treatment with chloroquine. Vehicle-treated mice present an extensive collection of vacuolated and heavily parasitized macrophages, as demonstrated by histological analysis (A) and immunoperoxide staining for *L. amazonensis* amastigotes (C). Chloroquine treated animals by oral route display a reduced number of vacuolated macrophages in the infected ear (B) as well as parasites (D). (A and B) H&E, 40X. (C and D) Immunohistochemistry using a polyclonal anti-*Leishmania* antibody, 60X.



Sup. Fig. 1 . Mechanism of cell death of *L. amazonensis* promastigotes after treatment with mefloquine. Stationary-phase promastigotes were cultured at 2×10^6 /mL and treated with mefloquine at IC_{50} concentration (8.4 μ M) for 24, 48 and 72 hours, and then stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) to evaluate the phosphatidylserine exposure and membrane integrity, respectively. Results are one representative of two experiments performed.



Sup. Fig. 2. Kinetic of infection after treatment of *L. amazonensis*-infected macrophages with antimalarial drugs. Peritoneal macrophages from CBA mice were infected during 6 hours with promastigotes of *L. amazonensis* and treated with antimalarial drugs or amphotericin B at 5 μ M. The cells were fixed at different time points and the percentage of infected macrophages (A) and parasite number (B) were evaluated by counting 100 cells. Results are the means \pm SEM of one experiment of two performed in triplicate. * $p < 0.05$ one-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test.

6. DISCUSSÃO

O tratamento convencional da leishmaniose está associado a efeitos adversos graves, alto custo para o sistema público de saúde e à falha terapêutica. Diante destas dificuldades, é de extrema relevância a busca por novas moléculas farmacologicamente ativas contra as diversas espécies de *Leishmania*. Sabe-se que o desenvolvimento de novos medicamentos é associado a altos investimentos e demanda tempo. Portanto, avaliar novas aplicações terapêuticas para medicamentos já disponíveis no mercado contribui, de forma significativa, para a redução do custo e do tempo destes estudos. Neste trabalho a atividade de moléculas pertencente à classe dos antimaláricos foi avaliada contra *L. amazonensis*, espécie responsável pelo desenvolvimento da leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa.

Entre as moléculas testadas, o artesunato não foi eficaz em inibir o crescimento de formas promastigotas do parasito em cultura axênica e reduziu, de forma moderada, o parasitismo em macrófagos infectados. Estudos anteriores já demonstraram a atividade anti-leishmania do artesunato em modelo experimental de leishmaniose cutânea causada pela infecção com *L. major* (YANG, 1993). A diferença de resultados entre o presente estudo e o trabalho citado mostra a importância da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e a diferença na resposta a um determinado fármaco, o que pode ser um reflexo da diversidade genética e biológica entre as espécies (SMITH et al., 2007). Da mesma forma, a primaquina também não inibiu o crescimento de promastigotas em cultura axênica e apresentou atividade moderada contra a forma intracelular da *L. amazonensis*. A diferença de suscetibilidade entre as espécies também pode ter contribuído para estes resultados.

Diferentemente destes fármacos, a cloroquina, a hidroxicloroquina e a mefloquina apresentaram atividade antileishmania significativa contra amastigotas. Entretanto, os testes em cultura axênica de promastigotas de *L. amazonensis* mostraram que, em altas concentrações (50 μM), a cloroquina e a hidroxicloroquina não apresentaram o mesmo efeito antiparasitário observado quando as células infectadas foram tratadas com estes fármacos em concentração inferior (5 μM). Neste caso, mesmo concentrações dez vezes maiores de cloroquina e hidroxicloroquina mostraram uma eficácia inferior, quando comparada com a atividade observada nas células infectadas. De forma contrária, a mefloquina apresentou atividade contra promastigotas, entretanto apenas em concentração dez vezes superior àquela eficaz no tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Assim, pelo menos três hipóteses podem ser cogitadas para explicar este resultado: as moléculas estão se acumulando nos macrófagos infectados; os fármacos estão sendo metabolizados em

moléculas ativas ou eles estão ativando mecanismos de resposta microbicida capazes de eliminar o parasito. Nesse contexto, moléculas com características lisossomotrópicas, como cloroquina, tem a capacidade de se acumular no meio intracelular atingindo concentrações até 10.000 vezes superiores do que os níveis no meio extracelular (O'NEILL et al., 1998). Além disso, a mefloquina também apresenta a capacidade de se acumular em compartimentos intracelulares ácidos e atingir concentrações de, aproximadamente, 80 vezes a concentração extracelular (BERMUDEZ et al., 1999).

Apesar da atividade anti-leishmania da cloroquina, da hidroxicloroquina e da mefloquina contra amastigotas, a anfotericina B apresentou maior potência do que estes fármacos. A anfotericina B é um macrolídeo poliênico que tem sido utilizado como tratamento de segunda escolha da leishmaniose desde 1960. A alta seletividade deste fármaco justifica-se pelo fato da afinidade da molécula pelo ergosterol, predominante na membrana de microrganismos como a *Leishmania*, em detrimento do colesterol presente em células de mamíferos (CROFT et al., 2006). Entretanto, sabe-se que o uso deste medicamento está associado a efeitos adversos graves, mesmo com o uso da formulação lipossomal (LANIADO-LABORÍN, 2009), e à crescente falha terapêutica, como consequência do desenvolvimento de resistência parasitária.

O modelo *in vitro* utilizado para avaliar o potencial das moléculas testadas foi a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos CBA. Este modelo é caracterizado pela suscetibilidade a infecção por *L. amazonensis*, já que o parasito resiste e inibe os mecanismos antiparasitários da célula hospedeira (GOMES et al., 2003). De acordo com Gomes et al. (2003), quando infectados *in vitro* por esta espécie de *Leishmania* tais macrófagos apresentam a produção de peróxido de hidrogênio reduzida, assim como os níveis de mRNA para TNF- α , quando comparada com a produção desta mesma célula durante a infecção por *L. major*. Além disso, durante a infecção por *L. amazonensis* a produção de óxido nítrico por estas células não é suficiente para o controle da infecção.

Utilizando o modelo de infecção *in vitro* citado acima, a cloroquina, a hidroxicloroquina e a mefloquina apresentaram atividade contra formas amastigotas do parasito, reduzindo de forma significativa a multiplicação dos mesmos. A análise por microscopia eletrônica de transmissão destes parasitos após o tratamento com a cloroquina e a mefloquina sugere o comprometimento dos mecanismos de endocitose dos mesmos dentro da célula hospedeira. Essa hipótese é baseada na observação do acúmulo de corpos multivesiculares no citoplasma da *Leishmania* (DE SOUZA et al., 2009). Além disso, sabe-se que este parasito utiliza mecanismos de endocitose para escape da resposta imunológica do

hospedeiro através da captação e degradação do MHC classe II (ANTOINE et al., 1999; DE SOUZA LEÃO et al., 1995), assim como para a aquisição de macromoléculas como transferrina (BORGES et al., 1998).

Baseado nos resultados de infecção *in vitro*, a cloroquina e a mefloquina foram selecionadas para o estudo *in vivo*. A cloroquina apresentou eficácia no tratamento de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* após o tratamento oral, reduzindo a lesão na orelha destes animais e a carga parasitária no linfonodo auricular. Durante a infecção de camundongos CBA com esta espécie de *Leishmania* observa-se o desenvolvimento de uma lesão progressiva nos animais infectados. De Souza et al. (2000) demonstraram que estes animais, inicialmente, apresentam uma baixa produção de IFN- γ , que se mantém reduzida durante a infecção, e baixos níveis de IL-4 e IL-10, comparados com a infecção por *L. major*. Ao contrário do IFN- γ , os níveis de IL-4 e IL-10 apresentam a tendência de aumentar em uma fase mais tardia durante a infecção com *L. amazonensis*. Além disso, células de linfonodo destes animais produzem mais NO durante a infecção por *L. amazonensis* em relação à infecção por *L. major*, entretanto esta produção não está relacionada com a resistência a infecção por *L. amazonensis* (DE SOUZA et al., 2000). Em resumo, a infecção experimental de camundongos CBA por *L. amazonensis* constitui um modelo de suscetibilidade capaz de mimetizar características da infecção em humanos (AWASTHI, et al., 2004). A cloroquina é um fármaco que apresenta um amplo espectro de atividade farmacológica (ROLAIN et al., 2007) além da sua atividade contra o *Plasmodium*. Com base nos dados deste estudo é possível sugerir que a cloroquina representa uma molécula útil para o tratamento da LT.

Estudos prévios também mostram o espectro ampliado de atividade farmacológica da mefloquina (KÜSTER et al., 2011; KEISER et al., 2011; INGRAM et al., 2012). Laguna-Torres et al. (1999) demonstraram o efeito limitado do tratamento oral com mefloquina na dose de 16 mg/Kg/dia durante 10 dias no tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*. Os resultados do presente estudo também mostraram que a atividade deste fármaco *in vivo* não foram promissores, apesar do aumento da dose para 20 mg/Kg/dia durante quatro semanas.

Estudos estão sendo realizados com *L. braziliensis*, espécie responsável pela forma cutânea e mucocutânea da LT no Brasil (GUIMARÃES et al., 2005) com o objetivo de avaliar o efeito da terapia com cloroquina em pacientes.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos neste trabalho é possível concluir que, entre os antimaláricos testados, a cloroquina apresentou-se como o fármaco mais promissor sendo capaz de reduzir o parasitismo em camundongos infectados com *L. amazonensis*. Desta forma, este fármaco pode constituir uma alternativa terapêutica ao tratamento convencional da LT. Associado a isso, a estratégia do reposicionamento de medicamentos representa uma estratégia útil com o objetivo de reduzir custo e tempo em estudos posteriores utilizando a cloroquina.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million? **Health Affairs**, v. 25, n. 2, p. 420 – 428, 2006.

ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 10, 1998

ANTOINE, J. C. et al. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2559-2570, 1999.

CHAVARRIA, A. P. et al. Preliminary evaluation of cycloguanil pamoate in dermal leishmaniasis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 194, n. 10, 1142 – 1144, 1965.

ARONSON, N. E. et al. A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 4, n. 3, 2010.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, 2004.

ASSILIAN, A. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 5, 2003.

ASSCHE, T. V. et al. *Leishmania*–macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 337 – 351, 2011.

EVERY, M. A. et al. Structure Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 8.Design, Synthesis, and CoMFA Studies toward the Development of Artemisinin-Based Drugs against Leishmaniasis and Malaria. **Journal of Medical Chemistry**, v. 46, p. 4244 – 4258, 2003.

BASSAMO, S. L.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

BERMUDEZ, L. E. et al. Mefloquine is active *in vitro* and *in vivo* against *Mycobacterium avium* complex. **Anticicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1870 – 1874, 1999.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51-56, 1991.

BLUM, J. et al., Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 158 – 166, 2004.

BORGES, V. M. et al. Subverted transferrin trafficking in *Leishmania*- infected macrophages. **Parasitology Research**, v. 84, p. 811 – 822, 1998.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 1 ed. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**, 2 ed. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2007.

BYRD, T. F. et al. Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 351 – 357, 1991.

CAUCHETIER, E. et al. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 777 – 783, 2000.

CAUCHETIER, E. et al. Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1043- 1051, 2002.

CAUCHETIER, E. et al. Therapeutic evaluation of free and nanocapsule-encapsulated atovaquone in the treatment of murine visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 259 – 268, 2003.

CHAVES, S. P. et al. Modulation of P2X7 purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. **Microbes and infection**, v. 11, p. 842 – 849, 2009.

CHOLLET, C. et al. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 462 – 465, 2008.

CHONG, C. R.; JR. SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, 2007.

COOPER, R. G.; ,MAGWERE, T. Chloroquine: novel uses & manifestations. **Indian Journal of Medicine Research**, v. 127, p. 305 – 316, 2008.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n.1, p. 3 – 17, 2005.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 16-24, 2009.

CROFT, S. L. et al. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 30, p. 827 – 832, 1992.

CROFT, S. L. et al. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111 – 126, 2006.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy- challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, 2011.

DAS, N. K. et al. *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cellular Microbiology**, v. 11, n.1, p. 83 – 94, 2009.

DE SOUZA LEÃO, S. et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 3219-3231, 1995.

DE SOUZA, W. et al. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67-124, 2009

DENTON, H. et al. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemistry**, v. 381, p. 405 – 412, 2004.

DIETIZE, R. et al. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 685 – 689, 2001.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n.1, p. 3 – 11, 2011.

EKINS, S. et al. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected disease. **Drug discovery today**, v. 16, n. 7/8, 2011.

FERREIRA, C. S. et al. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**, v. 16, p. 441 – 446, 2003.

FLOHÈ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnology Advances**, 2011.

FRÉZARD, F. et al. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317 – 2336, 2009.

FORTIER, A. H. et al. Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 4, p. 1478 – 1483, 1195.

GALVÃO, L. O. et al. Therapeutical trial in experimental tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A comparative study between mefloquine and aminosidine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.4, p. 377-382, 2000.

GOMES, I. G. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 251 – 260, 2003.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71 – 80, 2003.

GOTO, H. et al. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v, 8, n. 4, p. 419 – 433, 2010.

GUIMARÃES, L. H. et al. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 66 – 74, 2005.

HEURTALT, B. et al. The antileishmanial properties of surface-modified, primaquine-loaded nanocapsules tested against intramacrophagic *Leishmania donovani* amastigotes *in vitro*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.95, n. 5, p.529 – 533, 2001.

HUYNH, C. et al. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2363 – 2375, 2006.

INGRAM, K. et al. Antischistosomal activities of mefloquine-related arylmethanols. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, 2012.

KAITIN, K. L. Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 87, n.3, p. 356-361, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Review Microbiology**, v. 9, 2011.

KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 45. p. 3245 – 3264, 2010.

KEISER, J. et al. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Shistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1791-1797, 2011.

KHAN, I. et al. Chloroquine in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 17, p. 95 – 100, 2007.

KÜSTER, T. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of mefloquine-based treatment against alveolar echinococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 713-721, 2011.

LAGUNA-TORRES, V. A. et al. Efficacy of mefloquine in the treatment of skin leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n.5, p. 529 -532, 1999.

LANDIRES, E. A. G. et al. Oral treatment of new world cutaneous leishmaniasis with anti-malarial drugs in Ecuador: a preliminary clinical trial. **The american journal of tropical medicine and hygiene**, v. 23, n. 3, p. 151 – 157, 1995.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223 – 227, 2009.

LOBO, I. M. F. et al. Heat therapy for cutaneous leishmaniasis elicits a systemic cytokine response similar to that of antimonial (Glucantime) therapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 642 – 649, 2006.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *leishmania*. In: NEVES, D. P.; MELO A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**, 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41- 46.

MURRAY, H. W.; HAPIPRASHAD, J. Activity of oral atovaquone alone and in combination with antimony in experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 586 – 587, 1996.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, 2005.

NANDIM, et al. Treatment of urban cutaneous leishmaniasis in Iran with cycloguanil pamoate. **Acta Medica Iranica**, v. 15, p. 125 – 130, 1972.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 8088 – 8098, 2009.

NOOR, S. M. et al. Intralesional chloroquine in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v.15, p. 18 – 21, 2005.

OLIVEIRA, L.F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. **Acta Topica**, v. 118, p. 87 – 96, 2011.

O'NEILL, P. M. et al. 4-aminoquinolines-past, present, and future: a chemical perspective. **Pharmacology Therapy**, v. 77, n. 1, p. 29 – 58, 1998.

PADHY, B. M.; GUPTA, Y. K. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal of postgraduate medicine**, v. 57, n. 2, p. 153 – 60, 2011.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, 2010.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970 – 974, 2008.

REITHINGER, R. et al. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1148 – 1155, 2005.

ROLAIN, J. et al. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 297 – 308, 2007.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, 2002.

SALAH, A. B. et al. WR279396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 5, 2009.

SALEN, H. H. et al. The treatment of cutaneous leishmaniasis in Iraq with cycloguanil pamoate. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3, 1969.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1 – 10, 2008.

SEN, R. et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1213 – 1218, 2007.

SEN, R. et al. Iron enhances generation of free radicals by Artemisinin causing a caspase-independent, apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Free Radical Research**, v. 44, n. 11, p. 1289 – 1295, 2010a.

SEN, R. et al. Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 43 – 49, 2010b.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian brazil - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 239 – 251, 2004.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423 – 431, 2009.

TARA, K. J. H. A. et al. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **Amerian Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 1005 – 1011, 2005.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. **Parasitology**, v. 137, p. 899 – 917, 2010.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Jr. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozários: malária In: GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred Goodman; BRUNTON, Laurence L. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. cap. 40.

UNGER, A. et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 4, p. 574-579, 2009.

URBÀ, G. et al. Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, In: *The Cochrane Library*, Issue 1, Art. No. CD004834. DOI: 10.1002/14651858.CD004834.pub2

WASUNNA, M. K. et al. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. **Amerian Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 871 – 876, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues**, FAIRLAMB, A. H.; RIDLEY, R. G.; VIAL, H. J. (Ed.). Geneva: World Health Organization, 2003.

WHO INFORMAL CONSULTATIVE MEETING FOR THE CONTROL OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE MIDDLE EAST AND MAGHREB, 2007. Geneva. **Cutaneous leishmaniasis: why you neglecting me?** Geneva: World Health Organization, 2007.

WHO technical report series: control of the leishmaniasis. Geneva: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Magnitude of the problem.** Geneva, 2011. Disponível em <
http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html >. Acesso em: 22 nov. 2011a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis and HIV coinfection.** Geneva, 2011. Disponível em:
<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html>. Acesso em: 25 nov. 2011b.

WILSON, J. et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 10, 2008.

YANG, D. M.; LIEW, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 106, p. 7 – 11, 1993.

YING, M. A. et al. Activity of dihydroartemisinin against *Leishmania donovani* both *in vitro* and *in vivo*. **Chinese Medical Journal**, v. 117, n. 8, p. 1271 – 1273, 2004.

ZHOU, Y. et al. *Leishmania major* Lmacr2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37445 – 37451, 2004.