

JULIANA QUERO REIMÃO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* E ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* DE BLOQUEADORES DE
CANAL DE CÁLCIO, FURAZOLIDONA E
BUPARVAQUONA: REPOSICIONAMENTO,
ASSOCIAÇÕES DE FÁRMACOS E FORMULAÇÕES
LIPOSSOMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

SÃO PAULO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Reimão, Juliana Quero

Estudo da atividade anti-Leishmania e anti-Trypanosoma cruzi de bloqueadores de canal de cálcio, furazolidona e buparvaquona: reposicionamento, associação de fármacos e formulações lipossomais/ Juliana Quero Reimão - São Paulo, 2012.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

1. Leishmaniose 2. Doença de Chagas 3. Combinação de medicamentos 4. Lipossomos 5. In vitro 6. Modelos animais

SES/CCD/CD-255/11

"Quanto à trypanozomíase americana nada custará erradicá-la das zonas extensas onde é endêmica, uma vez que tudo aqui depende da providência elementar de melhorar a residência humana e não mais consentir que o nosso camponês tenha como abrigo a cabana primitiva, infestada pelo insecto que lhe suga o sangue e lhe injecta o parasito, cabana às vezes imprestável como habitação de suínos e de todo incompatível com a civilização de um povo" (Carlos Chagas, 1934).

Há cerca de 100 anos, na pequenina Lassance, uma série de pessoas humildes participava com Carlos Chagas de sua grande descoberta. Entre estas, a menina Berenice, a primeira paciente tratada por Chagas e uma das primeiras "colaboradoras" do genial cientista.

Ao lembrar este fato, dedico este trabalho a todos os pacientes de Leishmaniose e doença de Chagas espalhados por todo o Brasil.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos aos familiares e amigos que se revelaram ao longo desse tempo. Bem sei que corro o risco de não dar conta deste 'muitíssimo obrigado' como é merecido, porque será difícil exprimir todo meu agradecimento.

Dessa forma, dedico algumas palavras àqueles que fizeram parte desta jornada, direta ou indiretamente ou simplesmente pelo fato de existirem.

Ao meu amigo e orientador, André G. Tempone, por tantos e inesquecíveis diálogos. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese, bem como o imenso carinho. Agradeço pela amizade, apoio e confiança com que me brindou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de doutorado e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de doutorado (nº 2008/11434-3).

Aos Professores Dr. Marcus T. Scotti, Dra. Noemi N. Taniwaki, Dr. Renato A. Mortara e Dra. Vera L. Pereira-Chioccola e ao meu amigo Fábio A. Colombo, pela prestimosa e indispensável colaboração.

Ao Prof. Simon Croft, Karin Seifert e Vanessa Yardley, agradeço profundamente por terem me recebido na Universidade de Londres, tendo-me presenteado com importante colaboração na discussão do trabalho.

Obrigada pela disponibilidade com que me receberam em Londres, aliada à valiosa contribuição de suas observações e sugestões.

Aos meus pais, Luís e Márcia, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de vida e amor incondicional; infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Ao meu marido Ricardo, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta.

Ao meu irmão Pedro, pela torcida e por fazer parte da minha vida.

Às amigas Daniela S. Corrêa, Érika G. Pinto, Juliana T. Mesquita e Walkyria C. Lourenço (em ordem alfabética!), sempre tão dedicadas e preocupadas comigo. Com certeza, amigas de verdade; sem essa cumplicidade e carinho teria sido mais difícil.

Aos companheiros de laboratório do Instituto Adolfo Lutz, pela cobertura que me deram, direta ou indireta, assim como pelo convívio e amizade. Em especial à Matília, pela assistência e companheirismo.

E finalmente à D-us; não tenho palavras para agradecer tua bondade e graça não merecida. Sei que está presente em todos os momentos, fazendo-me vencer a cada dia.

A todos vocês e também àqueles que, embora não nomeados, fazem parte da minha vida, meu muitíssimo obrigada pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

Todos vocês são co-autores deste trabalho.

RESUMO

A pesquisa de medicamentos mais eficazes e que atendam aos padrões atuais de segurança é considerada uma prioridade para o tratamento da leishmaniose e doença de Chagas. Os principais objetivos do presente trabalho foram: avaliar a atividade anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* de bloqueadores de canal de cálcio (BCC) e dos fármacos buparvaquona e furazolidona; realizar combinações de BCC com os principais fármacos usados na clínica da leishmaniose visceral (LV); desenvolver formulações lipossomais de buparvaquona, furazolidona e nimodipino e desenvolver um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) visando quantificar a carga parasitária de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* após tratamento experimental. Buparvaquona, furazolidona e doze dos treze BCC testados (anlodipino, azelnidipino, bepridil, cilnidipino, fendilina, lercanidipino, lidoflazina, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino e nitrendipino) apresentaram atividade *in vitro* contra diferentes espécies de *Leishmania* e contra *Trypanosoma cruzi*, com moderada a baixa citotoxicidade contra células de mamíferos. O estudo de QSAR das 1,4-diidropiridinas permitiu a predição de dois análogos com possível atividade antiprotozoária. Anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino não apresentaram redução na carga parasitária de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Os BCC, quando associados *in vitro* com os fármacos padrão, mostraram interação indiferente em *L. (L.) infantum chagasi*. Buparvaquona, furazolidona e nimodipino lipossomais apresentaram redução da carga parasitária em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Foi observado colocalização da formulação lipossomal de furazolidona com os amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em hamsteres infectados. Diante destes resultados, conclui-se que: i) Buparvaquona, furazolidona e a maioria dos BCC são ativos *in vitro* contra *Leishmania* spp. e podem ser usados como protótipos na pesquisa de fármacos; ii) Não houve interações farmacológicas entre os BCC e os fármacos padrão testados; iii) Anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino não são eficazes no tratamento de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, nas rotas e doses testadas; iv) Lipossomos contendo fosfatidilserina podem melhorar o índice terapêutico de fármacos devido à liberação dirigida de fármaco aos macrófagos infectados; v) O protocolo de qPCR desenvolvido pode ser usado de forma sensível e rápida para a quantificação da carga parasitária no tratamento experimental de LV.

ABSTRACT

The search for more effective drugs that meet current safety standards is considered a priority for the treatment of leishmaniasis and Chagas disease. The main objectives of this study were to evaluate the *in vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania* activity of calcium channel blockers (CCB) and the drugs buparvaquone and furazolidone; to perform combinations of CCB with the main clinically used drugs for visceral leishmaniasis (VL) and to develop a liposomal formulation of buparvaquone, furazolidone and nimodipine. Buparvaquone, furazolidone and twelve of the thirteen tested CCB (amlodipine, azelnidipine, bepridil, cilnidipine, fendiline, lercanidipine, lidoflazine, mibefradil, nicardipine, nifedipine, nimodipine and nitrendipine) showed *in vitro* activity against different species of *Leishmania* and against *Trypanosoma cruzi*, with moderate to low cytotoxicity against mammalian cells. The QSAR study of 1,4-dihydropyridines allowed the prediction of two analogues with potential antiprotozoal activity. The liposomal formulations of buparvaquone, furazolidone and nimodipine showed reduction in the parasitic burden of infected hamsters. It was observed colocalization of liposomal furazolidone and *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes in infected hamsters. Given these results, we conclude that: i) Buparvaquone, furazolidone and most of the tested CCB were *in vitro* active against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* and can be used as prototypes in the search for new drugs, ii) There were no pharmacologic interactions between the CCB and the tested pattern drugs, iii) Amlodipine, bepridil, fendiline and nimodipine were not effective in the treatment of *L. (L.) infantum chagasi* infected hamsters, in the tested routes and doses iv) liposomes containing phosphatidylserine can improve the therapeutic index of drugs, due to the delivery to the infected macrophages, vi) The developed real-time PCR protocol can be used as sensitive tool for the fast quantification of the parasitic burden in LV experimental model.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Σ CIFsomatório das CIFs
\bar{x} Σ CIFmédia do somatório das CIFs
ATPtrifosfato de adenosina
BCCbloqueadores de canal de cálcio
BODdemanda bioquímica de oxigênio
cDNADNA complementar
CE ₅₀concentração efetiva 50%
CIFconcentração inibitória fracionária
CLAEcromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂dióxido de carbono
C _Tcycle threshold (ciclo limiar)
DAPIdicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DL ₅₀dose letal 50%
DMSOdimetilsulfóxido
DNAácido desoxirribonucléico
DNDiDrug for Neglected Diseases initiative
dNTP'sdesoxinucleotídeos fosfatados
DTTditiotreitól
EDTAácido etilenodiamino tetracético
EtOHetanol
FITC5-isotiocianato fluoresceína
GAalgoritmo genético

GPIglicosil-fosfatidilinositol
HClácido clorídrico
HIVvírus da imunodeficiência humana
IC 95%intervalo de confiança 95%
i.p.via intraperitoneal
i.v.via intravenosa
ISÍndice de seletividade
KClcloreto de potássio
LCleishmaniose cutânea
LDULeishman Donovan Units
LMleishmaniose mucosa
LPformulação lipossomal
LPSlipopolissacarídeo
LVleishmaniose visceral
M-199meio 199
METmicroscopia eletrônica de transmissão
MeOHmetanol
MgCl₂cloreto de magnésio
mRNARNA mensageiro
MSMinistério da Saúde
MTTbrometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
nanão ativo
ndnão determinado
NOóxido nítrico
NOSóxido nítrico sintase

OLSordinary least squares regressions
OMSOrganização Mundial da Saúde
PBStampão fosfato-salina
PCAPrincipal Component Analysis
PCRreação da polimerase em cadeia
PGNPBS, gelatina e NaN₃
PMMpotencial de membrana mitocondrial
qPCRreação da polimerase em cadeia quantitativa
QSARestudo quantitativo
das correlações entre estrutura química e atividade biológica
qspquantidade suficiente para
RNAácido ribonucléico
RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute
rpmrotação por minuto
SDSdodecil sulfato de sódio
SEMdesvio padrão da média
SFBsoro fetal bovino
SFMsistema fagocítico mononuclear
SIDAsíndrome da imunodeficiência adquirida
SRreceptores *scavenger* de macrófagos
SVS/MSSecretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
TFAácido trifluoracético
UVultra violeta
v/vvolume por volume
VSSGAVariable Subset Selection-Genetic Algorithm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Manifestações clínicas da leishmaniose. a) leishmaniose cutânea; b) leishmaniose mucocutânea; c) leishmaniose visceral e d) leishmaniose dérmica pós calazar	1
Figura 2: Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> . Promastigotas axênicos (a) e amastigotas (setas) no interior de macrófagos peritoneais de camundongos (b), ambos cultivados em meio de cultura. Aumento 100X	2
Figura 3: Ciclo de vida dos protozoários <i>Leishmania</i>	3
Figura 4: Distribuição geográfica mundial da leishmaniose visceral.....	4
Figura 5: Óbitos de LV no Brasil de 2000 a 2010	6
Figura 6: Estrutura das formulações lipídicas de anfotericina B: Abelcet®, (a), Amphotec® (b) e Ambisome® (c)	11
Figura 7: Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Trypanosoma</i> . a) amastigotas (seta) em músculo cardíaco de camundongo infectado; b) tripomastigotas sanguíneos; f) epimastigotas mantidos em meio de cultura.....	19
Figura 8: Ciclo de vida dos protozoários <i>T. cruzi</i>	18
Figura 9: Área endêmica da doença de Chagas	20
Figura 10: Distribuição espacial dos casos de doença de Chagas no Brasil no período de 2000 a 2010	21
Figura 11: Ensaio de associação de fármacos em promastigotas. a) Imagem de uma placa de 96 poços contendo promastigotas <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ,	

após incubação com seis combinações de dois fármacos, e posterior incubação com MTT; b) Esquema de um ensaio de associação de fármacos em placa de 96 poços37

Figura 12: Ensaio de associação de fármacos em amastigotas. a) Imagem de uma placa de 16 poços (NUNC®) contendo amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*, após incubação com seis combinações de dois fármacos; b) Esquema de um ensaio de associação de fármacos em placas de 16 poços38

Figura 13: Representação gráfica de um isoblograma. Associação de dois fármacos (A e B) e os possíveis tipos de interação: aditividade (a) ou indiferença; sinergismo (b) e antagonismo (c)40

Figura 14: Efeito dos BCC em eritrócitos de camundongos BALB/c à 50 µg/mL. Água foi utilizada como controle positivo (100% de hemólise) e PBS como controle negativo (0% de hemólise)55

Figura 15: Dosagem da produção de NO por macrófagos após incubação com os BCC56

Figura 16: Imagem adquirida em MET. Observação de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* incubados com nimodipino. Os promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C em estufa BOD57

Figura 17: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos BCC anlodipino (a), bepridil (b), fendilina (c) e nimodipino (d). Número de parasitas encontrados no baço e fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR e calculado de acordo com a curva padrão de DNA59

Figura 18: Diagrama de Hasse para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para

atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d)73

Figura 19: Gráfico de scores (esquerda) e loadings (direita) para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d)75

Figura 20: Estruturas químicas dos análogos de 1,4-diidropiridina projetados por QSAR: (S)-3-etil 5-metil 2-((2-aminoetoxi)metil)-1,4-diidro-4-(3-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato (a) e (S)-3-[2,2-dimetil-3-(metil-fenil-amino)-propil]-5-metil-2-(2-Amino-etoximetil)-4-(3-nitro-fenil)-1,4-diidro-piridina-3,5-dicarboxilato (b)77

Figura 21: Curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*88

Figura 22: Curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*90

Figura 23: Isobogramas obtidos com base nos valores de CE₅₀ pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*91

Figura 24: Isobogramas obtidos com base nos valores de CE₅₀ pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos

padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*93

Figura 25: Isobogramas obtidos com base nos valores de CIFs pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*94

Figura 26: Isobogramas obtidos com base nos valores de CIFs pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*96

Figura 27: Imagem adquirida em MET. Observação de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* incubados com furazolidona. Os promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C em estufa BOD103

Figura 28: Dosagem da produção de NO por macrófagos após incubação com furazolidona104

Figura 29: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* do fármaco furazolidona e sua formulação lipossomal. Carga parasitária no baço (a) e no fígado (b) de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, determinada pela técnica de LDU105

Figura 30: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* do fármaco buparvaquona e sua formulação lipossomal. Número de parasitas presentes no baço e fígado dos hamsteres infectados, obtido por qPCR, calculado de acordo com a curva padrão de DNA de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*110

Figura 31: Estrutura de um lipossomo e representação esquemática da possível incorporação de compostos hidrofílicos ou lipofílicos115

Figura 32: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo furazolidona	117
Figura 33: Imprinting de baço (a), fígado (b) e esfregaço de medula óssea (c) de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> observados sob microscópio de fluorescência. Furazolidona lipossomal visualizada em vermelho	118
Figura 34: Imprinting de baço (a, b) e fígado (c, d) e esfregaço de medula óssea (e, f) de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> observados sob microscópio confocal. Furazolidona lipossomal visualizada em vermelho; parasitas em verde; núcleos e cinetoplastos em azul	119
Figura 35: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo nimodipino	120
Figura 36: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo buparvaquona	120
Figura 37: Curva padrão de DNA de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , obtida pelo valor C_T e pelo número de promastigotas de <i>Leishmania</i> (Log)	126
Figura 38: Fotografia de gel de agarose com amostras de RNA amplificadas de baço e fígado de hamsteres infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> após tratamento experimental. Grupo tratado com bepridil (a), grupo tratado com Glucantime (b) e grupo controle (c)	128
Figura 39: Valores de C_T obtidos por qPCR das amostras de baço e fígado após tratamento experimental	129
Figura 40: Valores de C_T obtidos por qPCR das amostras de baço e fígado após tratamento experimental	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Doses e esquemas utilizados no tratamento experimental dos fármacos anlodipino, bepridil, buparvaquona, fendilina, furazolidona e nimodipino	43
Tabela 2: Valores de CE ₅₀ contra <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i> dos BCC em estudo. Valores expressos em µg/mL	52
Tabela 3: Valores de CE ₅₀ contra <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i> dos BCC em estudo. Valores expressos em µM	53
Tabela 4: Valores de CE ₅₀ contra células de mamífero e IS dos BCC em estudo.	54
Tabela 5: Valores de CE ₅₀ contra <i>Leishmania</i> spp., <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade dos fármacos padrão.	55
Tabela 6: Valores teóricos de CE ₅₀ e IS dos análogos de 1,4-diidropiridinas	79
Tabela 7: Valores de CE ₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	84
Tabela 8: Valores de CE ₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em amastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	87
Tabela 9: Valores de $\bar{x} \sum \text{CIF}$ das associações entre os BCC e os fármacos padrão em promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	88
Tabela 10: Valores de CE ₅₀ contra <i>Leishmania</i> spp. e citotoxicidade da furazolidona	102

Tabela 11: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* do fármaco furazolidona e sua formulação lipossomal. Carga parasitária no baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*.....105

Tabela 12: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp. e citotoxicidade da buparvaquona110

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose	1
1.1.1. Tratamento disponível e fármacos em estudo clínico.....	8
1.1.1.1. Antimoniais pentavalentes.....	9
1.1.1.2. Anfotericina B	10
1.1.1.2.1. Formulações lipídicas de anfotericina B...11	
1.1.1.3. Miltefosina	13
1.1.1.4. Paromomicina	14
1.1.1.5. Pentamidina	15
1.1.1.6. Sitamaquina	15
1.2. Doença de Chagas	16
1.2.1. Tratamento	21
1.3. Estratégias para a pesquisa de compostos e alternativas para o tratamento das leishmanioses e doença de Chagas.....	23

1.3.1. Reposicionamento de fármacos.....	24
1.4. Justificativa e relevância.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Reagentes e fármacos.....	30
3.2. Parasitas.....	30
3.3. Células de mamíferos.....	31
3.4. Animais de experimentação.....	31
3.5. Determinação da CE ₅₀ em promastigotas e tripomastigotas.....	32
3.6. Determinação da CE ₅₀ em amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	32
3.7. Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos e do índice de seletividade.....	33
3.8. Avaliação da atividade hemolítica	34
3.9. Avaliação da produção NO	34
3.10. Diagrama de Hasse, PCA e QSAR	34
3.11. Determinação das interações entre fármacos <i>in vitro</i>	36
3.12. Determinação das CIFs e classificação das associações	39
3.13. Avaliação das alterações ultraestruturais causadas por nimodipino e furazolidona.....	40

3.14. Preparo de formulações lipossomais.....	41
3.15. Determinação do diâmetro médio dos lipossomos.....	41
3.16. Dosagem de fosfolídeos e quantificação do encapsulamento.....	42
3.17. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania in vivo</i>	42
3.18. Quantificação da carga parasitária <i>in vivo</i> por LDU.....	43
3.19. Quantificação da carga parasitária <i>in vivo</i> por qPCR.....	44
3.20. Extração de DNA e RNA e síntese de cDNA.....	44
3.21. PCR em tempo real <i>single</i>	45
3.22. Construção da curva padrão de DNA.....	46
3.23. PCR convencional e seleção dos <i>primers</i>	47
3.24. Estudos de biodistribuição.....	48
3.25. Análises estatísticas.....	49
CAPÍTULO 1: Bloqueadores de Canal de Cálcio.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. RESULTADOS.....	51
2.1. Determinação da atividade antiparasitária e citotoxicidade.....	51
2.2. Avaliação da produção de NO.....	56
2.3. Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> causadas por nimodipino.....	57

2.4. Avaliação <i>in vivo</i> dos BCC anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino livre e lipossomal.....	58
3. DISCUSSÃO.....	62
CAPÍTULO 2: Estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. RESULTADOS.....	72
2.1. Diagrama de Hasse e PCA.....	72
2.2. Predição de análogos de 1,4-diidropiridinas.....	78
3. DISCUSSÃO.....	80
CAPÍTULO 3: Associação de fármacos.....	81
1. INTRODUÇÃO.....	81
2. RESULTADOS.....	83
2.1. Análise dos valores de CIF e dos isobogramas	83
3. DISCUSSÃO.....	98
CAPÍTULO 4: Furazolidona.....	101
1. INTRODUÇÃO.....	101
2. RESULTADOS.....	102
2.1 Determinação da atividade antiparasitária e da citotoxicidade.....	102
2.2 Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> causadas por furazolidona	103

2.3. Avaliação da produção de NO.....	105
2.4. Avaliação <i>in vivo</i> da furazolidona livre e sua formulação lipossomal.....	105
3. DISCUSSÃO.....	107
CAPÍTULO 5: Buparvaquona.....	109
1. INTRODUÇÃO.....	109
2. RESULTADOS.....	110
2.1 Determinação da atividade antiparasitária e da citotoxicidade.....	110
2.2. Avaliação <i>in vivo</i> da buparvaquona e sua formulação lipossomal.....	111
3. DISCUSSÃO.....	112
CAPÍTULO 6: Lipossomos.....	114
1. INTRODUÇÃO.....	114
2. RESULTADOS.....	118
2.1. Preparação de furazolidona lipossomal.....	118
2.2. Estudo de biodistribuição da furazolidona lipossomal em hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	118
2.3. Preparação de nimodipino lipossomal.....	121
2.4. Preparação de buparvaquona lipossomal.....	121
3. DISCUSSÃO.....	122
CAPÍTULO 7: Avaliação do tratamento experimental por qPCR.....	125

1. INTRODUÇÃO.....	125
2. RESULTADOS.....	127
2.1. Construção da curva padrão de DNA de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	127
2.2. PCR convencional.....	128
2.3. qPCR.....	130
3. DISCUSSÃO.....	132
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134
6. CONCLUSÕES.....	138
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
ANEXOS.....	169

ANEXO 1: Fórmula molecular, estrutura e classificação dos fármacos usados no tratamento da LV e Doença de Chagas

ANEXO 2: Nome, estrutura, fórmula e classificação dos fármacos em estudo

ANEXO 3: Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine

ANEXO 4: Furazolidone is a selective *in vitro* candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study

ANEXO 5: Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis

ANEXO 6: Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: *In vitro* evaluation and structure–activity relationship study

ANEXO 7: *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR

ANEXO 8: Investigation into the *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs

ANEXO 9: Buparvaquone entrapped into phosphatidylserine-liposomes is effective in experimental hamster model of *Leishmania (L.) chagasi*

ANEXO 10: Repurposing drugs for visceral leishmaniasis: experimental evaluation of calcium channel blockers and of a liposomal formulation of nimodipine

ANEXO 11: Participação em projetos paralelos

ANEXO 12: Aprovação do comitê de ética

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. As principais manifestações clínicas incluem a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose dérmica pós-calazar (Figura 1) (Seifert, 2011).



Figura 1: Manifestações clínicas da leishmaniose. a) leishmaniose cutânea; b) leishmaniose mucocutânea; c) leishmaniose visceral e d) leishmaniose dérmica pós-calazar.

Fonte: Chappuis et al., 2007.

Os parasitas apresentam dimorfismo em seu ciclo de vida; promastigotas (Figura 2a) se desenvolvem no intestino de flebotomíneos fêmeas como formas infecciosas que são transmitidas para hospedeiros mamíferos (Bates, 2007; Rogers et al., 2004). No hospedeiro vertebrado, os parasitas sobrevivem e se multiplicam como amastigotas (Figura 2b) dentro de vacúolos parasitóforos de macrófagos (Burchmore, Barrett, 2001; Handman, Bullen 2002).

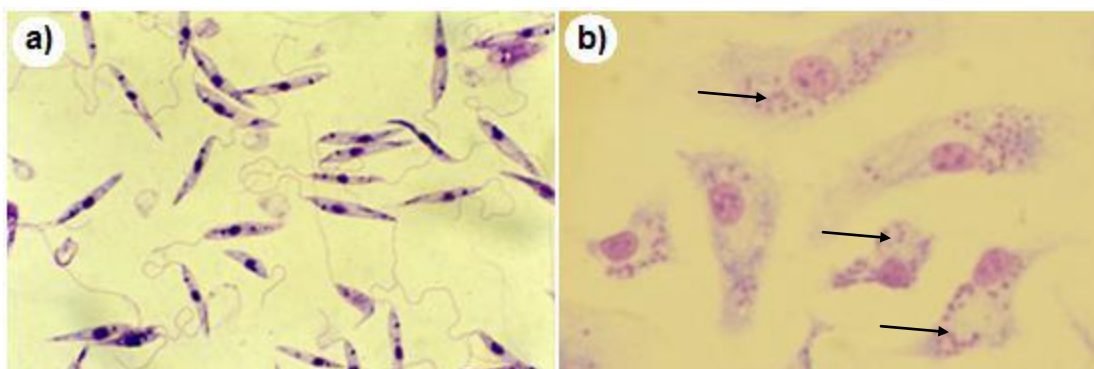


Figura 2: Observação microscópica de protozoários do gênero *Leishmania*. Promastigotas axênicos (a) e amastigotas (setas) no interior de macrófagos peritoneais de camundongos (b), ambos cultivados em meio de cultura. Aumento 100X.

Fonte: Arquivo pessoal.

A transmissão da leishmaniose ocorre pela picada de dípteros da família Psychodidae, dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Mattos et al., 2004). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Lainson, Rangel, 2005). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para a LV. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios da LV são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (MS, 2005).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o

rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Essas se diferenciam rapidamente em promastigotas, que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos. Ocorre, então, a liberação destas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (CDC, 2007). O ciclo de vida dos protozoários *Leishmania* é ilustrado na Figura 3.

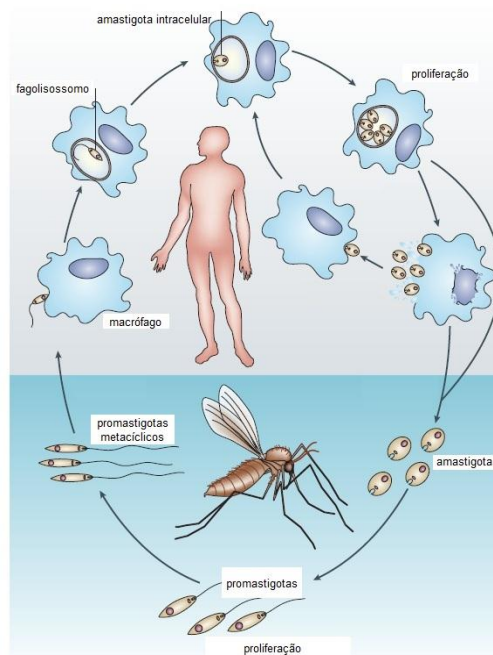


Figura 3: Ciclo de vida dos protozoários *Leishmania*.

Fonte: Chappuis et al., 2007 (modificado).

A leishmaniose é endêmica em 98 países ou territórios e estima-se que 350 milhões de pessoas vivem em áreas onde há o risco de contrair a infecção. A incidência é estimada em dois milhões de casos por ano (0,5 milhões de LV e 1,5 milhões de LC), com 70 mil mortes a cada ano (Reithinger et al., 2007). A leishmaniose está incluída entre as doenças tropicais negligenciadas (Feasey et al., 2010) e possui forte ligação com a pobreza (Alvar, Yactayo, Bern, 2002).

A LV tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (Figura 4).

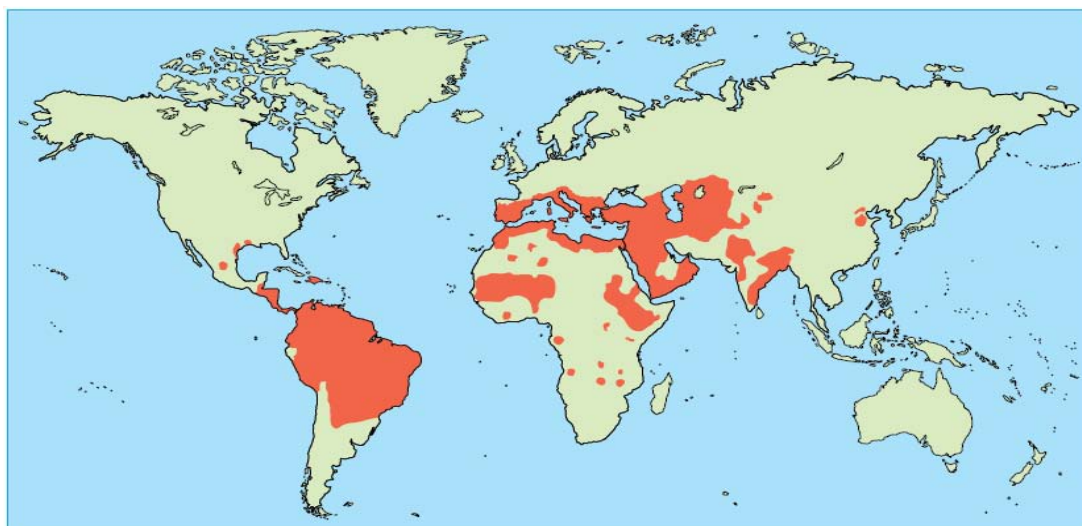


Figura 4: Distribuição geográfica mundial da leishmaniose visceral.

Fonte: OMS, 2011a.

Dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, a LV é também considerada emergente em indivíduos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). A coinfeção com o HIV intensifica a carga parasitária por causar formas graves, que são mais difíceis de tratar. Em março de 2010, a coinfeção com HIV havia sido relatada em 35 países (OMS, 2010). Ambas as respostas celular e humoral são diminuídas em pacientes coinfectados (Moreno et al., 2000), levando a um aumento no risco de desenvolvimento de LV, aumento da carga parasitária no sangue e medula óssea, baixa sensibilidade aos testes sorológicos e alta taxa de falha no tratamento

(Murray, 1999; Deniau, 2003). Além disso, as características clínicas podem ser atípicas em pacientes imunossuprimidos (Rosenthal et al., 2000).

Estima-se que mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (OMS, 2010). A leishmaniose causada por *L. (L.) donovani* com transmissão antroponótica abrange o nordeste da Índia, sudeste do Nepal e central de Bangladesh e é responsável por mais de dois terços dos casos de LV no mundo. A leishmaniose causada por *L. (L.) donovani* no Leste Africano, também com transmissão antroponótica, é o segundo maior foco de LV, com maior incidência na Etiópia e no Sudão. Outros dois focos zoonóticos causados por *L. (L.) infantum chagasi* constituem a Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia ocidental, e no Novo Mundo, predominantemente o Brasil (OMS, 2010).

Os casos de LC são ainda mais dispersos. Os principais focos de transmissão antroponótica de *L. (L.) tropica* se estendem desde a Índia até o norte da África e focos de transmissão zoonótica de *L. (L.) major* se estendem da Ásia Central ao norte da África, além da África Oriental, causada por *L. (L.) aethiopica*. A outra área principal de transmissão é composta de muitos focos zoonóticos diferentes com várias espécies de *Leishmania* e afetam países das Américas. Estima-se que 90% dos casos de LC ocorram no Afeganistão, Argélia, República Islâmica do Irã, Arábia Saudita, República Árabe, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (OMS, 2010).

No Brasil foram notificados, no período de 1990 a 2007, 561.673 casos de leishmaniose, sendo 508.193 (90,5%) provocados pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* e 53.480 (9,5%) por *L. (L.) infantum chagasi* (Alves, 2009). De 2000 a 2010, foram notificados 2.422 óbitos de LV, com maior número de casos registrados na região Nordeste e Sudeste (Figura 5).

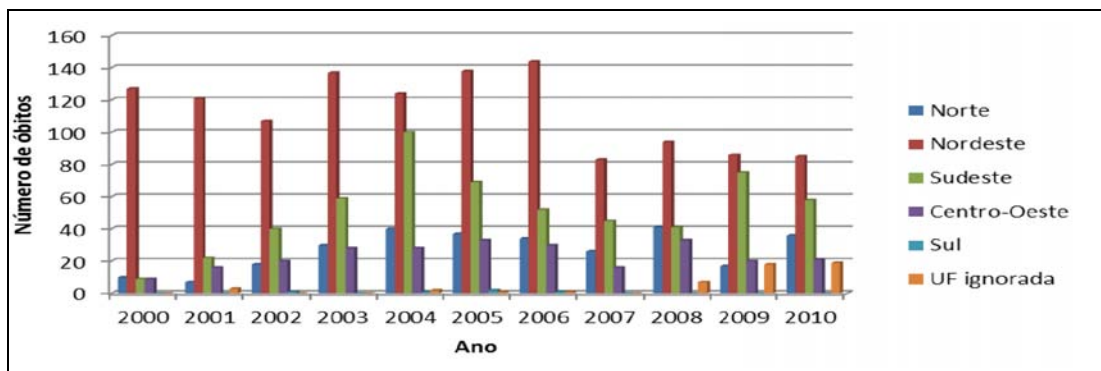


Figura 5: Óbitos de LV no Brasil de 2000 a 2010.

Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 23/7/11.

No Brasil, inicialmente, a LV foi caracterizada como doença eminentemente rural; nos últimos anos, vem se expandindo para áreas urbanas de municípios de médio e grande porte (Alves, 2009). Apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios a cada cinco anos. No País, a LV atinge 20 Estados, com média anual de 3.095 casos no período de 1996 a 2005 e incidência de 2,1 casos por 100.000 habitantes (Alves, 2009).

Até a década de 1990, o Nordeste correspondeu a 90% dos casos de LV do País. Porém, a doença vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte, modificando esta situação. Em 2005, os Estados nordestinos passaram a representar 56% do total de casos (Alves, 2009).

Outra mudança que se observa é a urbanização de uma doença que antes ocorria basicamente em zona rural, atingindo grandes centros urbanos, tais como São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN), Belo Horizonte (MG), Palmas (TO), Campo Grande (MT), Araçatuba (SP) e Corumbá (MS) (Lindoso, Goto, 2006).

No Estado de São Paulo, até 1998, os casos de LV eram oriundos de outras regiões endêmicas do país. A partir de então, registrou-se a enzootia canina no município de Araçatuba, região Oeste do Estado, no qual foi identificada a espécie *L. (L.) infantum chagasi*. Posteriormente, em 1999, foi registrado o primeiro caso humano de LV em São Paulo e, desde então, a doença vem ocorrendo em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista, nos quais a transmissão tem caráter urbano. O ambiente

peridomiciliar é o local onde o vetor é encontrado em maior densidade e está relacionado à presença de animais domésticos (Camargo-Neves, 2004).

O primeiro registro de suspeita de autoctonia de caso humano de LV, no Estado de São Paulo, ocorreu em 1978. A partir de agosto de 1998 ocorreram casos autóctones de LV em cães de área urbana do Município de Araçatuba, e em 1999 no homem. Desde então, observa-se expansão da área de transmissão da doença. No período de 1999 a 2011, foram notificados 1.845 casos e 159 óbitos de LV no Estado (SES/CLVA, 2010). O programa de controle da LV no Estado de São Paulo consiste nas ações de vigilância epidemiológica, voltadas para a detecção e tratamento dos casos humanos, vigilância entomológica e controle da população canina. O controle da população canina consiste, principalmente, na eliminação dos animais errantes, na busca ativa e na eliminação de cães infectados, diagnosticados por exames parasitológico ou sorológico (Camargo-Neves, 2004).

A LV canina, até 2002, havia sido registrada em 29 municípios do Estado de São Paulo. Quando são analisados os números de casos humanos e caninos acumulados de 1999 a 2002, verifica-se que o maior número de casos humanos ocorreu naqueles municípios em que foram encontradas as maiores prevalências caninas. Verifica-se, também, uma relação espaço-temporal, na qual a LV canina, na grande maioria das vezes, precedeu a detecção de casos humanos, principalmente em municípios onde o vetor já havia sido registrado (Camargo-Neves et al., 2001; Oliveira et al., 2001).

É possível que nos próximos anos ocorra uma epidemia na cidade de São Paulo (Zorzetto, 2008). Partindo de Corumbá, no oeste do Pantanal sul-mato-grossense, fronteira com a Bolívia, a LV atravessou o Estado em direção à região leste do País. No final dos anos 1990, a LV já havia atingido Campo Grande, e chegou a Três Lagoas, na divisa com São Paulo. Em seu avanço, acompanhou o caminho do gasoduto Brasil-Bolívia, que segue o traçado do rio Tietê rumo à capital paulista, e da rodovia BR-262, que liga Corumbá ao Espírito Santo (Zorzetto, 2008). A partir de Três Lagoas, a

transmissão da LV foi registrada em diferentes cidades do noroeste paulista e sua disseminação seguiu rumo à capital, seguindo o trajeto da rodovia Marechal Rondon (SP-300), a principal via de conexão entre o Mato Grosso do Sul e a capital paulista (Zorzetto, 2008).

Analisando a dispersão da LV, há estimativas de que a cada ano o parasita avança 30 quilômetros em direção a capital, transportado pelo inseto vetor. Diante desses dados, existe a possibilidade de que a doença alcance a maior metrópole da América do Sul, onde vivem 19 milhões de pessoas (Zorzetto, 2008).

Diversos fatores contribuem para a expansão e modificação das características epidemiológicas da LV no Brasil. Situação esta que está intimamente relacionada ao fluxo migratório, com introdução de hospedeiros infectados onde já havia a presença do vetor, desmatamento e alterações no ecossistema, provocadas pelo homem (Lindoso, Goto, 2006).

1.1.1. Tratamento disponível e fármacos em estudo clínico

Os antimoniais foram descobertos há quase 100 anos e permanecem como tratamento de primeira escolha para a LV na maior parte do mundo. Desoxicolato de anfotericina B e pentamidina têm sido usados como fármacos de segunda linha, porém sua administração também envolve efeitos adversos graves e requer longos cursos de administração parenteral (Tiuman et al., 2011). A necessidade por fármacos mais seguros conduziu a introdução da anfotericina B liposomal, em 1996, miltefosina, em 2004 e paromomicina, em 2006, com limitações e eficácia variável de acordo com a região endêmica (OMS, 2010).

Os parágrafos seguintes fornecem uma visão geral dos fármacos anti-*Leishmania* utilizados e avaliados clinicamente com relação aos dados clínicos, toxicidade e modo de ação. As estruturas, fórmulas moleculares e classificação química dos fármacos usados no tratamento da LV são mostradas no Anexo 1.

1.1.1.1 Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, têm sido utilizados no tratamento da LV e LC, ambos com eficácia e toxicidade comparável. Ambos apresentam pobre absorção oral e são administrados por injeções intramuscular ou intravenosa (Moore, Lockwood, 2010). Além dos longos esquemas posológicos exigidos, sua principal problemática dá-se pela cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, sendo contraindicado para gestantes (Gontijo, Melo, 2004). Cardiotoxicidade grave foi observada em 9 a 10% dos pacientes tratados, principalmente devido à inadequada formulação do medicamento e uso de lotes com alta osmolaridade (Sundar et al., 1998; Olliaro et al., 2005).

Em muitas partes do mundo as taxas de resposta são maiores que 95% em pacientes não tratados previamente, mas em regiões de alta prevalência e alta transmissão, como em Bihar, na Índia, resistência adquirida aos antimoniais pentavalente tem sido observada (Croft, Sundar, Fairlamb, 2006). Razões potenciais para a seleção de parasitas resistentes aos antimoniais em Bihar incluem cursos incompletos de tratamento e o uso de fármacos genéricos que foram inicialmente mal monitorados para a qualidade de antimônio (Moore, Lockwood, 2010). Além dos problemas relacionados à toxicidade e à resistência, é importante ressaltar que pacientes imunodeprimidos com leishmaniose respondem pobremente aos antimoniais (Desjeux, 1999).

Os antimoniais pentavalentes são geralmente aceitos como pró-fármacos que exigem a redução para a forma trivalente para atividade biológica. O local de redução (macrófagos, amastigota ou ambos) e o mecanismo (enzimático ou não-enzimático) permanecem obscuros. Os primeiros estudos têm implicado a inibição do metabolismo energético e a biossíntese de macromoléculas por meio da inibição da glicólise e beta-oxidação de ácidos graxos no mecanismo de ação do estibogluconato de sódio (Berman, Waddell, Hanson, 1985; Berman, Gallalee, Best, 1987). Os alvos específicos nessas vias não foram identificados. O antimônio trivalente

mostrou interferir diretamente no metabolismo de tióis em *L. (L.) donovani* com vários efeitos sobre o metabolismo de glutatona e tripanotona (Wyllie, Cunningham, Fairlamb, 2004).

1.1.1.2. Anfotericina B

Anfotericina B é um antibiótico poliênico, que foi originalmente isolado em 1953 como um subproduto da fermentação de *Streptomyces nodosus*. Foi nomeado anfotericina B devido a suas propriedades químicas anfotéricas, isto é, forma sais solúveis em condições ácidas e básicas, mas é insolúvel em água. Devido a isto, a anfotericina B comercial para injeção (Fungizone ®) requer a adição de desoxicolato de sódio, que produz dispersão coloidal (Quilitz, 1998).

Anfotericina B é um agente antifúngico que adere ao ergosterol, produzindo aumento da permeabilidade de membrana, que resulta na morte fúngica. Devido a isto, possui atividade antifúngica de largo espectro. Da mesma forma, anfotericina B possui maior seletividade aos esteróis predominantes na membrana da *Leishmania*, ao invés do colesterol, os esteróis predominantes nas células de mamíferos. Sua interação com a membrana de *Leishmania* leva à formação de canais transmembrana, formando poros e vazamento de cátions (Brajtburg, Bolard, 1996; Pourshafie et al., 2004).

O uso clínico de anfotericina B é recomendado para os casos de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional. Seu uso é restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta (Berman, 1998). A necessidade de internação, o acompanhamento constante dos pacientes, a duração prolongada do tratamento e os efeitos adversos relacionados à infusão (febre, calafrios, tromboflebite) são suas desvantagens. Toxicidade, tal como hipocalcemia, nefrotoxicidade e miocardite podem ocorrer (Olliaro et al., 2005).

1.1.1.2.1. Formulações lipídicas de anfotericina B

Os avanços na tecnologia farmacêutica conduziram ao desenvolvimento de três formulações lipídicas de anfotericina B: complexo lipídico de anfotericina B, anfotericina B de dispersão coloidal e anfotericina B lipossomal.

O complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®) consiste de uma relação 1:1 de anfotericina B em combinação com uma relação 7:3 dos fosfolípidos L- α -dimiristoilfosfatidilcolina e L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol, formando estrutura com aproximadamente 250 nm de diâmetro. Anfotericina B sulfato de colestera (Amphotec®) é uma dispersão coloidal produzida por uma relação de 1:1 de anfotericina B e sulfato de colestera, formando estrutura de 122 nm de diâmetro. Anfotericina B lipossomal (AmBisome®), por sua vez, é produzida pela incorporação de anfotericina B em uma única camada lipídica composta de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol e fosfatidilglicerol na proporção de 10:5:4 e possui 60 a 70 nm de diâmetro (Figura 6) (Quilitz, 1998).

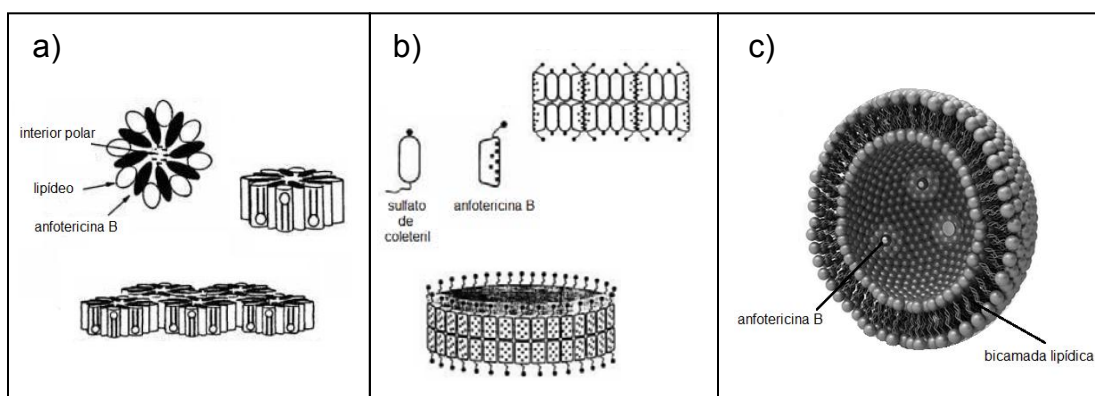


Figura 6: Estrutura das formulações lipídicas de anfotericina B: Abelcet®, (a), Amphotec® (b) e AmBisome® (c).

Fonte: Quilitz, 1998.

Lipossomos são vesículas compostas de arranjos esféricos de moléculas de fosfolipídeos. Substâncias químicas hidrofóbicas como anfotericina B podem ser incorporadas na bicamada lipídica, que proporciona a liberação dirigida ao sistema reticuloendotelial. Devido a isso, ocorre a penetração eficaz nos tecidos com níveis sustentados e estabilidade no sangue, macrófagos e tecidos alvo (Bern et al., 2006).

O uso de anfotericina B lipossomal é mais seguro do que o desoxicolato de anfotericina B e é também altamente eficaz (Olliaro et al., 2005; Alvar, Croft, Olliaro 2006). No entanto, seu alto custo limita a utilização generalizada em muitas regiões endêmicas. Preços preferenciais foram negociados para certos países (Olliaro et al., 2009).

Cursos de tratamento curtos e regimes de dose única de anfotericina B lipossomal têm sido investigados em Bihar (Sundar et al., 2001, 2003, 2004). Estudo recente testou a eficácia da anfotericina B lipossomal em uma única dose de 10 mg/kg em comparação a 15 infusões em dias alternados de anfotericina B na dose de 1 mg/kg. A dose única de anfotericina B lipossomal não foi inferior nem menos dispendiosa do que o desoxicolato de anfotericina B, mas uma taxa de recaída maior, embora não significativa, foi observada no grupo tratado com a formulação lipossomal (Sundar et al., 2010). Anfotericina B dispersão coloidal foi avaliada também em Bihar, onde foi observada uma taxa de cura de 97%; efeitos adversos relacionados à infusão foram observados em 56 a 68% dos pacientes (Sundar et al., 2006). Existem, também, relatos de ensaios clínicos que utilizaram um produto de desoxicolato de anfotericina B pré-misturado com emulsão lipídica para o tratamento da LV em Bihar, com taxas de cura de aproximadamente 95%; efeitos adversos relacionados à infusão foram observados em 11% dos pacientes (Sundar et al., 2008a; 2008b; 2009).

1.1.1.3. Miltefosina

Miltefosina é uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer. Foi o primeiro fármaco oral registrado para o tratamento da LV. É usada como ferramenta potencial para o programa de eliminação da LV na Índia, Bangladesh e Nepal e como tratamento de segunda linha para LC na Colômbia e Bolívia (Alvar, Croft, Olliaro, 2007). Sua eficácia ainda não foi comprovada para espécies de LV do Novo Mundo.

O trato gastrointestinal é o principal órgão alvo de efeitos colaterais (Sindermann, Engel, 2006). Sintomas gastrointestinais são os efeitos adversos mais comuns observados em estudos clínicos (Bhattacharya et al., 2007). Também, foi observada uma elevação transitória moderada das enzimas hepáticas. Em um estudo de fase IV e em estudos anteriores, os efeitos adversos ocorreram mais frequentemente na primeira semana de tratamento e diminuíram com o tempo (Bhattacharya et al., 2007). A principal limitação da miltefosina é a sua contraindicação na gravidez e contracepção obrigatória para mulheres em idade fértil durante a duração da terapêutica e dois a três meses após o tratamento. Esta restrição baseia-se na observação de efeitos teratogênicos em estudos pré-clínicos (Sindermann, Engel, 2006).

A miltefosina possui uma primeira meia-vida de eliminação de sete dias e uma meia-vida terminal de 30 dias (Dorlo et al., 2008). Foram levantadas preocupações acerca dos níveis subterapêuticos no corpo após o término do tratamento, o que poderia contribuir para a seleção de cepas resistentes (Bryceson, 2001), já que promastigotas de *Leishmania* resistentes a miltefosina são facilmente gerados em laboratório (Seifert et al., 2003, 2007).

Os possíveis alvos da miltefosina em *Leishmania* incluem a interferência no metabolismo éter-lipídico, biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e no sinal de transdução (Lux et al., 1996). Mitocôndrias e, especificamente, a citocromo oxidase C têm sido implicados como alvos da miltefosina em promastigotas de *L. (L.) donovani* (Luque-

Ortega, Rivas, 2007). Efeitos sobre o metabolismo lipídico, especialmente fosfolipídeos, ácidos graxos e esteróis, também têm sido descritos em promastigotas de *L. (L.) donovani* (Rakotomanga et al., 2007).

1.1.1.4. Paromomicina

Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é o último fármaco anti-*Leishmania* registrado para LV na Índia. Em um estudo de fase III, paromomicina administrada por injeção muscular na dose de 11 mg/kg/dia por 21 dias mostrou eficácia similar ao tratamento com infusão de anfotericina B na dose de 1 mg/kg/dia por 30 dias, com taxas de cura de 94,6% e 98,8%, respectivamente (Gonçalves et al., 2005; Sundar et al., 2007).

Este fármaco tem se mostrado eficaz no tratamento da LV na Índia e África Oriental, porém não há relatos de experiência nas Américas (OMS, 2010). Como efeitos colaterais, a paromomicina pode apresentar nefro e ototoxicidade. A monitorização dos níveis de enzimas hepáticas foi recomendada em um estudo de curta duração (Sundar et al., 2009).

Formulações tópicas de paromomicina também foram desenvolvidas para o tratamento de LC (Alvar, Croft, Olliaro, 2006; Davidson et al., 2009), como a pomada de cloreto de metilbenzetônio e paromomicina (Leshcutan®) utilizada no tratamento de LC em Israel (Davidson et al., 2009). Um estudo de fase II realizado na Tunísia e na França relatou taxa de cura de 94% da pomada do aminoglicosídeo de terceira geração WR279,396, uma formulação hidrofílica composta de 15% de paromomicina e 0,5% de gentamicina (Ben Salah et al., 2009).

Estudos sobre o modo de ação da paromomicina em *Leishmania* spp. indicaram depolarização da membrana mitocondrial e disfunção ribossomal e respiratória (Maarouf et al., 1995; 1997a; 1997b).

1.1.1.5. Pentamidina

Pentamidina é uma diamidina aromática, que tem sido usada como segunda linha no tratamento de LC e LV, em casos não responsivos ao tratamento com antimoniais ou em casos de hipersensibilidade ao antimônio (Alvar, Croft, Olliaro, 2006). Este fármaco é administrado por via intramuscular ou, preferencialmente, por infusão intravenosa (OMS, 2010). Efeitos adversos graves, como *diabetes mellitus* (Olliaro et al., 2005), hipoglicemia grave, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritos (Rath et al., 2003). Ausência de resposta à pentamidina foi relatada em 25% dos pacientes (Mishra et al., 1992).

As mitocôndrias têm sido sugeridas como o local de acúmulo de pentamidina em *L. (L.) donovani* (Mukherjee et al., 2006) e possível alvo de ação deste fármaco. Mudanças morfológicas como inchaço de mitocôndrias e fragmentação do DNA do cinetoplasto foram relatadas (Croft, Brazil, 1982; Langreth et al., 1983). O colapso do potencial de membrana mitocondrial foi observado em promastigotas de *L. (L.) donovani* (Vercesi, Docampo, 1992), assim como a alcalinização dos acidocalcisomas (Vercesi et al., 2000).

1.1.1.6. Sitamaquina

Sitamaquina (WR6026) é uma 8-aminoquinolina em fase de desenvolvimento para o tratamento oral da LV (Yeates, 2002). Estudos de fase II no Quênia e na Índia relataram taxas de cura de 83 e 87%, respectivamente, após 28 dias de tratamento na dose de 2 mg/kg/dia (Wasunna et al., 2005; Jha et al., 2005). Dor abdominal e cefaléia foram relatados no Quênia e dispepsia, vômitos e cianose, na Índia. Metemoglobinemia está associada ao uso de 8-aminoquinolinas e foi relatada em pacientes indianos (Jha et al., 2005). Colapso do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) donovani* foi

demonstrado (Vercesi, Docampo, 1992), bem como alcalinização de acidocalcisomas (Vercesi et al., 2000).

1.2. Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma doença parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A transmissão vetorial se dá por insetos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae, estando atualmente controlada no Brasil a principal espécie transmissora, *Triatoma infestans*. Existem, também, outros mecanismos de transmissão, como a transfusão sanguínea, vertical e oral (de Almeida et al., 2007).

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda, que dura, em média, dois meses, sendo sucedida por uma fase crônica, que, tipicamente, se prolonga por toda a vida do hospedeiro. Na maioria dos casos, a fase aguda da doença é oligossintomática, principalmente em adultos. Dependendo do local da inoculação, o primeiro sinal pode ser um edema de pele (chagoma) ou edema unilateral orbital (sinal de Romaña), com linfadenopatia local e febre durante várias semanas. Caso a fase aguda se manifeste, outras manifestações podem ser observadas, além do quadro febril, tais como miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (Boainain, Rassi, 1979).

A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca. À medida que os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda diminuem em intensidade, uma miocardite focal se instala durante a fase indeterminada da doença, podendo, em muitos casos, evoluir em magnitude e abrangência, com a destruição de fibras cardíacas e fibrose (Rossi, 1991).

A fase crônica, com parasitas presentes nos tecidos-alvo (especialmente coração e músculo liso digestivo), tem as seguintes formas clínicas: forma assintomática indeterminada; forma cardíaca; formas digestivas (megaesôfago e megacólon) ou formas mistas (cardíaca e digestiva) (OMS, 2011b).

A maioria das pessoas infectadas permanece assintomática e cerca de 30% apresentam complicações cardíacas e/ou digestivas na fase tardia da doença, como revisto por Moncayo (2003), Higuchi e colaboradores (2003).

Durante seu ciclo de vida, o parasito possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes. Como formas replicativas estão incluídos os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor e amastigotas observados no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes, os tripomastigotas metacíclicos, são encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes no sangue de mamíferos (Figura 7).

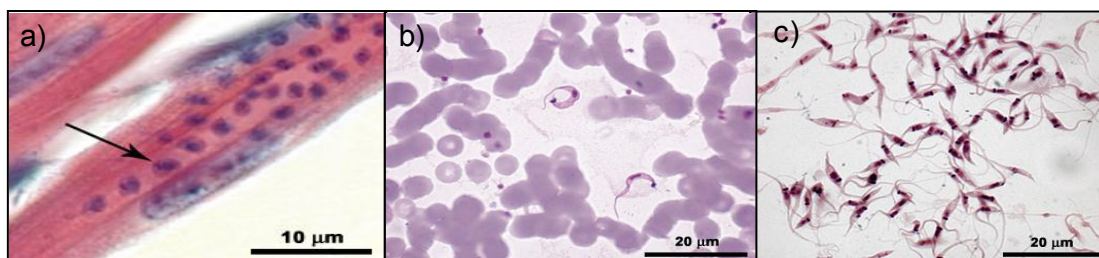


Figura 7: Observação microscópica de protozoários do gênero *Trypanosoma*. a) amastigotas (seta) em músculo cardíaco de camundongo infectado; b) tripomastigotas sanguíneos; c) epimastigotas mantidos em meio de cultura.

Fonte: FIOCRUZ, 2011.

O parasito *T. cruzi* infecta em condições naturais mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens; existe em diferentes populações de hospedeiros vertebrados tais como seres humanos, animais silvestres, animais domésticos e em hospedeiros invertebrados, como os triatomíneos. Das 140 espécies de triatomíneos conhecidas atualmente, 69 foram identificadas no Brasil e são encontradas em vários estratos florestais, de todos os biomas. Com a interrupção da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* no País, quatro outras espécies de triatomíneos têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (MS, 2009).

O ciclo no hospedeiro vertebrado tem início quando formas infectantes eliminadas pelo inseto vetor entram em contato com mucosas ou regiões lesadas da pele desses hospedeiros. As formas tripomastigotas metacíclicas podem invadir macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ocorre então proliferação intracelular e liberação de formas tripomastigotas e amastigotas no espaço intercelular. Estas formas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção, ou podem atingir diferentes tecidos do hospedeiro por meio da corrente circulatória. Durante a alimentação do inseto, as formas tripomastigotas que se encontram no sangue do hospedeiro vertebrado são ingeridas. No hospedeiro invertebrado, os parasitas se transformam em epimastigotas e então, no intestino posterior, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado via mucosa ou ferimentos na pele (Tyler, Engman, 2001). O ciclo de vida do *T. cruzi* é ilustrado na Figura 8.

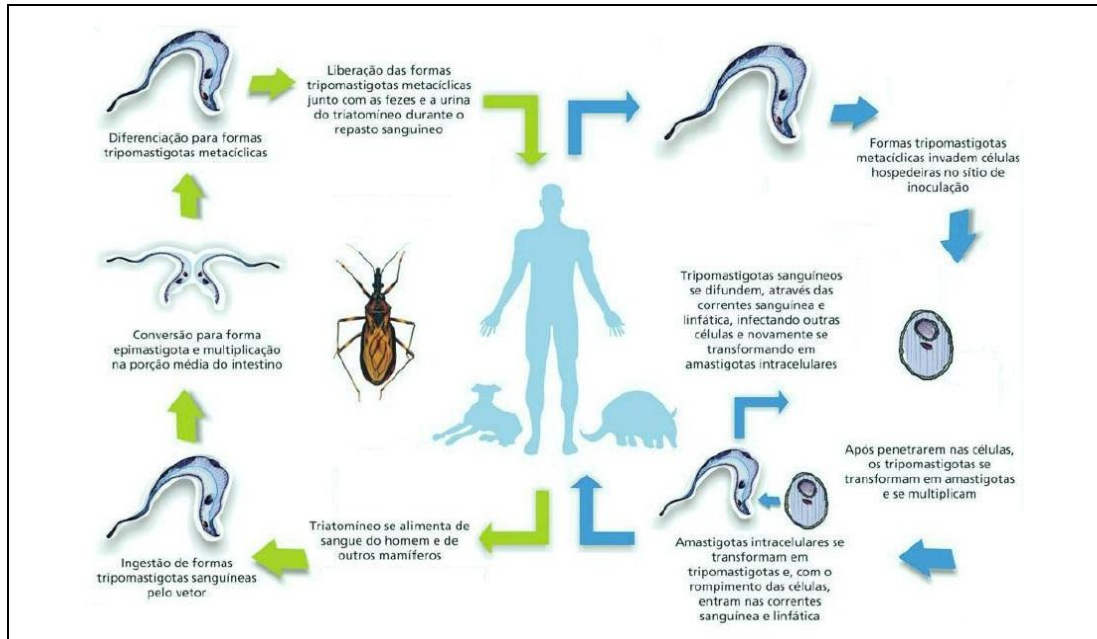


Figura 8: Ciclo de vida dos protozoários *T. cruzi*.

Fonte: FAPEAM, 2012.

A doença de Chagas ocorre principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica (Figura 9). No entanto, nas últimas décadas tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, diversos países da Europa e alguns países do Pacífico. Isto é devido principalmente à mobilidade populacional entre América Latina e o resto do mundo. Menos frequentemente, é devido à infecção por transfusão sanguínea, transmissão vertical ou doação de órgãos. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquirir a doença e que, em 2008, a doença de Chagas matou mais de 10 mil pessoas (OMS, 2010).



Figura 9: Área endêmica de doença de Chagas.

Fonte: Morel, Lazdins, 2003.

No final dos anos 1970, a área com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, e, desses, 711 municípios com a presença do vetor. Ações sistematizadas de controle químico foram instituídas a partir de 1975 e, mantidas em caráter regular desde então, levaram a uma expressiva redução da presença de *T. infestans* e, simultaneamente, da transmissão do *T. cruzi* ao homem (MS, 2012).

Os casos mais recentes de transmissão oral da doença de Chagas no Brasil estão relacionados ao consumo de açaí fresco, principalmente na região Norte. No período de 2000 a 2010, foram registrados no Brasil 1.086 casos de doença de Chagas aguda (Figura 10). Destes, 70% (765/1.086) ocorreram por transmissão oral e 7% por transmissão vetorial (80/1.086); em 22% dos casos (234/1.086) não foi identificada a forma de transmissão (MS, 2012).

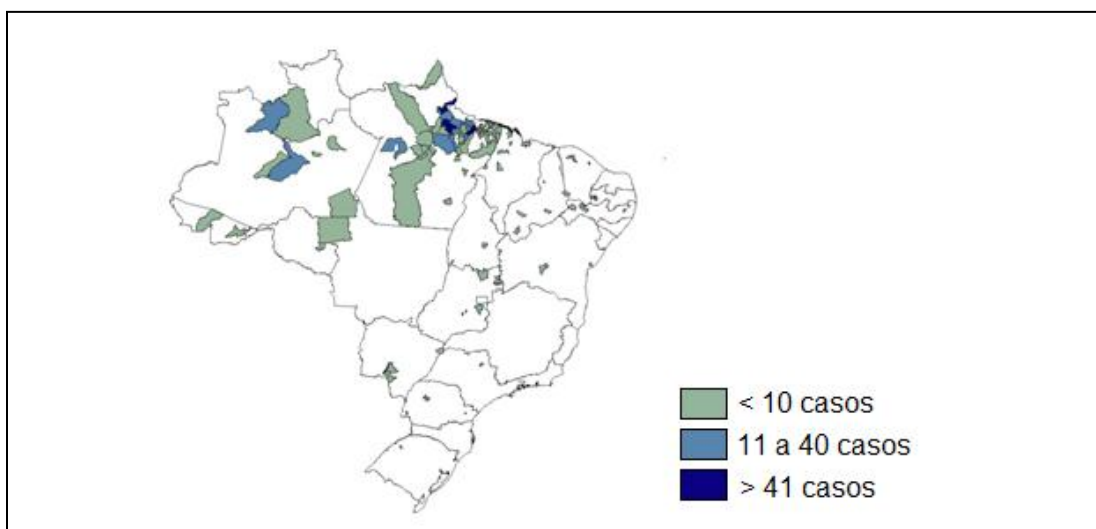


Figura 10: Distribuição espacial dos casos de doença de Chagas no Brasil no período de 2000 a 2010.

Fonte: SVS/MS.

1.2.1. Tratamento

A doença de Chagas continua a ser um grave problema de saúde devido à terapia inadequada. Os dois fármacos usados para tratar a doença de Chagas, o benznidazol e o nifurtimox, são quimicamente relacionados com os nitrofuranos (McKerrow et al., 2009). O mecanismo de ação destes fármacos está relacionado ao *stress* redutivo, envolvendo modificação covalente de macromoléculas, como as de DNA, por intermediários nitrorredutores (Maya, 2007). As estruturas, fórmulas moleculares e classificação química do benznidazol e do nifurtimox são mostradas no Anexo 1.

Benznidazol e nifurtimox apresentam 60 a 80% de cura da doença logo após a infecção ou no início da fase aguda (Tempone et al., 2007). No entanto, a eficácia de ambos diminui conforme aumenta o tempo em que ocorreu a infecção (OMS, 2010). O tratamento também é indicado em casos de reativação da doença, como por exemplo, devido à imunossupressão, e para recém-nascidos, em casos de infecção congênita.

Os benefícios do tratamento para prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença devem ser avaliados devido à longa duração do tratamento (até dois meses) e às possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados (OMS, 2011b).

Há controvérsias quanto à eficácia da terapia na fase crônica da doença e, além disso, a resistência ao nifurtimox foi documentada (de Andrade et al., 1996; Nozaki, Engel, Dvorak, 1996, Jannin, Villa, 2007).

Os efeitos colaterais indesejáveis de ambos são o seu inconveniente principal. Os efeitos adversos observados com maior frequência no uso de nifurtimox são: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e complicações digestivas (náusea ou vômito, cólicas intestinais e diarreia). No tratamento com benznidazol, as manifestações cutâneas são as mais notórias, como hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia e dores articulares e musculares (Castro et al., 2006).

Desde a década de 1980, o nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul. Isso se deu em razão da resistência apresentada pelas cepas e, sobretudo, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (Coura, Castro, 2002).

O benznidazol é atualmente produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), único fabricante do medicamento no mundo, após ter recebido a transferência de tecnologia do laboratório multinacional Roche. Em 2011, o Lafepe suspendeu a produção do medicamento por falta do princípio ativo, cuja produção é de responsabilidade do laboratório privado Nortec. Por conta da falta de abastecimento do benznidazol, diversos programas de tratamento na América Latina ficaram sem estoque do medicamento por pelo menos um semestre. A disponibilidade futura do medicamento ainda não é conhecida (MSF, 2012).

Considerando as 10 milhões de pessoas em risco e a carga de infectados da doença, os recursos para pesquisa e desenvolvimento para a doença de Chagas são extremamente baixos, tornando esta uma das mais negligenciadas entre as doenças negligenciadas. Em 2007, menos de um milhão de dólares (0,04% dos recursos para pesquisa e desenvolvimento dedicados a doenças negligenciadas) foi utilizado no desenvolvimento de novos medicamentos para a doença de Chagas (Moran et al., 2009; Ribeiro et al., 2009).

Devido a estes fatores, a necessidade do desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Chagas é evidente e tem sido pontuada pela OMS (OMS, 2011b).

1.3. Estratégias para a pesquisa de compostos e alternativas para o tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas

A pesquisa de fármacos mais eficazes e que atendam aos padrões atuais de segurança é considerada uma prioridade para o controle da leishmaniose (OMS, 2010) e doença de Chagas (DNDi, 2011).

A pesquisa e o desenvolvimento de fármacos envolve o planejamento, a identificação e a síntese de compostos biologicamente ativos (protótipos), bem como o estudo do metabolismo, do mecanismo de ação e das relações entre a estrutura química e a atividade biológica destes protótipos (Lima, 2007; Wermuth, 2008).

Os dois principais gargalos do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos consistem na identificação do protótipo – ainda na etapa de descoberta – e na passagem do protótipo a candidato a fármaco, durante a etapa de desenvolvimento (Oprea, 2001; Lima, 2007). Devido aos gargalos entre estas etapas, os protótipos potenciais para doenças negligenciadas ficam frequentemente presos nos primeiros estágios do desenvolvimento (Pécoul, 2004).

A identificação do composto-protótipo constitui etapa chave no processo da descoberta de fármacos. Ao longo dos anos, diversas estratégias foram utilizadas em sua identificação, incluindo a triagem (*screening*) de compostos naturais e sintéticos, eleitos em função da diversidade estrutural e dos ensaios biológicos disponíveis (Lima, 2007).

1.3.1. Reposicionamento de fármacos

A triagem de fármacos desenvolvidos inicialmente para outro propósito representa uma das formas mais promissoras na introdução de novos compostos para doenças negligenciadas, sendo conhecida como reposicionamento de fármacos. Um grande número de fármacos que foram desenvolvidos para outras doenças tem sido utilizado com sucesso como terapia para doenças infecciosas em países em desenvolvimento. No tratamento da LV, um exemplo de reposicionamento é a miltefosina, inicialmente desenvolvida para o tratamento do câncer de mama (Sundar et al., 2002), a pentamidina, um agente hipoglicemiante, assim como a anfotericina B e os azóis, usados no tratamento de infecções fúngicas (Croft, Seifert, Yardley, 2006).

O reposicionamento tradicionalmente tem ocorrido ao acaso (Ashburn, Thor, 2004). Até o momento, estes estudos têm sido focados na triagem *in vitro*, no entanto, métodos de triagem computacional (*in silico*) também podem ser aplicáveis (Ekins et al., 2007).

Para as empresas farmacêuticas, o reposicionamento tem significativo valor comercial, uma vez que amplia o mercado para um composto, encontra novos usos para compostos arquivados e oferece menor risco financeiro e um período de tempo mais curto para obtenção dos lucros (Cavalla, 2009).

Os benefícios da reposição incluem: trabalhar com alvos conhecidos, a disponibilidade de materiais e de dados (como estudos de toxicologia de longo prazo) que podem ser usados e apresentados às

autoridades reguladoras, e, como resultado, o menor tempo de pesquisa e menores custos, em comparação ao tempo e aos custos tipicamente observados para trazer uma nova entidade molecular até o mercado (Ekins et al., 2011).

1.4. Justificativa e relevância

Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Como exemplos de doenças negligenciadas, podemos citar leishmaniose e doença de Chagas, entre outras. Segundo dados da OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (Decit, 2010).

Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (Decit, 2010).

Devido às limitações referentes aos medicamentos existentes no mercado, ao avanço da leishmaniose em várias regiões do mundo, aliados ao surgimento de parasitos não responsivos aos medicamentos e ao caráter oportunista da leishmaniose em pacientes co-infectados com HIV, a OMS caracteriza a leishmaniose como importante doença emergente, reconhecendo a necessidade de se priorizar a pesquisa em novas estratégias de tratamento (OMS, 2011a). A assembléia da OMS incentiva pesquisas que busquem encontrar alternativas seguras, efetivas e

acessíveis à medicina, para o tratamento oral, parenteral ou tópico da leishmaniose, envolvendo ciclos mais curtos de quimioterapia, menor toxicidade e associações de fármacos (OMS, 2007).

No Brasil, a LV é uma doença de notificação compulsória. Porém, estima-se que ocorra subnotificação da doença, devido, principalmente, ao não reconhecimento da mesma por parte de alguns profissionais de saúde. Ao longo dos anos nota-se que a LV está em franca expansão no Brasil, e isto é bem claro no Estado de São Paulo. A LV é uma doença atual de grande importância para saúde pública e que traz fortes impactos econômicos para o Brasil (Lindoso, Goto, 2006).

O tratamento atual da doença de Chagas apresenta baixa eficácia na fase crônica da doença, apresenta severos efeitos adversos e necessita de longo período de administração. Estima-se que apenas 1% dos pacientes de doença de Chagas recebe algum tipo de tratamento (Ribeiro et al., 2009). Portanto, a necessidade por medicamentos acessíveis, seguros e eficazes para crianças e adultos, bem como medicamentos que tratem ambas as fases da doença é urgente.

Diante do restrito arsenal terapêutico para o tratamento da leishmaniose e doença de Chagas, o presente trabalho se propõe ao estudo de alternativas terapêuticas para estas doenças negligenciadas. Para alcançar este objetivo, foram adotadas diferentes estratégias, como a avaliação da atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* de fármacos já usados no tratamento de outras patologias, como os bloqueadores de canal de cálcio (BCC), a furazolidona e a buparvaquona; a associação de fármacos de diferentes classes químicas e o desenvolvimento de formulações lipossomais, conforme apresentado nos capítulos a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a atividade anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* dos fármacos buparvaquona, furazolidona e dos BCC. Realizar combinações de BCC com os principais fármacos usados na clínica da LV. Desenvolver formulações lipossomais de nimodipino, furazolidona e buparvaquona.

2.2. Objetivos específicos

Capítulo 1

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania*, atividade anti-*T. cruzi* e citotoxicidade *in vitro* dos BCC.
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos após incubação com os BCC.
- Avaliar as alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* após a incubação com nimodipino
- Avaliar a eficácia *in vivo* dos BCC anlodipino, bepridil, fendilino, nimodipino livre e lipossomal.

Capítulo 2

- Realizar o estudo das correlações entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) dos BCC com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*.

Capítulo 3

- Realizar combinações *in vitro* dos BCC com os fármacos padrão em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

Capítulo 4

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade *in vitro* de furazolidona.
- Avaliar a produção de NO pelos macrófagos após incubação com furazolidona.
- Avaliar as alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* após a incubação com furazolidona.
- Avaliar a eficácia *in vivo* de furazolidona e sua formulação lipossomal

Capítulo 5

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade *in vitro* de buparvaquona.
- Avaliar a eficácia *in vivo* de buparvaquona e sua formulação lipossomal.

Capítulo 6

- Desenvolver uma formulação lipossomal de nimodipino, furazolidona e buparvaquona e avaliar sua eficácia em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*.

- Avaliar a captação e internalização de furazolidona lipossomal no baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*.

Capítulo 7

- Desenvolver um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) para quantificação de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* presente no baço e fígado de hamsteres infectados, para avaliação do tratamento experimental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e fármacos

Dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e metanol foram obtidos da Merck. Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), colesterol, lipopolissacarídeo (LPS), meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) e meio M-199 foram adquiridos da Sigma. Dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e isotianato de 5-fluoresceína (FITC) foram adquiridos da Molecular Probes. Fosfolipídeos hidrogenados foram doados por Lipoid GmbH. Demais reagentes foram adquiridos da Sigma.

Anrinona, azelnidipino, bepridil, cilnidipino, fendilino, furazolidona, lercanidipino, lidoflazina, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino e nitrendipino foram adquiridos da Sigma. Glucantime®, isetionato de pentamidina e anfotericina B desoxicolato de sódio foram obtidos da Sanofi-Aventis, Sideron e Cristália, respectivamente. Anlodipino e buparvaquona foram doados por Bayer e GlaxoSmithKline, respectivamente.

3.2. Parasitas

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *Leishmania (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *Leishmania (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin) e *Leishmania (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) foram cultivadas em meio 199 (M-199) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,25% de hemina, a 24 °C em estufa BOD, sem a adição de antibióticos. Amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram obtidos por meio de centrifugação diferencial de baço de hamsteres previamente infectados e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958) após 60-70 dias após a infecção.

Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidos em células LLC-MK2 (ATCC CCL 7) em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de SFB, a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂.

3.3. Células de mamíferos

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por meio de lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB. Macrófagos, monócitos THP-1 (human monocytes ATCC number TIB-202) e células LLC-MK-2 (*Rhesus* Monkey Kidney Cells - ATCC CCL 7) foram cultivados em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB e foram mantidos à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de CO₂.

3.4. Animais de experimentação

Hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsteres dourados foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos realizados com animais tiveram aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo (Anexo 12).

3.5. Determinação da CE₅₀ em promastigotas e tripomastigotas

Os compostos foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações em placas de 96 poços, em volume final de 150 µL. A CE₅₀ foi determinada após incubação dos parasitas com os diferentes compostos que foram serialmente diluídos (base 2) até o sétimo poço da microplaca, em duplicata. Em seguida foram adicionados os parasitas (1×10⁶/poço) e a placa foi incubada por 24 horas a 24 °C em estufa BOD. Foram utilizados promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* em meio M-199 e tripomastigotas de *T. cruzi* em meio RPMI-1640, ambos sem vermelho de fenol. Após 24 horas de incubação com os compostos, a viabilidade dos parasitas foi determinada por meio de ensaio colorimétrico com MTT da seguinte forma: os parasitas foram incubados por 4 horas com 20 µL/poço de MTT (5 mg/mL) e posteriormente incubados com 100 µL/poço de SDS 10% (v/v) por 24 horas. O sobrenadante foi lido a 550 nm em leitor de placas (Multiskan reader 30) (Tada et al., 1986; Tempone et al., 2004) e os valores de densidade óptica obtidos foram usados para confecção de gráficos dose-resposta utilizando-se o programa GraphPrism 5.0. Como controle do ensaio, foram usados pentamidina e benznidazol, poços com ausência de parasitas (0% de sobrevivência) e poços contendo parasitas incubados apenas com meio de cultura (100% de sobrevivência). Foi feito também o controle do solvente utilizado para dissolver os compostos (DMSO), sendo que o mesmo foi adicionado na proporção máxima de 0,05% do volume final do poço.

3.6. Determinação da CE₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

Os macrófagos (4×10⁵ por poço) foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente e

adicionados a lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços, permanecendo em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* extraídos de baço e separados por centrifugação foram adicionados aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago) e incubados com os diferentes compostos a 37 °C por um período de 120 horas. Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 500 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley, Croft, 2000). Como controle do ensaio, foi usado o fármaco Glucantime® e poços contendo macrófagos e amastigotas incubados apenas com meio RPMI-PR-1640 contendo 10% de SFB.

3.7. Determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos e do índice de seletividade

Para determinação da citotoxicidade contra células de mamíferos, foram utilizados monócitos THP-1 (1×10^4 células/poço), células LLC-MK2 (4×10^4 células/poço) e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (4×10^5 células/poço). Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos serialmente (base 2) em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol contendo 10% de SFB em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C em estufa a 5% de CO₂ e foi determinada a viabilidade celular por meio de ensaio colorimétrico com MTT como descrito anteriormente (Tada et al., 1986; Tempone et al., 2005). Como controle do ensaio, foram utilizados os fármacos pentamidina, anfotericina B ou benznidazol, poços com ausência de células (0% de sobrevivência) e poços contendo células incubadas apenas com meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB (100% de sobrevivência). O Índice de Seletividade (IS) dos compostos foi determinado por meio da seguinte expressão: CE₅₀ em células de mamífero/ CE₅₀ contra os parasitas.

3.8. Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada em eritrócitos de camundongos BALB/c (Conceição et al., 2006). Suspensões de 3% dos eritrócitos foram incubadas por 2 horas com os compostos dissolvidos em DMSO, diluídos serialmente em PBS em placas de 96 poços com fundo em forma de U. As placas foram incubadas a 25 °C e, posteriormente, o sobrenadante foi lido a 550 nm em leitor de placas (Multiskan reader 30). Utilizou-se como controle negativo (0% de hemólise) eritrócitos incubados apenas com PBS e como controle positivo (100% de hemólise) eritrócitos incubados com H₂O.

3.9. Avaliação da produção de NO

Macrófagos peritoneais foram obtidos conforme descrito anteriormente e incubados na presença dos compostos em placas de 24 poços por 24 horas a 37 °C. A produção de NO foi avaliada por meio da quantificação de nitrito pelo método de Griess em placas de 96 poços (Panaro et al., 1999). Lipopolissacarídeo (50 µg/mL) foi utilizado como controle positivo para produção de NO. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placas a 550 nm em leitor de placas (Multiskan reader 30).

3.10. Diagrama de Hasse, PCA e QSAR

Foram realizadas modelagens moleculares computacionais em software SPARTAN para Windows v. 4.0 (Wavefunction, Inc., Irvine, Calif.). Os compostos foram submetidos à otimização da geometria das estruturas e análise conformacional (análise sistemática com ângulo diédrico rotacionado a cada 30°). O método quântico semi-empírico AM1 foi usado (Austin Modelo 1) (Dewar et al., 1990). Moléculas de energia minimizada foram

salvas como MDL MolFiles por vários descritores moleculares usando o programa DRAGON Professional versão 5.4 (Talete, 2009).

Foram excluídas variáveis constantes, como também aquelas que apresentaram apenas um valor diferente da série (próxima variável constante). Para os descritores restantes, foi realizada a correlação de *pair wise* ($r < 0,99$) para excluir aqueles que fossem altamente correlacionados (Livingstone, 1995). Assim, o número de descritores GETAWAY usado nos cálculos foi reduzido a 89 descritores.

O programa MobyDigs foi usado para o cálculo de modelos de regressão que foram baseados em valores de pCE_{50} ($-\log CE_{50}$) usando algoritmos genéticos (Talete, 2006). A procura por melhores modelos (valor mais alto de coeficiente de predição interna Q^2_{cv}) foi realizada usando *ordinary least squares regressions* (OLS) com o Algoritmo Genético (GA), quer dizer, pelo método de *Variable Subset Selection-Genetic Algorithm* (VSSGA). Na terminologia de GA, uma população foi caracterizada por um conjunto de variáveis candidatas (a herança genética da população) e foi constituído pelos indivíduos e modelos feitos de uma ou mais variáveis de população (Leardi, Boggia, Terrile, 1992).

3.11. Determinação das interações entre fármacos *in vitro*

As possíveis interações entre os fármacos foram avaliadas *in vitro* por meio do método de isoblograma modificado (Fivelman et al., 2004). Os valores das CE_{50} pré-determinados foram utilizados para decidir as concentrações máximas dos fármacos individuais, assegurando a CE_{50} no quarto ponto da diluição seriada. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em meio RPMI-140. As concentrações máximas usadas nas soluções foram preparadas nas proporções de 5:0, 4:1, 3:4, 2:3, 1:4 e 0:5 dos fármacos A e B, que foram serialmente diluídos (base 2) até o sétimo poço da microplaca, em duplicata.

Promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram semeados a 1×10^6 por poço em um volume final de 200 μ L. A concentração inicial usada foi de 12 μ g/mL para anlodipino, 12 μ g/mL para bepridil, 100 μ g/mL para lecanidipino, 100 μ g/mL para nicardipino, 280 μ g/mL para nimodipino, 1,5 μ g/mL para pentamidina e 0,4 μ g/mL para anfotericina B. As placas foram incubadas por 24 horas a 24 °C em estufa BOD e a viabilidade dos promastigotas foi determinada pelo método colorimétrico de MTT, conforme descrito anteriormente.

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente e adicionados a placas de 16 poços (NUNC®) a 5×10^4 por poço, permanecendo em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C por 24 horas (Yardley, Croft, 2000). Amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* extraídos de baço e separados por centrifugação foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago). Após 24 horas de incubação, os macrófagos foram lavados com meio RPMI-PR-1640 para remoção dos parasitas não internalizados e, em seguida, foi adicionado meio contendo as associações dos compostos e seguiu-se incubação em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C por 72 horas. Após este período, o meio contendo as associações dos compostos foi renovado e seguiu-se incubação por mais 48 horas. A concentração inicial usada foi de 21 μ g/mL

para anlodipino, 72 µg/mL para nimodipino, 240 µg/mL para Glucantime® e 0,2 µg/mL para anfotericina B. Ao final do ensaio (120 horas), as lâminas foram coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley, Croft, 2000). Como controle do ensaio foram usados poços contendo macrófagos e amastigotas incubados apenas com meio RPMI-PR-1640 contendo 10% de SFB.

As Figuras 11 e 12 mostram o esquema utilizado nos ensaios de associação de fármacos em promastigotas e amastigotas.

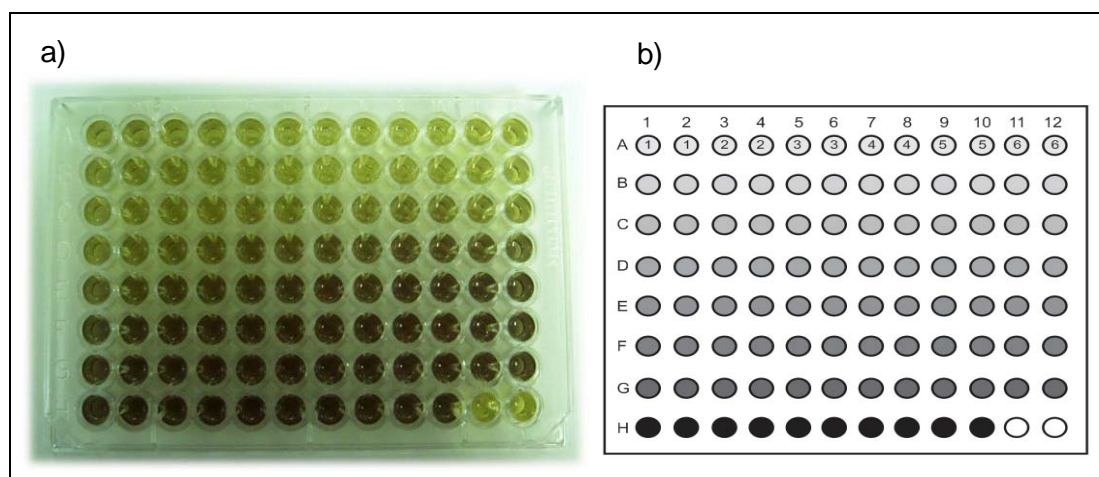


Figura 11: Ensaio de associação de fármacos em promastigotas. a) Imagem de uma placa de 96 poços contendo promastigotas *L. (L.) infantum chagasi*, após incubação com seis combinações de dois fármacos, e posterior incubação com MTT; b) Esquema de um ensaio de associação de fármacos em placa de 96 poços.

Os círculos em preto indicam os poços que contêm os controles positivos (ausência de fármaco; 0% de inibição) e os círculos em cinza indicam os poços onde os fármacos foram combinados em seis proporções (5:0, 4:1, 3:4, 2:3, 1:4 e 0:5, em duplicata), indicados pelos números 1 a 6, e foram serialmente diluídos até a linha G.

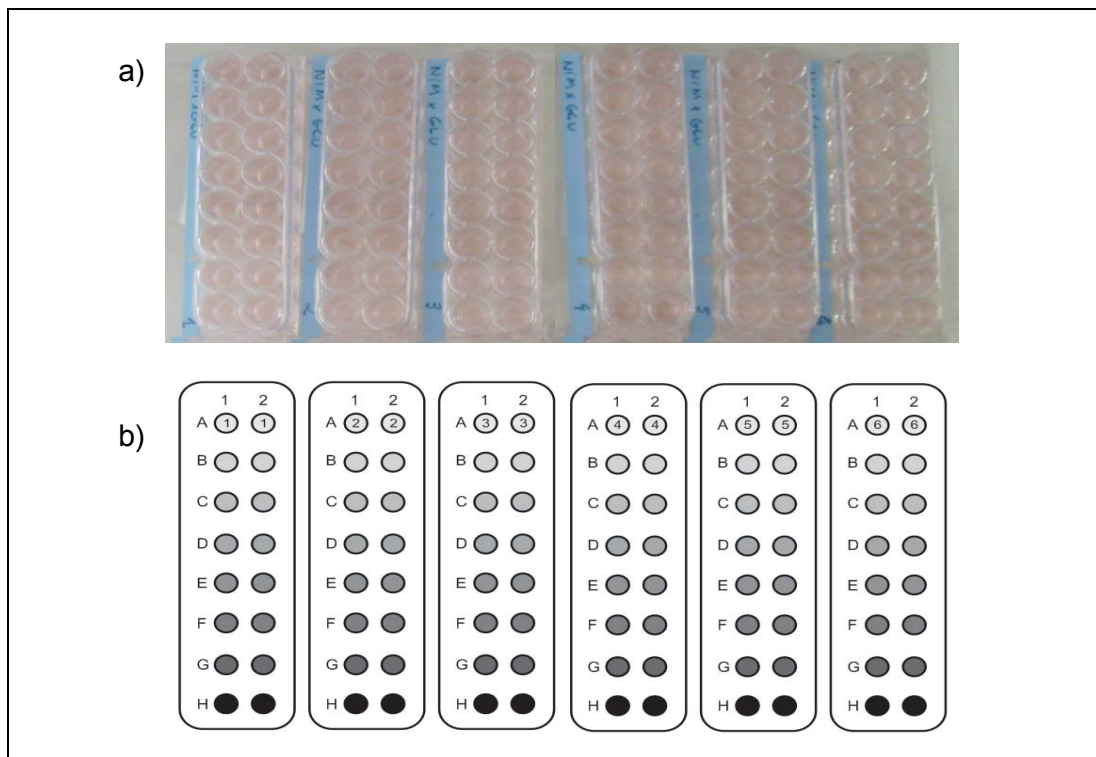


Figura 12: Ensaio de associação de fármacos em amastigotas. a) Imagem de uma placa de 16 poços (NUNC®) contendo amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*, após incubação com seis combinações de dois fármacos; b) Esquema de um ensaio de associação de fármacos em placas de 16 poços.

Os círculos em branco indicam os poços que contêm os controles negativos (ausência de fármaco e parasitas; 100% de inibição), os círculos em preto indicam os poços que contêm os controles positivos (ausência de fármaco; 0% de inibição) e os círculos em cinza indicam os poços onde os fármacos foram combinados em seis proporções (5:0, 4:1, 3:4, 2:3, 1:4 e 0:5, em duplicata), indicados pelos números 1 a 6, e foram serialmente diluídos até a linha G.

3.12. Determinação das CIFs e classificação das associações

Foram calculadas as concentrações inibitórias fracionárias (CIFs), o somatório das CIFs ($\sum \text{CIF}$) e a média do somatório das CIFs ($\bar{x} \sum \text{CIF}$) da seguinte maneira:

- $\text{CIF} = \frac{\text{CE}_{50} \text{ fármaco em associação}}{\text{CE}_{50} \text{ fármaco individual}}$
- $\sum \text{CIF} = \text{CIF fármaco A} + \text{CIF fármaco B}$
- $\bar{x} \sum \text{CIF} = \frac{\text{soma das } \sum \text{CIF}}{4}$

Foram contruídos isobogramas a partir dos valores de CE_{50} e também a partir dos valores de CIF, conforme segue:

- Os valores de CE_{50} das associações foram plotados e os valores de CE_{50} de cada fármaco aplicado isoladamente foram unidos, gerando a isóbole de aditividade. Em torno da isóbole de aditividade foram traçadas linhas unindo os intervalos de confiança 95% bilaterais de cada um dos fármacos isolados, formando faixas de confiança.
- Os valores de CIF foram plotados e os valores de CIF de cada fármaco aplicado isoladamente foram unidos, gerando a isóbole de aditividade.

As $\bar{x} \sum \text{CIF}$ foram utilizadas para classificar as associações entre os fármacos avaliados, conforme segue (Odds, 2003):

- $\bar{x} \sum \text{CIF} < 0,5$: sinergismo;
- $\bar{x} \sum \text{CIF} > 0,5$ e ≤ 4 : associação indiferente;
- $\bar{x} \sum \text{CIF} > 4$: antagonismo.

De acordo com a configuração gráfica mostrada no isoblograma, as associações entre os fármacos avaliadas foram assim classificadas (Figura 13):

- Pontos localizados abaixo da isóbole de aditividade: sinergismo;
- Pontos localizados em torno da isóbole de aditividade: associação indifferente;
- Pontos localizados acima da isóbole de aditividade: antagonismo.

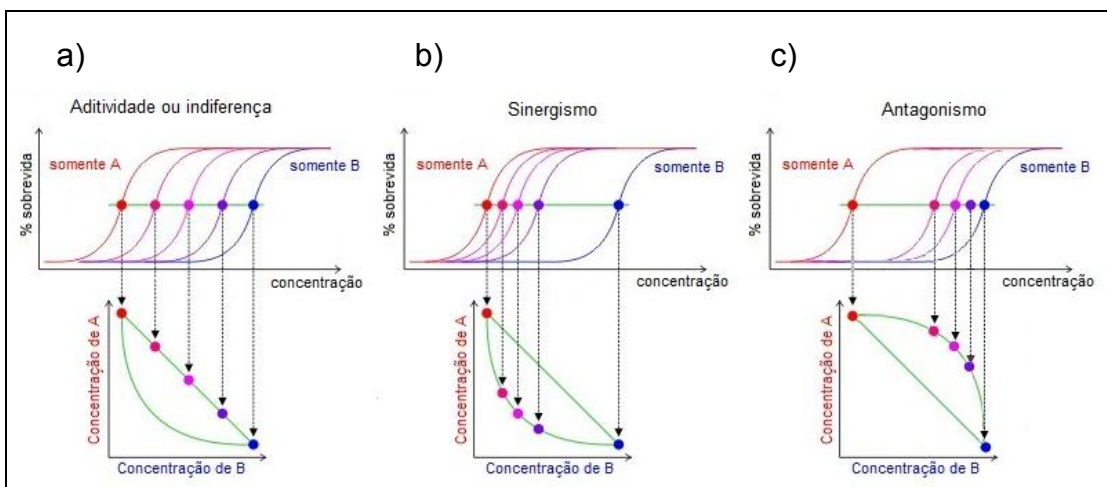


Figura 13: Representação gráfica de um isoblograma. Associação de dois fármacos (A e B) e os possíveis tipos de interação: aditividade (a) ou indiferença; sinergismo (b) e antagonismo (c).

3.13. Avaliação das alterações ultraestruturais causadas por nimodipino e furazolidona

Com o objetivo de observar as alterações causadas em *Leishmania* após a incubação com os fármacos em estudo, os mesmos foram incubados com promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (5×10^6 /poço) por diferentes períodos, até observação de 100% de morte dos parasitas. Ao final do ensaio os parasitas foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e lavados 3 vezes em PBS. O material foi fixado em solução

de glutaraldeído 4%, incluído em tetróxido de ósmio por 30 minutos, gradualmente desidratado em etanol e aplicado a resina Epon 812 (Duarte et al., 1992). O material foi então analisado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL no Instituto Adolfo Lutz.

3.14. Preparo de formulações lipossomais

Os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação de lipídeos seguido por *freeze-thawing* (congelamento em nitrogênio líquido seguido por descongelamento), e sonicação, seguido ou não por extrusão por membranas de policarbonato (Szoka, Papahadjopoulos, 1980). Para preparação dos lipossomos, fosfatidilcolina saturada de ovo, fosfatidilserina e colesterol foram usadas na proporção de 7:2:1.

3.15. Determinação do diâmetro médio dos lipossomos

Uma alíquota dos lipossomos, logo após serem preparados, foi fixada por 5 minutos em tela para microscopia. Em seguida, o material foi seco em papel de filtro e adicionou-se uma gota de ácido fosfotúngstico a 1%. Após 5 minutos, o material foi novamente seco em papel de filtro e observado sob microscópio eletrônico de transmissão (JEOL) no Instituto Adolfo Lutz.

3.16. Dosagem de fosfolipídeos e quantificação do encapsulamento

Após o preparo dos lipossomos, o material foi centrifugado (4000 x g por 15 minutos) para separação do fármaco não encapsulado e a

concentração final de fosfolipídeos foi determinada pelo método de Stewart (1980).

Este ensaio foi realizado com uma amostra de lipossomos em tubo de ensaio (duplicata), seguido da adição de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de solução de Stewart (27,03 g de tiocianato de amônio NH_4SCN e 30,4 g cloreto férrico hexaidratado- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em H_2O Milli-Q qsp 1000 mL). Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e a leitura da fase orgânica (clorofórmio) foi realizada em espectrofotômetro a 488 nm. Utilizou-se como referência uma curva padrão com os dois fosfolipídios usados nos lipossomos. Os resultados foram analisados em curva de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0.

A concentração de fármaco encapsulado foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Proeminência LC-20; Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) em coluna C18 (4,6 mm × 250 mm, partículas de 5 μm).

3.17. Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo*

Para se avaliar a atividade anti-*Leishmania in vivo* dos fármacos e formulações lipossomais, foram realizados estudos em hamsteres dourados machos recém-desmamados infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Amastigotas purificados de baço de hamsteres previamente infectados foram inoculados por via intraperitoneal, utilizando-se um n = 5 para cada grupo. Glucantime (50 mg/kg/dia por via i.p.) foi utilizado como referência. O grupo controle recebeu o veículo usado para diluir os fármacos (PBS, Cremophor e etanol na proporção de 80:15:5 - v/v), ou lipossomos sem adição de fármaco. A porcentagem de inibição foi calculada para todos os grupos tratados em relação ao grupo não tratado. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 , sendo removidos o baço e o fígado e imediatamente pesados. As doses e esquemas utilizados no tratamento

experimental dos fármacos anlodipino, bepridil, buparvaquona, fendilina, furazolidona e nimodipino são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Doses e esquemas utilizados no tratamento experimental dos fármacos anlodipino, bepridil, buparvaquona, fendilina, furazolidona e nimodipino.

Fármaco ou formulação	Inóculo ¹	Início ²	Duração ³	Dose ⁴	Quantificação ⁵
Anlodipino	1,8×10 ⁸	45	10	10	qPCR
Bepridil	1×10 ⁸	45	10	12	qPCR
Buparvaquona	1×10 ⁸	43	8	20	qPCR
Buparvaquona LP	1×10 ⁸	43	8	0,33	qPCR
Fendilina	1,8×10 ⁸	45	10	3	qPCR
Furazolidona	1×10 ⁸	45	12	50	LDU
Furazolidona LP	1×10 ⁸	45	12	0,5	LDU
Nimodipino	1,8×10 ⁸	45	10	40	qPCR
Nimodipino LP	1,8×10 ⁸	45	10	0,86	qPCR

LP: formulação lipossomal; ¹Número de amastigotas inoculado por animal; ²Início do tratamento (dias após o inóculo); ³Duração do tratamento (dias); ⁴Dose administrada por animal (mg/kg/dia); ⁵Método empregado para quantificação da carga parasitária.

3.18. Quantificação da carga parasitária *in vivo* por LDU

Foram confeccionadas lâminas por *imprinting* de baço e fígado, após fixação com metanol e coloração com Giemsa. Em seguida, foi realizada a contagem do número de amastigotas por 500 células nucleadas, e este valor foi multiplicado pela massa do órgão para obtenção da LDU (Leishman Donovan Units) (Bradley, Kirkley, 1977).

3.19. Quantificação da carga parasitária *in vivo* por qPCR

Para avaliação do tratamento por qPCR, foram removidos fragmentos do baço e fígado (aproximadamente 200 mg) com o auxílio de material cirúrgico estéril descartável e individual para cada animal. Os fragmentos foram colocados em tubos de microcentrifuga estéreis e foram pesados. Em seguida, os fragmentos foram congelados por 24 horas, para extração de RNA. O número absoluto de parasitas presentes em cada amostra (baço e fígado) foi determinado pelo uso de curva padrão, conforme descrito a seguir.

3.19.1. Extração de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* e síntese de cDNA

Amostras de baço e fígado foram processadas conforme protocolo básico de extração de RNA com colunas de afinidade. Os fragmentos de órgãos foram congelados e mantidos a -80 °C, macerados ainda congelados e lisados com tampão específico do kit (Spin Tissue RNA Mini Kit, Invisorb). Após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído por colunas de afinidade e congelado imediatamente. A seguir, as amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de 11 µL do RNA foi adicionado 1 µL de uma mistura contendo os quatro dNTP's e 1 µL de *random primers*. A seguir as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65 °C. Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos. Ao final deste período, foram adicionados 2 µL de DTT e 4 µL de tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3; KCl, 375 mM; MgCl₂ 15 mM) e colocados novamente no termociclador por 20 segundos a 37 °C. Após os 20 segundos, adicionou-se 1 µL da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase).

O grau de pureza das amostras foi analisado em Nanodrop ND100 (Sambrook et al.,1989). Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR convencional, estas foram congeladas a -20 °C para posterior uso em qPCR.

O aparelho de PCR em tempo real conferiu automaticamente a cada segundo o sinal fluorescente e calculou o sinal de fundo da reação. O sistema detectou o sinal gerado pela fluorescência criada pelo acúmulo de DNA amplificado. Os resultados foram mostrados como valor de limiar de ciclo (*cycle threshold* - C_T) que informa a quantidade de gene alvo ao qual a fluorescência excedeu um limiar prefixado e foi automaticamente determinado pelo equipamento.

3.19.2. PCR em tempo real *single*

O marcador molecular HP(LJ31) foi selecionado para a construção de um marcador para PCR em tempo real (LinJ31), devido a sua melhor performance e boa visualização no gel de agarose. Os marcadores foram desenhados no programa Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems).

Para a PCR em tempo real foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-*end* foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxi-fluoresceína). Na extremidade 3'-*end*, foi ligado um *quencher* NFQ (*non-fluorescent quencher*). O desenho das sequências foi: LINJ31F: 5'- CCG CGT GCC TGT CG -3'; LINJ31R 5'- CCC ACA CAA GCG GGA ACT -3' e a sonda TaqMan 5'- CCTCCTTGGACTTTGC -3'. As reações foram realizadas em sistema ABI 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems), num volume final de 20 µL por reação. Ao volume de 3 µL de DNA ou cDNA (amostras ou controles) foram adicionadas um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e 1 µL de uma mistura que inclui os marcadores *forward* e o *reverse* na concentração de 18 µM, e a sonda

TaqMan, marcada com FAM, usando NFQ como *quencher* na concentração de 5 µM. As amplificações usaram dois controles negativos e um controle positivo, assim como nas reações de PCR convencional. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50 °C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa constituiu-se de um ciclo a 95 °C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto.

3.19.3. Construção da curva padrão de DNA

A curva padrão de DNA de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi construída por meio de contagem de promastigotas em câmara de Neubauer. Os parasitas foram cultivados conforme descritos anteriormente e foram centrifugados a 1.000 x g por 10 min e lavados duas vezes em PBS (pH 7,2). Diferentes concentrações de *L. (L.) infantum chagasi* foram preparadas para obtenção dos pontos na curva padrão que variaram de 10² a 10⁸ formas. Os parasitas foram dissolvidos em 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,01% *N*-laurilsarcozil e 100 µg/mL de proteinase K, agitados em vórtice e incubados a 56 °C até completa lise celular. O DNA foi extraído utilizando-se o kit PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Foram obtidas amostras de RNA de fragmentos de baço e fígado coletados de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e uma amostra foi coletada de animal saudável e usado como controle negativo. As moléculas de RNA foram extraídas e purificadas usando o Mini kit Spin Tissue RNA (Invisorb) conforme instruções do fabricante.

3.20. PCR convencional e seleção dos *primers*

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega) contendo dois corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µL do *mix* continha uma unidade de Taq DNA polimerase em 10 mM, Tris-HCl, pH 8,5; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos dNTP's. Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µL do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular num volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador (LongGene).

As PCRs realizadas a partir do DNA e do cDNA foram executadas da mesma forma. Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação. A cada conjunto de reações foram adicionados dois controles negativos, um contendo água miliQ e outro contendo DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania sp.*; e um controle positivo, extraído de cultura de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/LD/strain 46).

A detecção do DNA de *Leishmania* nas amostras de fígado e baço foi realizada com os *primers* RV1/RV2 (5'- CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G -3' e 5'- CCA CCT GGC CTA TTT TAC ACC A -3'), marcador molecular que identifica *L. (L.) infantum chagasi* e amplifica um fragmento de 145 pb de uma região variável do minicírculo do kDNA (região LT1), específica para o complexo *L. (L.) donovani* (Ravel et al., 1995, Le Fichoux et al., 1999; Gomes et al., 2007). As amplificações foram constituídas de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos. A segunda etapa constituiu-se de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento (60 °C por 30 segundos) e extensão (72 °C por 30 segundos) repetida por 30 ciclos. A última etapa constituiu-se de um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

3.21. Estudos de biodistribuição

Os hamsters foram previamente infectados i.p. com 1×10^8 amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Após 60 dias, os lipossomos contendo furazolidona e marcados com o fluoróforo DIL C18, foram administrados aos animais (300 μ L/animal, n = 4) e após 7 horas os animais foram eutanaziados e foram removidos fígado, baço, medula óssea e cérebro. O material foi fixado em solução de formaldeído a 3,5%, lavados em PBS e permeabilizados com solução de PGN (PBS, 0,2% gelatina e 0,15% NaN_3) contendo 0,1% de saponina e posteriormente submetidos a marcação. O material foi incubado por 1 hora com soro de cão positivo para *L. (L.) infantum chagasi*, lavado por três vezes com PBS e incubados por 1 hora com o conjugado anti-cão IgG e 10 μ M de DAPI (Molecular Probes, Eugene OR, EUA) para marcação de estruturas ricas em DNA. O material foi observado em um microscópio confocal BioRad 1024UV, na Escola Paulista de Medicina, utilizando-se objetiva de 100 \times em contraste de fase. O programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para análise da intensidade de distribuição da fluorescência, e para ajustes de contraste e claridade, assim como para combinar as imagens. Seções sequenciais ópticas (z-series) foram realizadas utilizando-se o programa Voxx (<http://www.nephrology.iupui.edu/imaging/voxx/>) ou Huygens Essential (www.svi.nl). As imagens também foram observadas em microscópio de fluorescência convencional Olympus BX-51 com objetiva de 100X e contraste de fase. As imagens foram adquiridas com um sistema Olympus DP71 CCD camera, operando com o Image-Pro Plus (Version 6.2, MediaCybernetics, USA).

3.22. Análises estatísticas

Os resultados representam a média e o desvio padrão de ensaios realizados em duplicatas em dois ensaios independentes. As CE_{50} das substâncias e combinações, os gráficos de isobograma, os intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares foram determinados pelo software Graph Pad Prism 5.0. As diferenças entre as amostras foram estatisticamente avaliadas por meio dos valores de p (Mann-Whitney, unpaired two-tailed).

CAPÍTULO 1

Bloqueadores de canal de cálcio

1. INTRODUÇÃO

Os bloqueadores de canal de cálcio (BCC) constituem uma classe de fármacos que agem inibindo seletivamente a entrada de cálcio através da membrana celular ou liberando cálcio em reservatórios intracelulares. Como são indutores do relaxamento do músculo liso vascular, eles são usados no tratamento da hipertensão e dos espasmos cerebrovasculares, como agentes protetores do miocárdio e no relaxamento de espasmos uterinos (Abernethy, Schwartz, 1999). Constituem um grupo heterogêneo de fármacos que compõe três famílias distintas: os derivados das 1,4-diidropiridinas (como, por exemplo, anlodipino nifedipino e lacidipino), os benzotiazepínicos (como, por exemplo, diltiazem) e as fenilalquilaminas (como, por exemplo, verapamil) (Motro et al 2001).

Alguns BCC têm sido considerados promissores candidatos antiparasitários, como por exemplo, nifedipino e verapamil, que bloqueiam a ligação de amastigotas de *L. (L.) donovani* aos macrófagos previamente tratados, sugerindo um papel importante do cálcio durante a infecção de novos macrófagos pelo parasita (Misra et al., 1991). Foi relatado que alguns BCC podem reverter parcialmente a multirresistência a fármacos, provavelmente pelo acúmulo no interior celular. Esse efeito foi observado em cepas resistentes de *Plasmodium falciparum* (Martin et al., 1987), *L. (L.) donovani* e *Trypanosoma cruzi* (Neal et al., 1989; Valiathan et al., 2006). Além disso, existem relatos de atividade *in vitro* e *in vivo* das 1,4-diidropiridinas anlodipino e lacidipino contra *L. (L.) donovani* (Palit, Ali, 2008). Com base no exposto, o presente trabalho avaliou a atividade anti-*Leishmania* dos BCC, visando contribuir para a descoberta de novas alternativas para o tratamento da Leishmaniose e doença de Chagas.

2. RESULTADOS

2.1. Determinação da atividade antiparasitária e citotoxicidade

Foi realizada a determinação da atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* e da citotoxicidade contra monócitos THP-1 e células LLC-MK2 de treze BCC (anlodipino, anrinona, azelnidipino, bepridil, cilnidipino, fendilina, lercanidipino, lidoflazina, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino e nitrendipino). Os valores de CE₅₀ contra os parasitas são mostrados em µg/mL e µM nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os valores de citotoxicidade e IS são apresentados na Tabela 4.

Não foi possível avaliar a CE₅₀ do azelnidipino sobre amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi* devido à sua baixa seletividade (CE₅₀ contra amastigotas próximo ao CE₅₀ contra células de mamíferos). Anrinona e mibefradil não apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares. Os valores de CE₅₀ dos demais BCC sobre amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* variaram de 2 a 61 µg/mL (Tabela 2).

Os valores de CE₅₀ e IS dos fármacos padrão pentamidina, Glucantime e benznidazol são mostrados na Tabela 5.

Tabela 2: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* dos BCC em estudo. Valores expressos em µg/mL.

Composto	CE ₅₀ (µg/mL) (IC 95%)					
	Promastigotas <i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i>	Amastigotas <i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i>	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	Promastigotas <i>L. (L.) major</i>	Promastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i>	Tripomastigotas <i>T. cruzi</i>
Anlodipino	1,07 (0,99 - 1,17)	2,19 (2,19 - 2,19)	1,20 (1,05 - 1,37)	1,37 (0,97 - 1,93)	1,28 (1,16 - 1,40)	3,30 (3,04 - 3,58)
Anrinona	na	na	na	nd	na	115,7 (96,43 - 138,8)
Azelnidipino	19,46 (15,39 - 24,62)	nd	11,97 (9,07 - 15,78)	9,94 (8,70 - 11,36)	7,97 (7,33 - 8,67)	1,69 (1,62 - 1,77)
Bepiril	1,40 (1,13 - 1,73)	2,19 (2,15 - 2,24)	1,73 (1,21 - 2,48)	2,69 (2,54 - 2,84)	1,30 (1,15 - 1,46)	1,58 (1,41 - 1,78)
Cilnidipino	16,26 (13,12 - 20,14)	14,00 (13,05 - 15,01)	54,51 (45,75 - 64,93)	10,56 (9,92 - 11,24)	7,52 (7,28 - 7,76)	2,77 (2,21 - 3,47)
Fendilina	6,93 (3,77 - 12,73)	3,67 (3,30 - 4,08)	2,70 (2,33 - 3,13)	nd	2,87 (2,64 - 3,13)	3,71 (2,89 - 4,76)
Lercamidipino	11,73 (10,34 - 13,31)	6,34 (6,19 - 6,49)	10,37 (8,98 - 11,97)	7,07 (6,42 - 7,79)	6,32 (5,67 - 7,04)	5,16 (3,62 - 7,35)
Lidoflazina	8,67 (8,23 - 9,14)	7,70 (5,82 - 10,19)	5,63 (4,94 - 6,40)	nd	7,10 (6,59 - 7,65)	5,03 (4,19 - 6,03)
Mibefradil	1,72 (1,61 - 1,84)	ne	1,09 (0,90 - 1,31)	nd	1,34 (1,17 - 1,55)	1,46 (1,27 - 1,69)
Nicardipino	17,10 (16,60 - 17,62)	10,55 (9,89 - 11,25)	12,71 (11,47 - 14,09)	10,47 (9,38 - 11,68)	9,15 (7,75 - 10,82)	5,08 (4,89 - 5,29)
Nifedipino	50,71 (41,92 - 61,34)	61,04 (58,77 - 63,40)	40,83 (37,15 - 44,88)	62,72 (46,80 - 84,05)	33,16 (29,70 - 37,04)	35,24 (29,64 - 41,90)
Nimodipino	34,68 (33,10 - 36,33)	9,14 (6,39 - 13,07)	56,60 (39,74 - 80,60)	15,77 (12,56 - 19,80)	17,91 (17,08 - 18,79)	13,52 (11,61 - 15,73)
Nitrendipino	23,11 (17,59 - 30,36)	15,80 (15,47 - 16,13)	13,81 (11,61 - 16,41)	11,99 (10,98 - 13,10)	14,07 (12,15 - 16,30)	9,69 (8,49 - 11,06)

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%; na: não ativo; nd: não determinado.

Tabela 3: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* dos BCC em estudo. Valores expressos em µM.

Composto	CE ₅₀ (µM) (IC 95%)					
	Promastigotas <i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i>	Amastigotas <i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i>	Promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	Promastigotas <i>L. (L.) major</i>	Promastigotas <i>L. (V.) braziliensis</i>	Tripomastigotas <i>T. cruzi</i>
Anlodipino	2,61 (2,42 – 2,86)	5,35 (4,35 – 6,35)	2,93 (2,56 – 3,35)	3,35 (2,37 – 4,72)	3,13 (2,83 – 3,42)	8,07 (7,43 – 8,75)
Anrinona	na	na	na	nd	na	na
Azelnidipino	33,39 (26,43 – 42,25)	nd	20,54 (15,56 – 27,08)	17,06 (14,93 – 19,49)	13,67 (12,58 – 14,88)	2,90 (2,78 – 3,03)
Bepridil	3,81 (3,43 – 4,25)	21,55 (21,22 – 21,90)	4,71 (3,30 – 6,76)	7,33 (6,92 – 7,74)	3,54 (3,13 – 3,98)	4,31 (3,84 – 4,85)
Cilnidipino	33,01 (26,63 – 40,89)	28,42 (26,49 – 30,47)	110,67 (92,88 – 131,83)	21,44 (20,14 – 22,82)	15,26 (14,78 – 15,75)	5,62 (4,48 – 7,04)
Fendilina	21,97 (11,95 – 40,35)	11,63 (10,46 – 13,93)	8,56 (7,39 – 9,92)	nd	9,09 (8,37 – 9,92)	11,76 (9,16 – 15,09)
Lercamidipino	19,17 (16,90 – 21,75)	10,36 (10,11 – 10,60)	16,95 (14,67 – 19,56)	11,55 (10,49 – 12,73)	10,33 (9,26 – 11,50)	8,43 (5,91 – 12,01)
Lidoflazina	17,63 (16,74 – 18,59)	15,66 (11,84 – 20,73)	11,45 (10,05 – 13,02)	nd	14,44 (13,40 – 15,56)	10,23 (8,52 – 12,26)
Mibefradil	3,47 (3,49 – 3,71)	na	2,20 (1,81 – 2,64)	nd	2,70 (2,36 – 3,13)	2,94 (2,56 – 3,41)
Nicardipino	35,66 (34,61 – 36,74)	22,00 (20,62 – 23,46)	26,50 (23,91 – 29,38)	21,83 (19,56 – 24,35)	19,08 (16,16 – 22,56)	10,59 (10,19 – 11,03)
Nifedipino	146,41 (121,03 – 177,11)	176,24 (169,69 – 183,05)	117,89 (107,26 – 129,58)	181,09 (135,12 – 242,68)	95,74 (85,75 – 106,94)	101,75 (85,58 – 120,98)
Nimodipino	82,68 (83,33 – 197,11)	21,62 (15,05 – 30,99)	128,16 (83,33 – 197,11)	31,04 (24,68 – 39,05)	42,80 (40,81 – 44,90)	32,31 (27,74 – 37,59)
Nitrendipino	64,13 (48,81 – 84,24)	43,84 (42,92 – 44,76)	38,32 (32,21 – 45,53)	33,27 (30,46 – 36,35)	39,04 (33,71 – 45,23)	26,88 (23,55 – 30,69)

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%; na: não ativo; nd: não determinado.

Tabela 4: Valores de CE₅₀ contra células de mamífero e IS dos BCC em estudo.

Composto	CE ₅₀ (IC 95%)		IS	
	Citotoxicidade LLC-MK2 (µg/mL)	Citotoxicidade LLC-MK2 (µM)	Amastigotas <i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i>	Tripomastigotas <i>T. cruzi</i>
Anlodipino	28,96 (10,83 - 77,46)	70,82 (26,48 - 189,44)	13,3	8,77
Anrinona	> 500	> 2671	nd	> 4,30
Azelnidipino	19,51 (19,42 - 19,59)	33,48 (33,33 - 33,62)	nd	11,54
Bepidil	24,66 (20,54 - 29,61)	67,27 (56,03 - 80,78)	3,12	15,61
Cilnidipino	109,1 (93,38 - 127,4)	221,51 (189,59 - 258,67)	7,79	39,41
Fendilina	15,52 (13,15 - 18,30)	49,20 (41,69 - 58,01)	4,2	4,18
Lercamidipino	266,1 (248,6 - 284,9)	434,99 (406,39 - 465,73)	42,0	51,60
Lidoflazina	43,94 (23,87 - 80,88)	89,38 (48,55 - 164,52)	5,70	8,73
Mibefradil	5,91 (5,42 - 6,44)	11,92 (10,93 - 12,99)	nd	4,05
Nicardipino	34,33 (29,69 - 39,70)	71,59 (61,91 - 82,79)	3,25	6,76
Nifedipino	203,9 (140,2 - 296,5)	588,73 (404,81 - 856,10)	4,21	11,55
Nimodipino	40,25 (36,12 - 44,85)	96,19 (95,87 - 96,50)	4,45	2,98
Nitrendipino	49,63 (45,91 - 53,66)	137,72 (127,40 - 148,91)	3,14	5,12

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%; nd: não determinado; IS: Índices de Seletividades dos BCC, dados pela razão entre a toxicidade para LLC-MK-2 e a atividade antiparasitária.

Tabela 5: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp., *T. cruzi* e citotoxicidade dos fármacos padrão.

	CE ₅₀ (µg/mL) (IC 95%)			CE ₅₀ (µM) (IC 95%)		
	Pentamidina	Glucantime	Benznidazol	Pentamidina	Glucantime	Benznidazol
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> (promastigotas)	0,38 (0,30 - 0,49)	nd	nd	0,80 (0,05 - 1,56)	nd	nd
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> (amastigotas)	nd	30,13 (28,97 - 31,33)	nd	nd	nd	nd
<i>L. (L.) amazonensis</i> (promastigotas)	0,17 (0,15 - 0,18)	nd	nd	0,51 (0,35 - 0,67)	nd	nd
<i>L. (L.) major</i> (promastigotas)	0,16 (0,17 - 0,20)	nd	nd	0,37 (0,16 - 0,59)	nd	nd
<i>L. (V.) braziliensis</i> (promastigotas)	0,052 (0,046 - 0,06)	nd	nd	0,13 (0,01 - 0,26)	nd	nd
<i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)	Nd	nd	44,86 (25,9 - 77,5)	Nd	nd	187,87 (83,74 - 292,01)
THP-1	2,84 (2,06 - 3,93)	> 500	> 500	nd	> 1366	> 1400
LLC-MK2	8,72 (7,47 - 10,19)	> 500	> 500	23,48 (19,95 - 27,01)	> 1366	> 1400

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%; nd: não determinado.

A incubação dos BCC (anlodipino, azelnidipino, bepridil, cilnidipino, lercanidipino, nicardipino, nimodipino e nitrendipino) com hemácias de camundongo resultou em atividade hemolítica menor que 10% na concentração de 50 µg/mL (Figura 14) e ausência de hemólise em concentrações menores. Os demais BCC não foram avaliados.

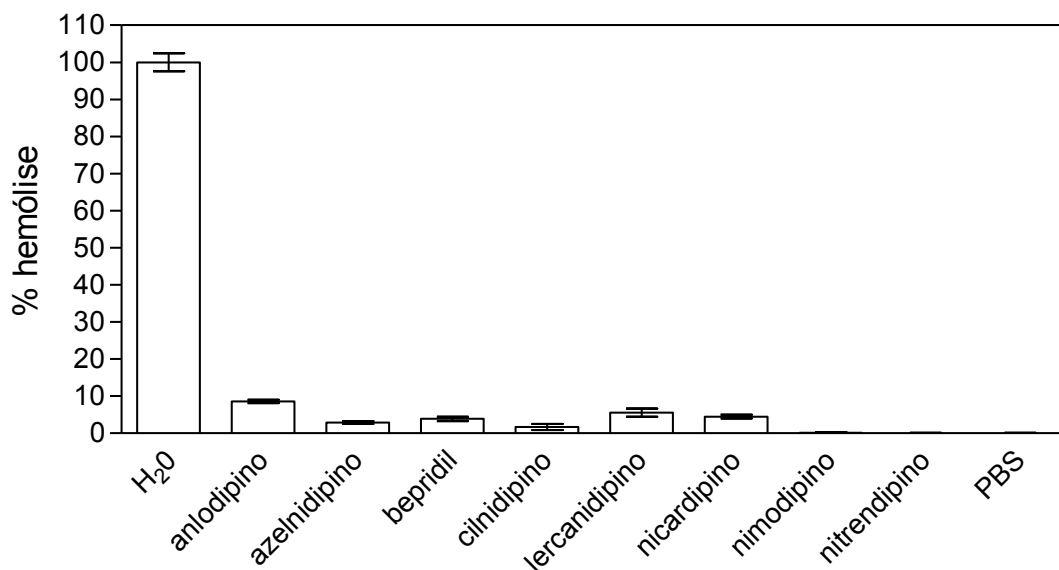


Figura 14: Efeito dos BCC em eritrócitos de camundongos BALB/c à 50 µg/mL. Água foi utilizada como controle positivo (100% de hemólise) e PBS como controle negativo (0% de hemólise).

2.2. Avaliação da produção de NO

A incubação dos BCC (anlodipino, azelnidipino, bepridil, cilnidipino, lercanidipino, nicardipino, nimodipino e nitrendipino) com macrófagos peritoneais resultou em ausência na produção de NO após 24 horas de incubação na concentração próxima ao valor de CE₅₀ (Figura 15). Os demais BCC não foram avaliados.

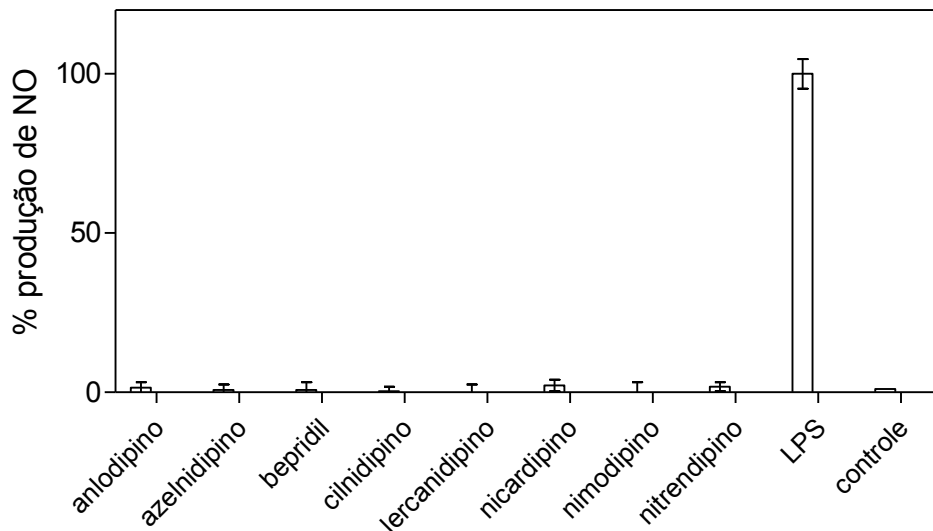


Figura 15: Dosagem da produção de NO por macrófagos após incubação com os BCC.

2.3. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* causadas por nimodipino

Os danos ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* causados pela incubação com nimodipino foram observados após diferentes períodos (Figura 16). Após duas horas de incubação, a morfologia geral das células não foi alterada, porém, um aumento dos vacúolos intracitoplasmáticos foi observado (Figura 16b). A membrana plasmática do parasita foi também afetada, como indicam as setas. Não foram observadas alterações no núcleo, porém observou-se um aumento nas mitocôndrias e cinetoplastos. Após quatro horas de incubação, a membrana nuclear foi claramente afetada, com destacamento da bicamada (Figura 16e), porém a morfologia geral da célula foi preservada. Foi observado um grande número de vacúolos intracitoplasmáticos, mitocôndrias ampliadas (Figura 16c) e descolamento da membrana plasmática (Figura 16f, setas). Após seis horas de incubação, a fusão dos vacúolos citoplasmáticos pode ter ocorrido, já que grandes vacúolos foram observados dentro das células com uma perda intensa de organelas intracitoplasmáticas (Figura 16d).

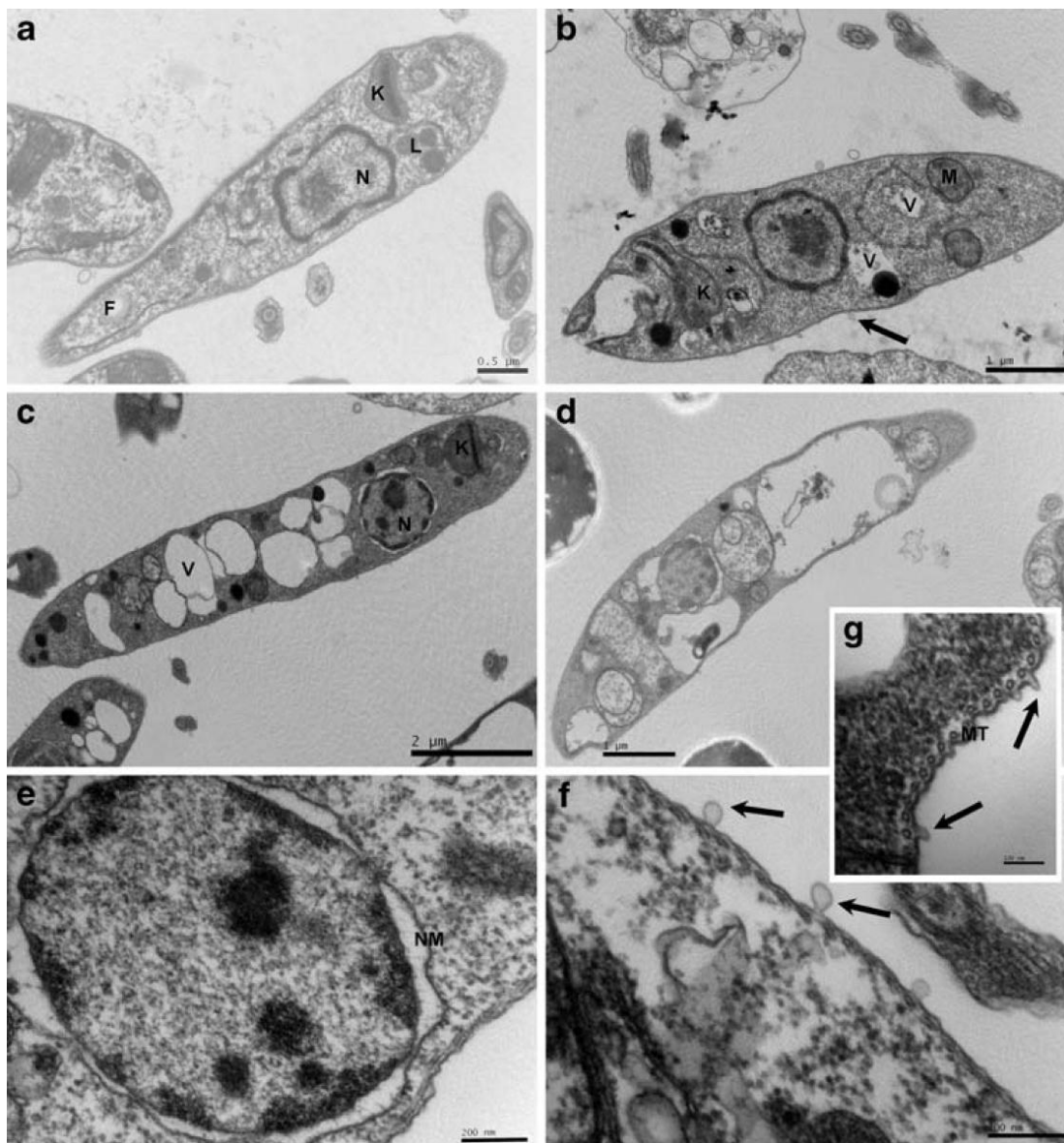


Figura 16: Imagem adquirida em MET. Observação de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* incubados com nimodipino. Os promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C em estufa BOD.

a) controle; b) 2 horas de incubação; c) 4 horas de incubação; d) 6 horas de incubação; e) 4 horas de incubação; f) 4 horas de incubação; g) 4 horas de incubação; K- cinetoplasto; M- mitocôndria; N- núcleo; F- flagelo; L- inclusão lipídica; V- vacúolo; MT- microtúbulo; NM- membrana nuclear.

2.4. Avaliação *in vivo* dos BCC anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino livre e lipossomal

A atividade *in vivo* dos BCC anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino foi avaliada em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e a carga parasitária foi determinada por qPCR, após a construção de uma curva padrão de DNA, conforme descrito no capítulo 7. A preparação de nimodipino lipossomal será descrita no capítulo 6.

Anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino mostraram ausência de atividade anti-*Leishmania*, já que não foi observada diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle (Figura 17). Uma significativa ($P < 0,05$) diminuição da carga parasitária no baço e fígado foi observada no grupo tratado com Glucantime (50 mg/kg/dia) quando comparado ao grupo controle.

Nimodipino lipossomal, administrado em uma dose 46 vezes menor que o fármaco livre, apresentou redução significativa de 97% na carga parasitária do baço de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* em relação ao grupo controle (Figura 17). Não foi observada redução na carga parasitária do fígado.

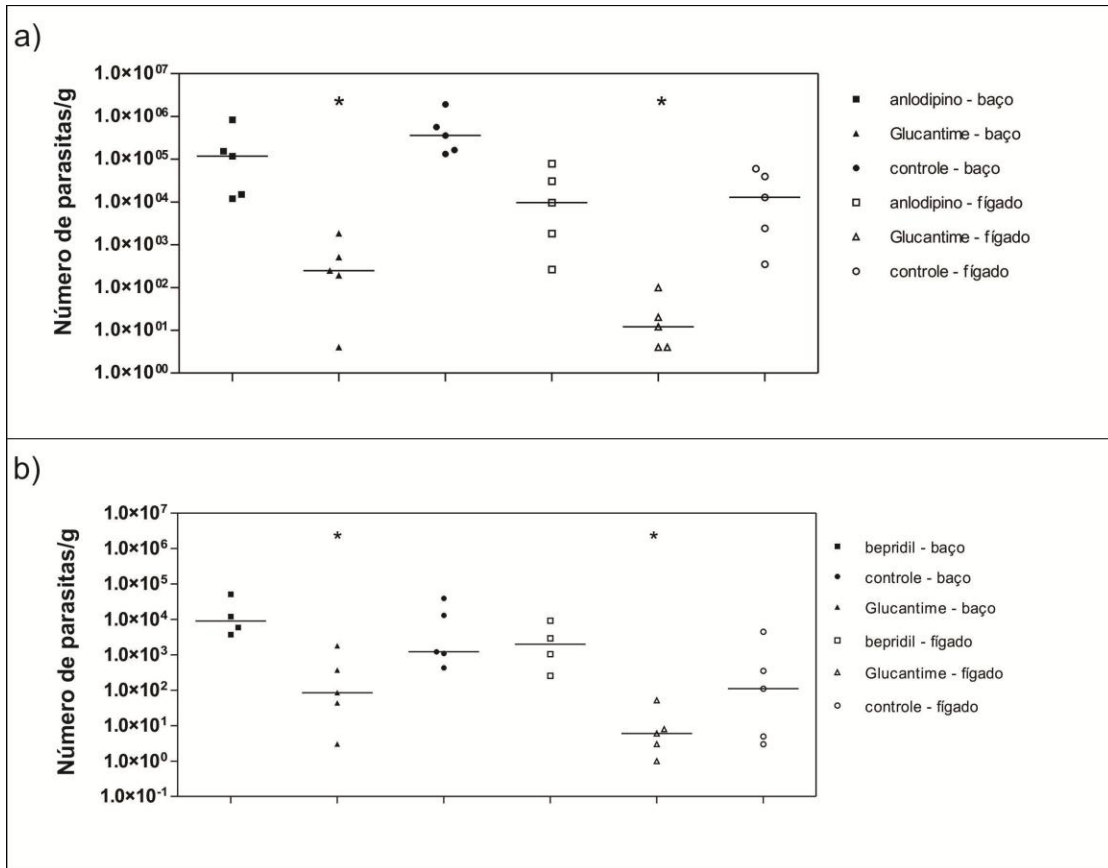


Figura 17: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos BCC anlodipino (a), bepridil (b), fendilina (c) e nimodipino (d). Número de parasitas encontrados no baço e fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR e calculado de acordo com a curva padrão de DNA.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

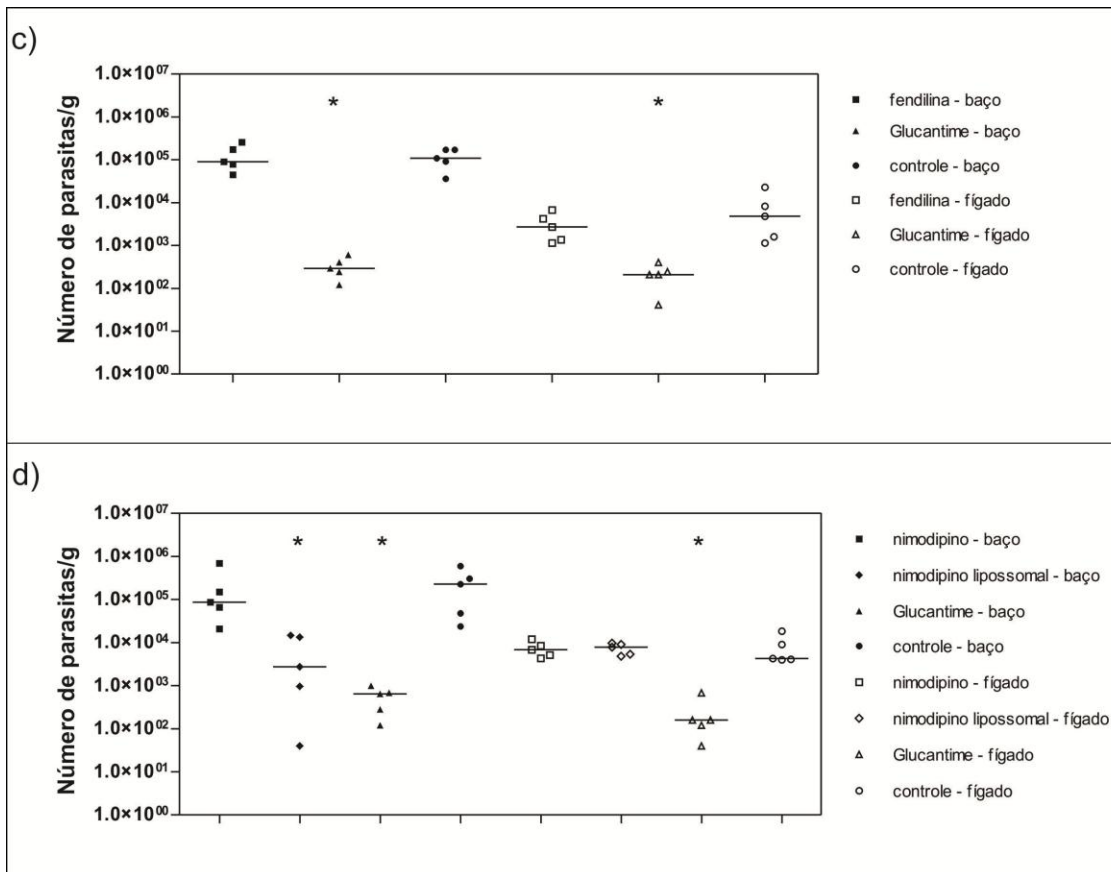


Figura 17 (continuação): Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos BCC anlodipino (a), bepridil (b), fendilina (c) e nimodipino (d). Número de parasitas encontrados no baço e fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR e calculado de acordo com a curva padrão de DNA.

* $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

3. DISCUSSÃO

No presente estudo, doze dos treze BCC foram ativos contra promastigotas de *Leishmania*. Culturas de promastigotas axênicos representam uma ferramenta útil para triagens iniciais. Entretanto, o ensaio com a forma intracelular pode dar informações essenciais acerca da atividade do composto sobre o parasita em seu ambiente natural (Sereno et al., 2007). Portanto, após a triagem utilizando promastigotas, os BCC foram testados contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi* e observou-se que dez destes compostos foram também ativos contra a forma amastigota.

Os compostos anlodipino, azelnidipino, cilnidipino, lercanidipino, nicardipino, nifedipino, nimodipino e nitrendipino são BCC que pertencem à classe das 1,4-diidropiridinas. Trabalhos anteriores com 1,4-diidropiridinas demonstraram a atividade antimicrobiana (Kumar et al., 2003) e antiparasitária (Misra et al., 1991) destes compostos. Devido a seu núcleo farmacofórico, alguns autores consideram os compostos pertencentes a esta classe estruturas privilegiadas, pois são estruturas versáteis para fins de modelagem molecular (Triggle, 2003).

Dentre os BCC testados, anlodipino demonstrou os menores valores de CE₅₀ contra *Leishmania*. Além disso, anlodipino mostrou-se 13,76 vezes mais ativo que o antimônio e considerável atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi*. Esta é a primeira descrição de atividade tripanocida deste composto, além de sua atividade contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) major*.

Palit e colaboradores (2008) demonstraram atividade *in vitro* e *in vivo* do BCC anlodipino contra *L. (L.) donovani*. No presente trabalho, foi demonstrado que a espécie *L. (L.) infantum chagasi*, agente da LV no Brasil, foi menos suscetível a este fármaco do que a espécie *L. (L.) donovani*, comparando-se os dados obtidos por Palit e colaboradores (2 µg/mL e 5,35 µg/mL, respectivamente). Embora anlodipino seja um BCC usado no

tratamento de hipertensão e angina, também foi descrita inibição *in vitro* de células cancerígenas (Li et al., 2006, Taylor, Simpson, 1992) e atividade antimicrobiana (Kumar et al., 2003).

Apesar da toxicidade apresentada, azelnidipino mostrou atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo 26,54 vezes mais tóxico para o parasita do que o benznidazol. A elevada toxicidade para macrófagos impossibilitou a realização do ensaio com amastigotas intracelulares. Contudo, a atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi* foi maior que a citotoxicidade, tornando o IS satisfatório.

Cilnidipino apresentou atividade contra *T. cruzi* e seletividade para este parasita. Baseado na seletividade observada, sugerimos que futuros testes sejam realizados para determinação da atividade contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Lercanidipino apresentou o IS mais elevado levando-se em consideração sua atividade anti-*Leishmania*. A seletividade é uma característica importante para definir protótipo a fármacos (Tasdemir et al., 2006). Juntamente com anlodipino, lercanidipino foi o composto mais ativo para a LV dentre os BCC testados, considerando a atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*, a forma clinicamente relevante do parasita (Callahan et al., 1997). Além disso, anlodipino foi 2,57 vezes mais ativo que o antimônio.

Nimodipino é usado clinicamente no tratamento de danos isquêmicos causados por espasmos arteriais em hemorragias subaracnóideas (Allen et al., 1983). A atividade *in vitro* contra promastigotas mostrou que *L. (L.) major* foi mais suscetível a este BCC, com um valor de CE₅₀ 2,6 menor do que o valor de CE₅₀ para *L. (L.) infantum chagasi*. Nimodipino mostrou-se quatro vezes mais ativo que o fármaco padrão Glucantime® (P < 0,001) levando-se em consideração formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

Nicardipino, nifedipino e nitrendipino apresentaram efeito similar a nimodipino contra os parasitas e células de mamíferos. Misra e colaboradores (1991) demonstraram que nifedipino pode bloquear a ligação

dos amastigotas de *L. (L.) donovani* aos macrófagos previamente tratados, sugerindo a participação do cálcio na infecção de novos macrófagos pelo parasita.

Dentre os BCC não pertencentes à classe das 1,4-diidropiridinas (anrinona, bepridil, fendilina, lidoflazina e mibefradil), apenas um deles (anrinona) não apresentou atividade antiparasitária *in vitro*, embora tenha apresentado baixa citotoxicidade contra células de mamíferos. Destes compostos, apenas bepridil, fendilina e lidoflazina demonstraram atividade contra amastigotas intracelulares. Este resultado permite concluir que a atividade antiparasitária não é uma característica comum a todos os BCC, conforme observado por Valiathan e colaboradores (2006), que descrevem a ausência de atividade anti-*Leishmania* do BCC verapamil.

Bepridil mostrou atividade contra *Leishmania* spp. e atividade contra tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo 28,39 mais ativo que o fármaco benznidazol. Existem relatos de atividade *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (Nassira et al., 2006) e *Toxoplasma gondii* (Song et al., 2004), confirmando sua atividade antiprotozoária.

Palit e Ali (2008) mensuraram as concentrações intracelulares de cálcio dos parasitas após o tratamento com anlodipino, lacidipino, verapamil e diltiazem. Os quatro BCC inibiram a captação de cálcio pelos parasitas a níveis semelhantes (Palit e Ali, 2008). Embora anlodipino e lacidipino demonstrem atividade anti-*Leishmania* significativa, verapamil e diltiazem foram completamente ineficazes contra os parasitas e não mostraram efeito inibitório no consumo de oxigênio. Da mesma forma, isradipino e lacidipino se mostraram ativos contra *T. cruzi*, ao contrário de verapamil e diltiazem (Núñez-Vergara et al., 1998). De forma semelhante, no presente trabalho, anrinona mostrou ausência de atividade antiparasitária, enquanto que os demais BCC testados mostraram-se ativos. Estes resultados sugerem que o efeito anti-*Leishmania* não está relacionado a um rompimento na homeostase de cálcio dos parasitas (Núñez-Vergara et al., 1998; Palit e Ali, 2008).

Os danos ultraestruturais causados a promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* por nimodipino revelaram um aumento das mitocôndrias, descolamento da membrana plasmática e alterações na membrana nuclear. Os danos mitocondriais não foram acompanhados por alterações do cinetoplasto, sugerindo que esta organela não deve ser o alvo preferencial do fármaco. Apesar dos microtúbulos subpeliculares terem sido conservados, a membrana do parasita foi claramente afetada, já que foram observados deslocamentos em forma de bolhas em curto período de incubação. Apesar desta alteração, nenhuma atividade de formação de poros na membrana plasmática foi observada.

Os danos mitocondriais causados por nimodipino observados por microscopia eletrônica de transmissão em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* corroboram os resultados encontrados por Palit e Ali (2008). Palit e Ali (2008) afirmam que a interferência nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial do parasita poderia ser aparentemente responsável pelos efeitos letais das 1,4-diidropiridinas anlodipino e lacidipino, levando à redução no consumo de oxigênio e morte por apoptose, por ativação de proteases como a caspase 3, sendo a mitocôndria o alvo intracelular fundamental (Luque-Ortega, Rivas. 2007). A inibição do consumo de oxigênio causa um aumento no oxigênio intracelular reativo, conduzindo à perda de potencial de membrana mitocondrial (Sen et al., 2004) e liberação de citocromo c no citoplasma. Isto seria responsável pela ativação de proteases como as caspases (Kroemer, Dallaporta, Resche-Rigon, 1998), que desempenham papéis importantes na cascata apoptótica destes parasitas (Sen et al., 2004). Palit e Ali (2008) observaram um aumento significativo na atividade de caspase 3 em parasitas tratados com anlodipino e lacidipino, indicando a atuação destes compostos na cascata apoptótica.

Mukherjee et al. (2002) demonstraram que o aumento dos níveis de cálcio no citosol pela ativação de canais de cálcio não seletivos causa despolarização mitocondrial, que conduz a morte por apoptose em promastigotas de *L. (L.) donovani*. A manutenção do potencial de membrana mitocondrial (PMM) é essencial para a sobrevivência da célula, pois ela

dirige a síntese de ATP e mantém a fosforilação oxidativa (Gottlieb, 2001). Não só foi reconhecida a importância do PMM na sobrevivência da célula em mamíferos, mas também em parasitas protozoários (Vercesi e Docampo, 1992). O rompimento do PMM constitui um evento que precede o processo de apoptose e a desintegração nuclear e resulta em depleção de ATP (Cossarizza et al., 1994; Zamzami et al., 1995, 1996). Supõe-se que a elevação do nível de cálcio livre no citosol participa na ativação de nucleases que estão envolvidas na apoptose nuclear (Tagliarino et al., 2001).

Visando elucidar o possível modo de ação por inibição do consumo de oxigênio, Palit e Ali (2008) avaliaram a captação de oxigênio por parasitas após o tratamento com anlodipino, lacidipino, verapamil e diltiazem. Foi relatado que a inibição da captação de oxigênio por parasitas após o tratamento causa um aumento no número de células apoptóticas (Sen et al., 2004). Com o objetivo de investigar o papel de proteases como a caspase na cascata apoptótica de parasitas tratados com diferentes compostos, Palit e Ali (2008) realizaram um ensaio fluorométrico com caspase 3 no citosol de parasitas após o tratamento. Os resultados demonstraram que a atividade da caspase 3 em células tratadas aumenta significativamente em concentrações crescentes de anlodipino e lacidipino.

O papel do cálcio na regulação de muitos processos celulares vitais foi demonstrado em diferentes tripanossomatídeos (Benaim, 1996; Moreno, Docampo, 2003; Mendoza et al., 2008). Em *T. cruzi*, *T. brucei* e diferentes espécies de *Leishmania*, o controle do cálcio citoplasmático é feito por três organelas principais: o retículo endoplasmático, a mitocôndria e o acidocalcissoma, um compartimento que é dedicado ao acúmulo de polifosfatos e que também está envolvido no controle de cálcio (Docampo, Moreno, 2001). A mitocôndria do parasita possui um transportador de cálcio em sua membrana interna que utiliza a diferença no potencial de prótons entre o espaço intramitocondrial e o citoplasma como a força motriz para o acúmulo deste cátion (Docampo, Vercesi, 1989; Benaim, Bermudez, Urbina, 1990). Este sistema de transporte mitocondrial de cálcio é caracterizado por uma baixa afinidade e alta capacidade de acúmulo de cálcio. Todos estes

atributos são bem parecidos ao sistema de transporte de cálcio em mamíferos (Docampo, Vercesi, 1989; Benaim, Bermudez, Urbina, 1990). Os acidocalcissomas, porém, são organelas ácidas com níveis altos de pirofosfatos e polifosfatos, que são capazes de acumular altas quantidades de cálcio (Docampo et al., 1996, Docampo, Moreno, 2001). Todos estes sistemas que operam de maneira combinada contribuem à manutenção da homeostase intracelular de cálcio, enquanto mantém a concentração intracelular (citoplásmica) de cálcio abaixo de 100 nM, bem abaixo da concentração de cálcio extracelular (que está na ordem de mM), permitindo que este cátion execute sua função essencial como um mensageiro sinalizador interno (Benaim, 1996). Benaim e colaboradores (2006) previamente demonstraram que o hipertensivo amiodarona, um bloqueador de sódio-potássio, afeta a viabilidade de *T. cruzi* rompendo a homeostase mitocondrial de cálcio no parasita. Serrano-Martín e colaboradores (2009) demonstraram que este composto afeta a viabilidade de promastigotas de *Leishmania* por meio da destabilização da homeostase de cálcio na mitocôndria e no acidocalcissoma.

Kaur e colaboradores (2009) avaliaram o mecanismo de morte celular de análogos glicosilados de 1,4-diidropiridinas contra *L. (L.) donovani*. Este estudo mostra a indução da morte celular programada por um análogo glicosilado de 1,4-diidropiridina. Análises de citometria de fluxo revelaram que este análogo induz a demora do ciclo celular na fase G2/M com aumento subsequente da fase G1. A incubação de promastigotas de *Leishmania* com este análogo causa exposição de fosfatidilserina para o exterior da membrana plasmática, formação de espécies reativas de oxigênio, despolarização da membrana mitocondrial e alterações nucleares concomitantes, que incluem a fragmentação do DNA (Kaur et al., 2009). Sugerimos que as 1,4-diidropiridinas usadas no presente estudo podem apresentar o mecanismo de ação semelhante ao encontrado por Mukherjee e colaboradores (2002). Por se tratarem, também, de 1,4-diidropiridinas, os compostos em estudo podem induzir a morte programada dos parasitas por meio de alterações no ciclo celular e mudanças no potencial da membrana

mitocondrial, visto que foram observadas alterações nas mitocôndrias e cinetoplasto dos promastigotas após a incubação com nimodipino. Porém, estudos adicionais são necessários para confirmação desta hipótese.

Foi demonstrado que na presença do BCC verapamil, o antimônio se torna novamente efetivo contra isolados clínicos resistentes de *L. (L.) donovani* (Valiathan et al., 2006). Em estudos com linhagens celulares de carcinoma resistentes, verapamil previne o efluxo de fármaco das células (Fojo et al., 1985). Efeito semelhante foi encontrado com amostras de *P. falciparum* resistentes à cloroquina (Martin et al., 1987), *L. (L.) donovani* e *T. cruzi* resistentes (Neal et al., 1989). Se este efluxo ativo é inibido, o fármaco então se acumula e as células resistentes se tornam sensíveis novamente. Diante destes resultados, os BCC são considerados úteis para o planejamento de estratégias quimioterapêuticas para espécies de *Leishmania* resistentes.

Os macrófagos são as células hospedeiras na leishmaniose e desempenham um papel importante no controle imunológico do parasita intracelular com a produção de citocinas e metabólitos de oxigênio (Balaraman et al., 2004). Com a regulação eficaz do NO dentro da célula, os macrófagos provocam a morte dos amastigotas (Mauel e Ransijn 1997). No presente trabalho, a possível ativação dos macrófagos induzidos pelos BCC foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que não houve produção de NO, sugerindo que os BCC possuem ação antiparasitária específica, sem a necessidade de intervenção do macrófago para o efeito anti-*Leishmania*. A dependência da ativação do macrófago para o efeito anti-*Leishmania* do antimônio pentavalente foi demonstrado (Mookerjee Basu et al., 2006). Assim, para pacientes imunocomprometidos, o tratamento de LV com antimoniais é claramente limitado. Portanto, os BCC aqui estudados demonstraram eficácia contra *L. (L.) infantum chagasi*, eliminando seletivamente os parasitas intracelulares sem a necessidade de ativação do macrófago.

Com relação aos estudos experimentais, anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino não apresentaram atividade *in vivo* contra *L. (L.)*

infantum chagasi em hamsteres infectados, embora estes BCC tenham apresentado atividade *in vitro* contra *Leishmania* e seletividade contra células de mamíferos. As doses para administração *in vivo* foram escolhidas com base na toxicidade *in vivo* destes fármacos, quando descrita na literatura, e na eficácia *in vivo* dos BCC anlodipino e lacidipino contra *L. (L.) donovani* a 10 mg/kg (Palit e Ali, 2008).

Palit e Ali (2008) relatam a atividade anti-*Leishmania in vivo* dos BCC anlodipino e lacidipino. As diferenças entre os resultados encontrados por Palit e Ali (2008) e os resultados encontrados no presente trabalho podem ser atribuídas a diferentes fatores: i) a diferença na suscetibilidade de espécies de *Leishmania* para um fármaco específico, especialmente quando considerado o modelo *in vivo* (*L. (L.) donovani versus L. (L.) infantum chagasi*); ii) o diferente modelo animal (hamster *versus* camundongo); iii) a via de administração (intraperitoneal *versus* oral) e iv) o diferente regime de tratamento (administração diária durante dez dias consecutivos *versus* administração semanal).

Vale ressaltar também que Palit e Ali (2008) utilizaram o fármaco comercial (comprimidos de anlodipino; Sun Pharmaceuticals Ltda.), que contém em sua composição celulose microcristalina, glicolato de sódio e estereato de magnésio, os quais podem ter atividade contra o parasita. Além disso, a falta de atividade *in vivo* dos BCC poderia estar relacionado a uma pobre biodistribuição para os macrófagos infectados do baço e fígado. Outras formulações farmacêuticas, como sistemas de liberação dirigida de fármaco, poderiam ser uma alternativa futura para evitar esta pobre distribuição.

Embora nimodipino tenha apresentado atividade *in vitro* contra *Leishmania spp* e *T. cruzi*, este BCC não apresentou atividade *in vivo* em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, conforme observado por qPCR. Observou-se um aumento da carga parasitária no fígado do grupo tratado com nimodipino livre em relação ao controle. Os motivos para este fato não foram analisados.

Nimodipino é um fármaco pouco solúvel em água e esta é uma das razões de sua baixa biodisponibilidade e eficácia clínica limitada

(Yunzhe et al., 2008). Diante disso, foi desenvolvida uma formulação lipossomal de nimodipino, visando à liberação dirigida deste fármaco aos órgãos infetados (capítulo 6). O tratamento com a formulação lipossomal de nimodipino levou a diminuição na carga parasitária no baço em relação ao controle, mostrando que possivelmente ocorreu a liberação dirigida de nimodipino neste órgão.

Os resultados referentes aos BCC são também apresentados nos anexos na forma de artigo científico; são apresentados os resultados dos testes *in vitro* do BCC nimodipino (anexo 3), os resultados *in vitro* das demais 1,4-diidropiridinas (anexo 6), os resultados *in vitro* e *in vivo* do BCC bepridil (anexo 7) e os resultados *in vitro* e *in vivo* dos BCC anlodipino, fendilino e nimodipino (anexo 10).

CAPÍTULO 2

Estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica

1. INTRODUÇÃO

O estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, cuja sigla inglesa é QSAR (*Quantitative structure-activity relationship*) é um processo pelo qual a estrutura química de um composto é quantitativamente correlacionada com um processo bem definido, como a atividade biológica. As análises de QSAR têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química à atividade biológica de uma série de compostos que, em geral, diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes na estrutura química comum à série (Ferreira, Montanari, Gáudio, 2002; Keseru, Makaro, 2006).

Muitos trabalhos com abordagens teóricas foram relatados para o desenho de novos fármacos, para controlar parâmetros de toxicidade e encontrar padrões estruturais comuns de fármacos conhecidos. Este método tem sido utilizado para o desenho de fármacos analgésicos, antivirais (García-Domenech et al., 1996; Julián-Ortiz et al., 1999), antibacterianos (Gregorio Alapont et al., 2000) e antifúngicos (Gozalbes et al., 2000). Portanto, a investigação da relação entre estrutura-atividade biológica pode ser uma ferramenta útil para avaliar e comparar as propriedades antiprotozoárias e citotóxicas de uma série de compostos, visando à caracterização de novos derivados com atividade antiparasitária e melhor seletividade (Miert et al., 2005).

As 1,4-diidropiridinas têm se mostrado ativas contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* (Palit e Ali, 2008), conforme apresentado no capítulo 1. Diante do exposto, buscou-se o estudo de QSAR desta classe de BCC.

2. RESULTADOS

2.1. Diagrama de Hasse e PCA

O programa DRAGON gerou grupos diferentes de descritores: autocorrelações 2D (Moran, 1950; Geary, 1954; Moreau, Broto, 1980), descritores geométricos (Diudea, Horvath, Graovac, 1995; Balaban, 1997; Randic, Kleiner, Dealba, 1994), descritores de RDF (Hemmer et al., 1999), descritores 3D-Morse (Gasteiger, 1996; Schuur, Selzer, Gasteiger, 1996) e Weighted Holistic Invariant Molecular (WHIM) (Todeschini, Gramatica, 1997) e descritores GETAWAY (Geometry Topology, e Atom-Weights Assembly) (Consonni, Todeschini, Pavan, 2002; Consonni et al., 2002), dentre outros.

As 1,4-diidropiridinas foram numeradas como segue: 1: azelnidipino; 2: anlodipino; 3: cilnidipino; 4: lercanidipino; 5: nicardipino; 6: nifedipino; 7: nimodipino; 8: nitrendipino. No diagrama de Hasse os compostos foram classificados em níveis, do mais ativo ao menos ativo (Figura 18). Os gráficos de PCA (*scores* e *loadings*) são mostrados na Figura 19.

Primeiramente, as atividades antiprotozoárias e citotoxicidade foram relacionadas com todas as diidropiridinas em estudo, com exceção do azelnidipino, pois não possui valor de atividade contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A partir do diagrama de Hasse (Figura 18a), verifica-se que os compostos 2 e 3 são os mais ativos para todos os organismos testados. No segundo nível, estão os compostos 4, 5 e 7, seguidos pelo composto 8 e depois pelo composto 6. Em sequência decrescente de atividade, tem-se: $2 > 4 > 6$ e $2 > 5 > 8 > 6$ e $2 > 7$ e finalmente $3 > 6$.

O resultado do diagrama é confirmado pelo PCA (Figura 19a), mostrando que o composto 2 é o mais ativo para todos os organismos, conforme observado no gráfico de *scores*, sendo o composto mais à esquerda. Comparando-se o gráfico de *scores* com o gráfico de *loadings*, verifica-se que todas as atividades contribuem negativamente para o

primeiro componente principal. O composto menos ativo é o 6 (nifedipino). Com relação à citotoxicidade, o composto 4 é um dos menos tóxicos, juntamente com o composto 6 (posição inversa à segunda componente principal com relação à citotoxicidade). Foi possível visualizar um espaço com 7 variáveis para 2, explicando 89,5 % de toda a variância.

A citotoxicidade foi retirada desta análise e a atividade antiprotozoária foi analisada exclusivamente (Figura 18b). Esta análise foi feita sem azelnidipino, pois este composto não apresentou valor de atividade contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A partir do diagrama de Hasse, observam-se relações mais simples e diretas: $2 > 4 > 5 > 8 > 6$ e $2 > 4 > 7$ e $3 > 6$, ou seja, o número de cadeias de comparação é menor. Percebe-se um comportamento semelhante no PCA (Figura 19b). Apenas uma componente explica 87% de toda a variância e a disposição dos compostos no gráfico de *scores*. Assim como na análise anterior, verifica-se um grupo de compostos mais ativos (2, 4, 3 e 5) e um grupo de compostos menos ativos (6, 7 e 8).

Foi feita uma análise de todos os compostos e todas as atividades, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (Figura 18c). A partir do diagrama de Hasse, são observadas as seguintes relações: $1 > 3 > 6$ e $1 > 5 > 8 > 6$ e $2 > 4 > 6$ e $2 > 5 > 8 > 6$ e $2 > 5 > 7$. Portanto, os compostos 1 e 2 mostram-se mais ativos e o composto 6, o menos ativo. A partir da análise do PCA (Figura 19b), verifica-se que o composto 1, além de ser citotóxico, apresenta considerável atividade anti-*T. cruzi*, conforme observado pelo gráfico de *scores* e *loadings*.

Finalmente, foi feita uma análise de todos os compostos e todas as atividades, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e citotoxicidade (Figura 18d). O diagrama de Hasse obtido demonstra a seguinte relação: $1 > 5 > 8 > 6$ e $2 > 4 > 5 > 7$ e $3 > 7$ e $3 > 6$. A análise do PCA (Figura 19d) confirma que os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 são os compostos mais ativos e os compostos 6, 7 e 8 são os menos ativos. Também aumenta-se a variância explicada, onde apenas a primeira componente explica 85% de toda a variância.

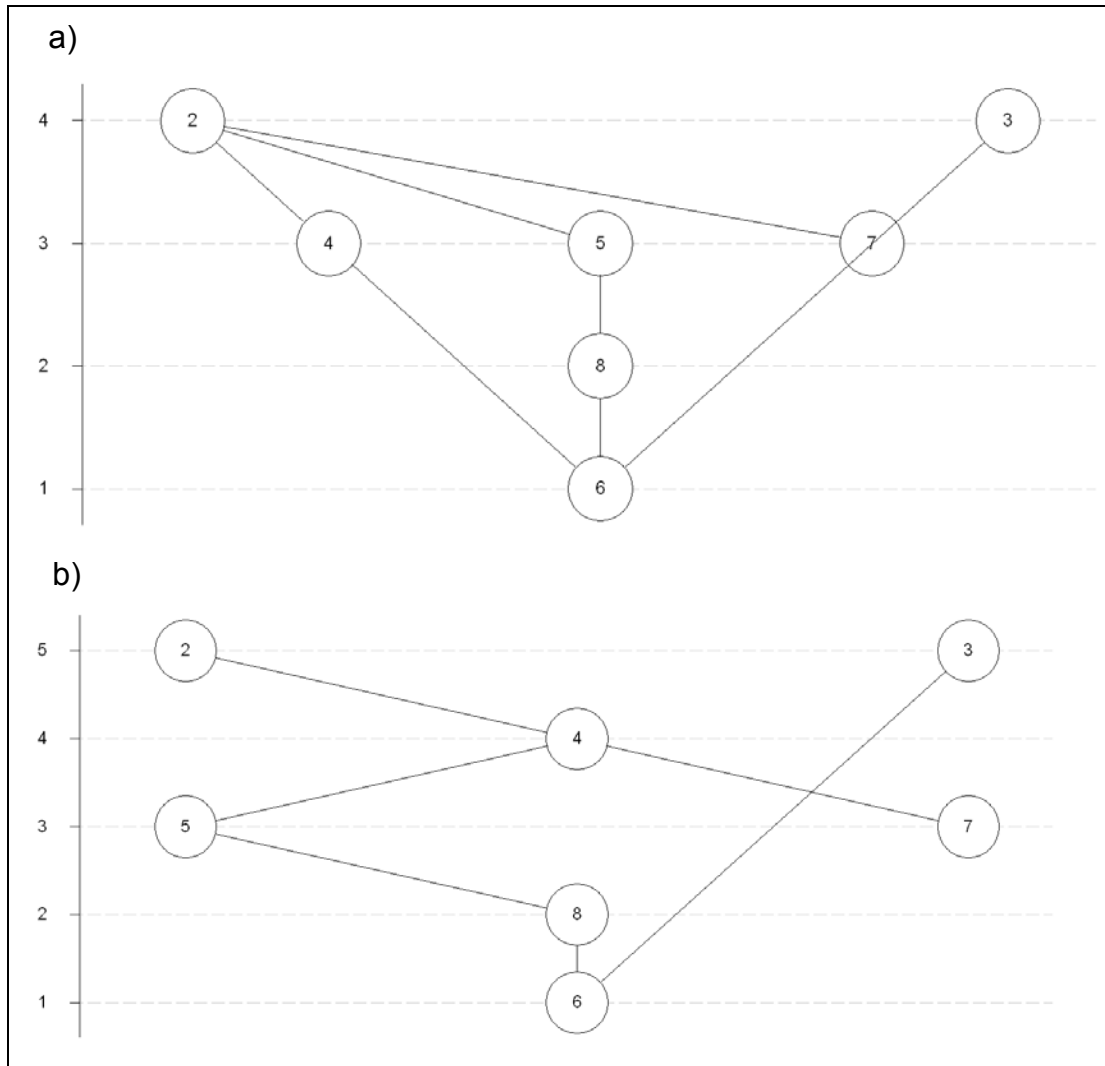


Figura 18: Diagrama de Hasse para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d).

1: azelnidipino; 2: anlodipino; 3: cilnidipino; 4: lercanidipino; 5: nicardipino; 6: nifedipino; 7: nimodipino; 8: nitrendipino.

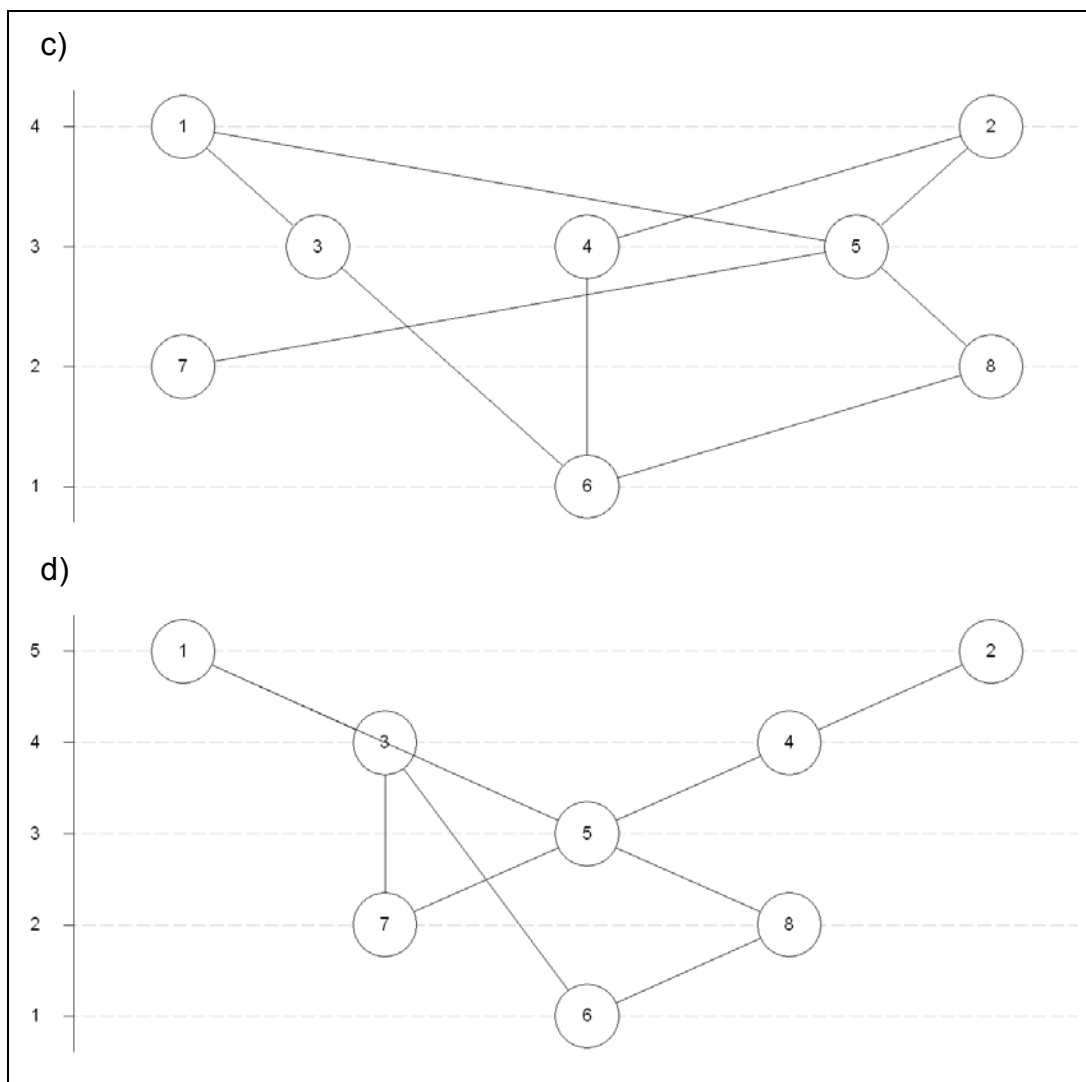


Figura 18 (continuação): Diagrama de Hasse para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d).

1: azelnidipino; 2: anlodipino; 3: cilnidipino; 4: lercanidipino; 5: nicardipino; 6: nifedipino; 7: nimodipino; 8: nitrendipino.

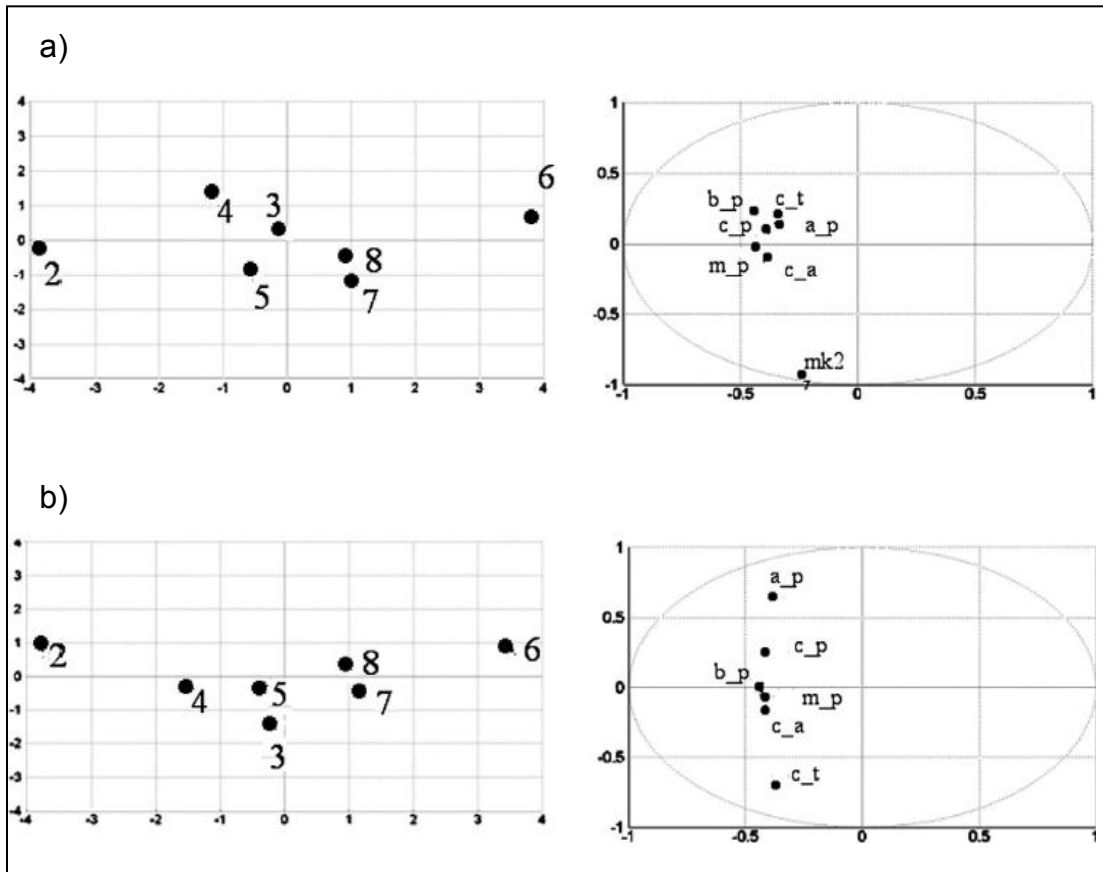


Figura 19: Gráfico de scores (esquerda) e loadings (direita) para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d).

1: azelnidipino; 2: anlodipino; 3: cilnidipino; 4: lercanidipino; 5: nicardipino; 6: nifedipino; 7: nimodipino; 8: nitrendipino; c_p: promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; c_a: amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; a_p: promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; m_p: promastigotas de *L. (L.) major*; b_p: promastigotas de *L. (V.) braziliensis*; c_t: tripomastigotas de *T. cruzi*; mk2: citotoxicidade contra LLC-MK2.

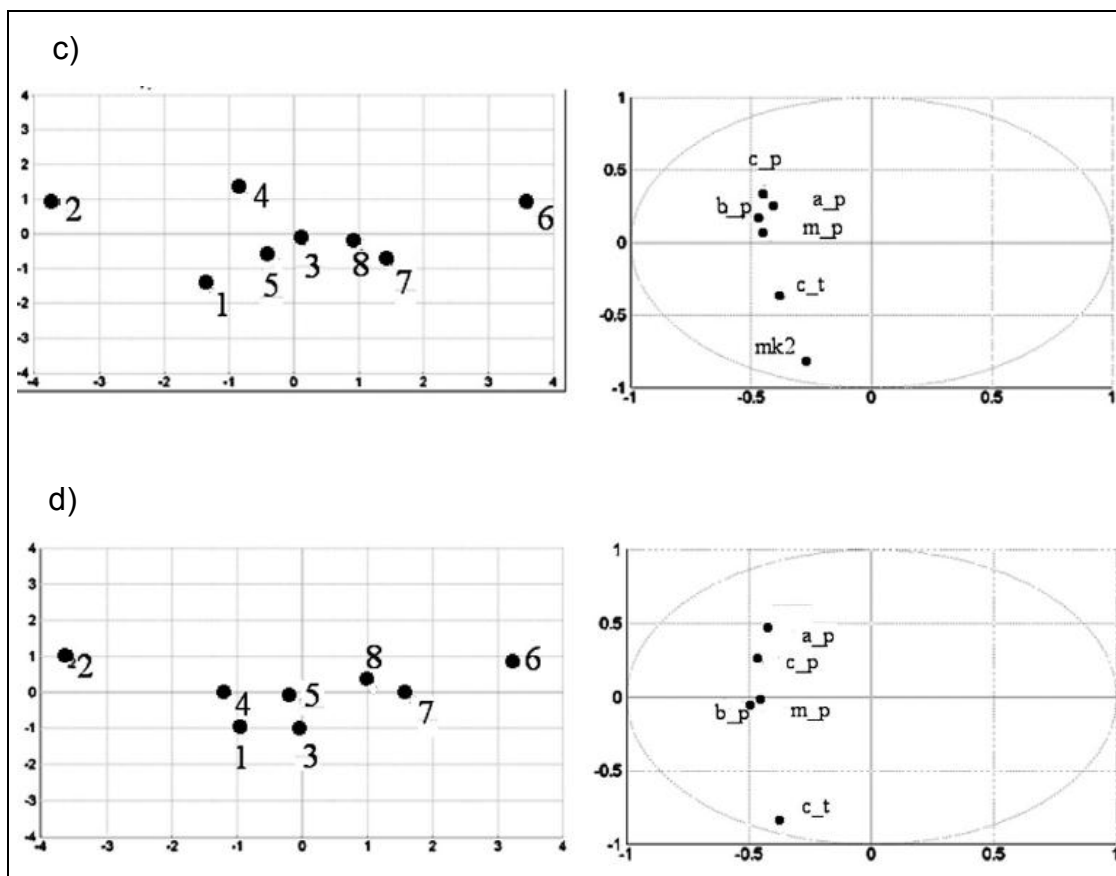


Figura 19 (continuação): Gráfico de scores (esquerda) e *loadings* (direita) para atividades antiprotozoária e citotóxica (a); para atividade antiprotozoária (b); para atividades antiprotozoária e citotóxica, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (c) e para atividade antiprotozoária, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (d).

1: azelnidipino; 2: anlodipino; 3: cilnidipino; 4: lercanidipino; 5: nicardipino; 6: nifedipino; 7: nimodipino; 8: nitrendipino; c_p: promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; c_a: amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; a_p: promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; m_p: promastigotas de *L. (L.) major*; b_p: promastigotas de *L. (V.) braziliensis*; c_t: tripomastigotas de *T. cruzi*; mk2: citotoxicidade contra LLC-MK2.

2.2. Predição de análogos de 1,4-diidropiridinas

Os diagramas de Hasse e PCA tornaram possível propor algumas características físico-químicas e estruturais responsáveis pela atividade biológica. Relativo a estas características, o grupamento difenilpropil e difenilmetilazetidina na posição 4 do anel das 1,4-diidropiridinas e o átomo de cloro na posição *orto* do grupo fenil mostrou-se determinante para a atividade antiprotozoária, embora estas características sejam também responsáveis pelo aumento da citotoxicidade, e por isso não foram usadas para a construção dos análogos 1 e 2. As equações geradas pelas análises de QSAR são mostradas no Anexo 6.

Com base nestas análises, foi possível projetar dois novos análogos de 1,4-diidropiridinas: os compostos (S)-3-etil-5-metil 2-((2-aminoetoxi)metil)-1,4-diidro-4-(3-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato (Figura 20a) e (S)-3-[2,2-dimetil-3-(metil-fenil-amino)-propil]-5-metil-2-(2-Amino-etoximetil)-4-(3-nitro-fenil)-1,4-diidro-piridina-3,5-dicarboxilato (Figura 20b). Os valores teóricos de CE_{50} e IS são mostrados na Tabela 6.

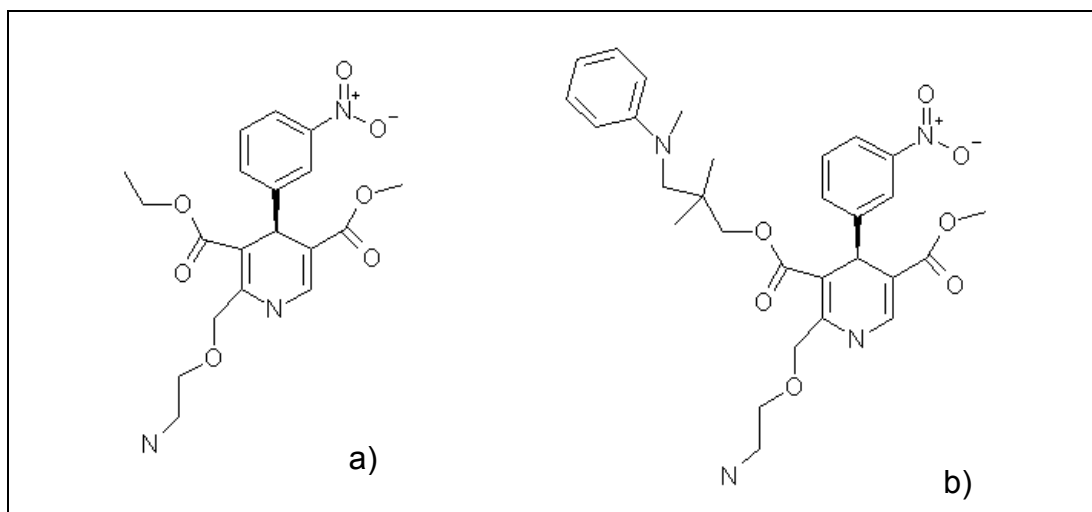


Figura 20: Estruturas químicas dos análogos de 1,4-diidropiridina projetados por QSAR: (S)-3-etil-5-metil 2-((2-aminoetoxi)metil)-1,4-diidro-4-(3-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato (a) e (S)-3-[2,2-dimetil-3-(metil-fenil-amino)-propil]-5-metil-2-(2-Amino-etoximetil)-4-(3-nitro-fenil)-1,4-diidro-piridina-3,5-dicarboxilato (b).

Tabela 6: Valores teóricos de CE₅₀ e IS dos análogos de 1,4-diidropiridinas.

Atividade	CE ₅₀ (µM)		IS	
	Análogo 1	Análogo 2	Análogo 1	Análogo 2
c_p	14,79	4,47		
c_a	7,76	6,46	5,76	9,77
a_p	8,32	10,72		
m_p	8,91	6,17		
b_p	24,55	6,03		
c_t	15,14	3,02	2,95	20,89
mk2	44,67	63,10		

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IS: Índices de Seletividades, dados pela razão entre a toxicidade para LLC-MK-2 e a atividade antiparasitária; c_p: promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; c_a: amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*; a_p: promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; m_p: promastigotas de *L. (L.) major*; b_p: promastigotas de *L. (V.) braziliensis*; c_t: tripomastigotas de *T. cruzi*; mk2: citotoxicidade contra LLC-MK2.

3. DISCUSSÃO

O diagrama de Hasse é uma ferramenta muito utilizada na matemática discreta, que aos poucos vem conquistando espaço na experimentação. Caracterizado por Lohr (1995) como uma ferramenta facilitadora, tanto no processo de planejamento quanto no processo de análise de experimentos, o diagrama auxilia na compreensão da estrutura presente entre os fatores experimentais. No presente trabalho, inicialmente foi feita uma análise das atividades contra os parasitas e da citotoxicidade em relação às 1,4-diidropiridinas em estudo. Por meio do diagrama de Hasse e PCA, foi possível ter uma visão geral do comportamento de cada composto com relação às atividades biológicas.

Primeiramente, a atividade antiprotozoária e citotoxicidade foram relacionadas com todas as 1,4-diidropiridinas em estudo, exceto com azelnidipino, pois não possui valor de atividade contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Em seguida, a citotoxicidade foi retirada e a atividade antiprotozoária foi analisada exclusivamente. Em seguida, todos os compostos e todas as atividades, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foram analisados. Finalmente, foi feita uma análise de todos os compostos e todas as atividades, exceto contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e citotoxicidade. Desta forma, foi possível identificar os compostos mais ativos, levando-se em consideração o efeito antiparasitário e citotóxico de uma forma geral.

O QSAR proveu informações sobre as características estruturais requeridas para a atividade antiprotozoária. Com base nestas análises, foi possível projetar dois novos análogos de 1,4-diidropiridina, que poderiam ser usados como protótipos para o desenvolvimento de compostos mais seletivos. A metodologia deste estudo pode ser usada como uma ferramenta para o desenvolvimento de compostos anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* ou como filtro para triagens virtuais. Estes resultados são apresentados e discutidos no anexo 6 na forma de artigo científico.

CAPÍTULO 3

Associação de fármacos

1. INTRODUÇÃO

Existem várias razões pelas quais tem crescido o consenso ao longo dos últimos anos para a utilização de regimes de associação na LV (Byceson, 2001; Alvar, Croft, Olliaro, 2006; Croft, Sundar, Fairlamb, 2006; Den Boer, Davidson, 2006; Singh, Pandey, Sundar, 2006). Primeiro, a associação de fármacos de diferentes classes químicas pode reduzir a duração do tratamento ou reduzir a dose total administrada, resultando em redução dos efeitos tóxicos, maior adesão e menor carga sobre o sistema de saúde (Griensven et al., 2010; OMS, 2010). Isso também poderia reduzir os custos globais (diretos e indiretos) e fornecer opção mais rentável (El-On, 2009). A terapia combinada pode ajudar a retardar o aparecimento de resistência e aumentar a vida útil dos respectivos fármacos, como já foi visto em doenças como tuberculose, malária e na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Byceson, 2001; Kremsner, Krisma, 2004). Finalmente, a terapia de associação pode melhorar a eficácia do tratamento em casos mais complicados, como os pacientes coinfectados com o vírus HIV, onde os resultados do tratamento com a monoterapia têm sido pobres (Alvar et al., 2008).

Várias combinações estão em estudo clínico, o que provavelmente trará opções eficazes para o tratamento da LV em um futuro próximo (Griensven et al., 2010; OMS, 2010). A associação de estibogluconato de sódio e paromomicina foi eficaz no tratamento de LV, com cura de 95% dos pacientes que sofrem de infecção por *L. (L.) donovani* (Thakur et al., 2000). Além disso, a anfotericina B lipossomal combinada com miltefosina mostrou-se eficaz contra espécies resistentes ao antimônio pentavalente na Índia (Sundar et al., 2008a; 2008b). A associação de estibogluconato de sódio com alopurinol foi considerada mais eficaz do que

o estibogluconato de sódio sozinho. A associação de paromomicina e antimônio resultou em maior taxa de cura em pacientes com LV em Bihar (Índia), onde a falta de resposta aos antimoniais é comum (OMS, 2010).

No estudo de associação de fármacos, a natureza das interações é primeiramente determinada *in vitro*, por meio de isobogramas (Seifert, Croft, 2006). Isobogramas são representações gráficas em um eixo de coordenadas de doses efetivas de dois fármacos. Em cada eixo são representadas as doses efetivas individuais de ambos os fármacos. Estes dois pontos são unidos por meio de uma linha, chamada de isóbole ou linha de aditividade. Os demais valores de dose efetiva obtidos da associação em diferentes proporções podem, então, ser analisados em relação à sua posição diante da isóbole de aditividade. Se esses pontos se posicionarem em torno da isóbole de aditividade, a ação é indiferente; ao se colocarem abaixo, a ação é sinérgica; ao se situarem acima, a ação é antagônica (Berembaum, 1978). Uma forma complementar de análise das doses de CE₅₀ para os fármacos aplicados isolados e em associação é o cálculo da somatória das concentrações inibitórias fracionárias (Σ CIF). Este índice relaciona as doses de CE₅₀ empregadas na associação com as CE₅₀ dos produtos isolados (Kruse et al., 2006).

O método de isobograma baseado em proporções fixas foi originalmente desenvolvido para estudos de interação de fármacos com bactérias (Hall, Middleton, Westmacott, 1983), mas seus princípios são também aplicados para o estudo das interações *in vitro* entre fármacos anti-*Leishmania*. Desta forma, é possível identificar as combinações capazes de potencializar a atividade dos fármacos associados, visando à redução dos efeitos tóxicos, dentre outras vantagens.

Cosiderando-se a atividade anti-*Leishmania* dos BCC, conforme apresentado no capítulo 1, o estudo das associações destes fármacos com os fármacos padrão disponíveis para o tratamento da LV poderia levar ao encontro de associações sinérgicas ou aditivas, que poderiam sugerir novas alternativas para o tratamento da leishmaniose.

2. RESULTADOS

2.1. Análise dos valores de CIF e dos isobogramas

As curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC e os fármacos padrão em promastigotas e amastigotas são mostrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente. Os valores de CE_{50} e CIFs das associações são mostrados nas Tabelas 7 e 8 e os valores de $\bar{x} \sum CIFs$ são mostrados na Tabela 9. Os isobogramas foram feitos com base nos valores de CE_{50} (Figura 23 e 24) e nos valores de CIF (Figura 25 e 26) das associações. As interações foram classificadas como indiferente de acordo com os valores de $\bar{x} \sum CIF$ e de acordo com os isobogramas.

De acordo com a análise gráfica dos isobogramas em promastigotas (Figuras 23 a 26), foi observada indiferença em todas as combinações, já que todos os pontos (P_2 a P_4 , correspondendo às proporções 4:1, 3:2, 2:3 e 1:4 dos BCC o os fármacos padrão, respectivamente) ficaram situados próximo à linha de aditividade.

A associação de nimodipino e Glucantime (Figura 24d) mostrou sinergismo em três dos pontos no isobograma, sendo que o maior efeito sinérgico foi observado no ponto P_4 (associação de nimodipino e Glucantime na proporção de 2:3). Porém, de acordo com a classificação adotada, esta combinação não foi considerada sinérgica, pois o valor da $\bar{x} \sum CIF$ desta combinação foi 0,79 (Tabela 9).

A análise gráfica dos isobogramas mostrou que, apesar de alguns pontos estarem situados abaixo da linha de aditividade (ponto P_2 da associação de anlodipino e anfotericina B; ponto P_5 da associação de anlodipino e Glucantime e ponto P_3 e P_5 da associação de nimodipino e Glucantime), quando se consideram os valores de SEM, percebe-se que estes pontos estão localizados próximos à faixa de confiança, e, portanto, foram considerados como interações indiferentes, considerando-se também os valores de $\bar{x} \sum CIF$.

Tabela 7: Valores de CE₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Associação	CE ₅₀ da associação (IC 95%)		CIF da associação (IC 95%)		ΣCIF
	anlodipino	pentamidina	anlodipino	pentamidina	
5:0	0,757 (0,629 a 0,912)	--	--	--	--
4:1	0,842 (0,746 a 0,950)	0,026 (0,023 a 0,029)	1,11	0,07	1,18
3:2	1,01 (0,879 a 1,163)	0,084 (0,073 a 0,096)	1,33	0,23	1,56
2:3	0,875 (0,775 a 0,988)	0,164 (0,145 a 0,185)	1,15	0,45	1,60
1:4	0,565 (0,491 a 0,650)	0,282 (0,245 a 0,325)	0,75	0,78	1,53
0:5	--	0,360 (0,322 a 0,404)	--	--	--
	anlodipino	anfotericina B	anlodipino	anfotericina B	
5:0	0,851 (0,744 a 0,972)	--	--	--	--
4:1	0,937 (0,708 a 1,241)	0,007 (0,005 a 0,010)	1,10	0,20	1,30
3:2	0,706 (0,556 a 0,896)	0,015 (0,012 a 0,019)	0,83	0,44	1,27
2:3	0,707 (0,602 a 0,829)	0,035 (0,030 a 0,041)	0,83	1,00	1,83
1:4	0,241 (0,193 a 0,300)	0,032 (0,025 a 0,040)	0,28	0,91	1,19
0:5	--	0,035 (0,029 a 0,042)	--	--	--
	bepridil	pentamidina	bepridil	pentamidina	
5:0	2,443 (2,127 a 2,806)	--	--	--	--
4:1	2,360 (2,175 a 2,561)	0,073 (0,067 a 0,080)	0,97	0,19	1,16
3:2	2,076 (1,989 a 2,166)	0,173 (0,165 a 0,180)	0,85	0,54	1,39
2:3	1,259 (1,129 a 1,404)	0,236 (0,211 a 0,263)	0,51	0,61	1,13
1:4	0,6338 (0,600 a 0,668)	0,316 (0,300 a 0,334)	0,26	0,82	1,08
0:5	--	0,385 (0,337 a 0,440)	--	--	--
	bepridil	anfotericina B	bepridil	anfotericina B	
5:0	1,505 (1,350 a 1,677)	--	--	--	--
4:1	1,318 (1,165 a 1,490)	0,010 (0,009 a 0,012)	0,87	0,28	1,15
3:2	0,889 (0,762 a 1,038)	0,019 (0,016 a 0,023)	0,59	0,53	1,12
2:3	0,570 (0,493 a 0,659)	0,028 (0,024 a 0,032)	0,38	0,78	1,16
1:4	0,2711 (0,232 a 0,316)	0,036 (0,031 a 0,042)	0,18	1,00	1,18
0:5	--	0,036 (0,030 a 0,042)	--	--	--

Tabela 7 (continuação): Valores de CE₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Associação	CE ₅₀ da associação (IC 95%)		CIF da associação (IC 95%)		ΣCIF
	lercanidipino	pentamidina	lercanidipino	pentamidina	
5:0	5,791 (5,385 a 6,228)	--	--	--	--
4:1	6,870 (5,839 a 8,082)	0,025 (0,021 a 0,030)	1,19	0,31	1,50
3:2	6,354 (5,556 a 7,267)	0,063 (0,055 a 0,072)	1,10	0,77	1,87
2:3	3,119 (2,769 a 3,513)	0,070 (0,062 a 0,079)	0,54	0,85	1,39
1:4	1,324 (1,227 a 1,428)	0,079 (0,073 a 0,085)	0,23	0,96	1,19
0:5	--	0,082 (0,076 a 0,088)	--	--	--
	lercanidipino	anfotericina B	lercanidipino	anfotericina B	
5:0	7,800 (6,704 a 9,075)	--	--	--	--
4:1	10,18 (9,290 a 11,150)	0,010 (0,009 a 0,011)	1,30	0,25	1,55
3:2	9,299 (8,774 a 9,855)	0,024 (0,023 a 0,026)	1,19	0,60	1,79
2:3	6,320 (5,698 a 7,010)	0,037 (0,034 a 0,042)	0,81	0,92	1,73
1:4	3,254 (2,836 a 3,733)	0,052 (0,045 a 0,059)	0,42	1,30	1,72
0:5	--	0,040 (0,032 a 0,050)	--	--	--
	nicardipino	pentamidina	nicardipino	pentamidina	
5:0	6,367 (5,682 a 7,134)	--	-	-	-
4:1	6,168 (5,404 a 7,041)	0,023 (0,020 a 0,026)	0,97	0,33	1,3
3:2	4,302 (3,760 a 4,922)	0,043 (0,037 a 0,049)	0,67	0,61	1,29
2:3	2,520 (2,174 a 2,921)	0,056 (0,048 a 0,065)	0,39	0,81	1,20
1:4	1,222 (1,147 a 1,301)	0,073 (0,068 a 0,078)	0,19	1,04	1,24
0:5	-	0,070 (0,059 a 0,083)	-	-	-
	nicardipino	anfotericina B	nicardipino	anfotericina B	
5:0	10,59 (9,817 a 11,43)	--	--	--	--
4:1	10,81 (10,49 a 11,14)	0,010 (0,010 a 0,011)	1,02	0,23	1,25
3:2	8,650 (8,075 a 9,266)	0,023 (0,021 a 0,024)	0,82	0,53	1,35
2:3	6,108 (5,254 a 7,102)	0,036 (0,031 a 0,042)	0,58	0,84	1,41
1:4	2,760 (2,501 a 3,046)	0,044 (0,040 a 0,048)	0,26	1,02	1,28
0:5	--	0,043 (0,035 a 0,052)	--	--	--

Tabela 7 (continuação): Valores de CE₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Associação	CE ₅₀ da associação (IC 95%)		CIF da associação (IC 95%)		ΣCIF
	nimodipino	pentamidina	nimodipino	pentamidina	
5:0	26,53 (24,87 a 28,30)	--	--	--	--
4:1	28,74 (28,02 a 29,47)	0,038 (0,037 a 0,039)	1,08	0,10	1,18
3:2	26,60 (24,91 a 28,42)	0,095 (0,088 a 0,101)	1,00	0,26	1,26
2:3	22,22 (21,27 a 23,21)	0,178 (0,170 a 0,186)	0,84	0,48	1,32
1:4	13,78 (12,45 a 15,25)	0,295 (0,266 a 0,326)	0,52	0,80	1,32
0:5	--	0,367 (0,354 a 0,380)	--	--	--
	nimodipino	anfotericina B	nimodipino	anfotericina B	
5:0	30,30 (28,32 a 32,42)	--	--	--	--
4:1	30,26 (29,18 a 31,38)	0,010 (0,010 a 0,011)	0,99	0,16	1,15
3:2	24,22 (22,61 a 25,94)	0,023 (0,021 a 0,024)	0,79	0,38	1,17
2:3	17,95 (16,47 a 19,57)	0,038 (0,035 a 0,041)	0,59	0,64	1,23
1:4	7,72 (7,00 a 8,52)	0,044 (0,040 a 0,048)	0,25	0,74	0,99
0:5	--	0,059 (0,056 a 0,063)	--	--	--

Tabela 8: Valores de CE₅₀ e CIFs das associações entre BCC e os fármacos padrão em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Associação	CE ₅₀ da associação (IC 95%)		CIF da associação (IC 95%)		ΣCIF
	anlodipino	anfotericina B	anlodipino	anfotericina B	
5:0	3,05 (1,26 - 7,43)	--	--	--	--
4:1	2,57 (1,97 - 3,36)	0,006 (0,004 - 0,008)	0,84	0,04	0,88
3:2	4,09 (3,48 - 4,82)	0,026 (0,022 - 0,031)	1,34	0,18	1,52
2:3	4,54 (2,15 - 9,59)	0,065 (0,031 - 0,137)	1,49	0,46	1,95
1:4	2,28 (1,13 - 4,61)	0,087 (0,043 - 0,175)	0,74	0,62	1,36
0:5	--	0,14 (0,13 - 0,16)	--	--	--
	anlodipino	Glucantime	anlodipino	Glucantime	
5:0	2,93 (2,08 a 4,12)	--	--	--	--
4:1	1,43 (1,29 a 1,58)	4,09 (3,69 a 4,53)	0,49	0,56	1,05
3:2	0,97 (0,83 a 1,13)	7,37 (6,31 a 8,61)	0,33	1,02	1,35
2:3	0,43 (0,37 a 0,50)	7,46 (6,43 a 8,64)	0,15	1,03	1,18
1:4	0,14 (0,12 a 0,16)	6,46 (5,52 a 7,55)	0,05	0,89	0,94
0:5	--	7,25 (6,13 a 8,57)	--	--	--
	nimodipino	anfotericina B	nimodipino	anfotericina B	
5:0	21,97 (16,71 a 28,89)	--	--	--	--
4:1	30,85 (25,24 a 37,70)	0,021 (0,017 a 0,026)	1,40	0,19	1,59
3:2	24,94 (20,37 a 30,54)	0,047 (0,037 a 0,059)	1,13	0,19	1,32
2:3	13,43 (12,08 a 14,92)	0,055 (0,05 a 0,062)	0,61	0,49	1,10
1:4	7,82 (6,94 a 8,82)	0,086 (0,077 a 0,098)	0,35	0,77	1,12
0:5	--	0,112 (0,088 a 0,14)	--	--	--
	nimodipino	Glucantime	nimodipino	Glucantime	
5:0	16,89 (12,71 a 22,44)	--	--	--	--
4:1	6,84 (5,69 a 8,23)	5,70 (4,75 a 6,85)	0,40	0,83	1,23
3:2	2,37 (1,83 a 3,05)	5,26 (4,07 a 6,79)	0,14	0,76	0,9
2:3	0,36 (0,23 a 0,56)	1,82 (1,18 a 2,79)	0,02	0,14	0,16
1:4	0,44 (0,40 a 0,47)	5,82 (5,37 a 6,31)	0,03	0,84	0,87
0:5	--	6,91 (6,18 a 7,74)	--	--	--

Tabela 9: Valores de $\bar{x} \sum \text{CIF}$ das associações entre os BCC e os fármacos padrão em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

Associação	$\bar{x} \sum \text{CIF}$	Forma parasitária
anlodipino + pentamidina	1,47	
anlodipino + afotericina B	1,40	
bepiril + pentamidina	1,19	
bepiril + afotericina B	1,15	
lercanidipino + pentamidina	1,49	
lercanidipino + afotericina B	1,70	promastigotas
nicardipino + pentamidina	1,26	
nicardipino + afotericina B	1,32	
nimodipino + pentamidina	1,27	
nimodipino + afotericina B	1,13	
amlodipino + Glucantime	1,19	
amlodipino + afotericina B	1,43	amastigotas
nimodipino + Glucantime	0,79	
nimodipino + afotericina B	1,28	

$\bar{x} \sum \text{CIF}$: média da somatória das concentrações inibitórias fracionárias.

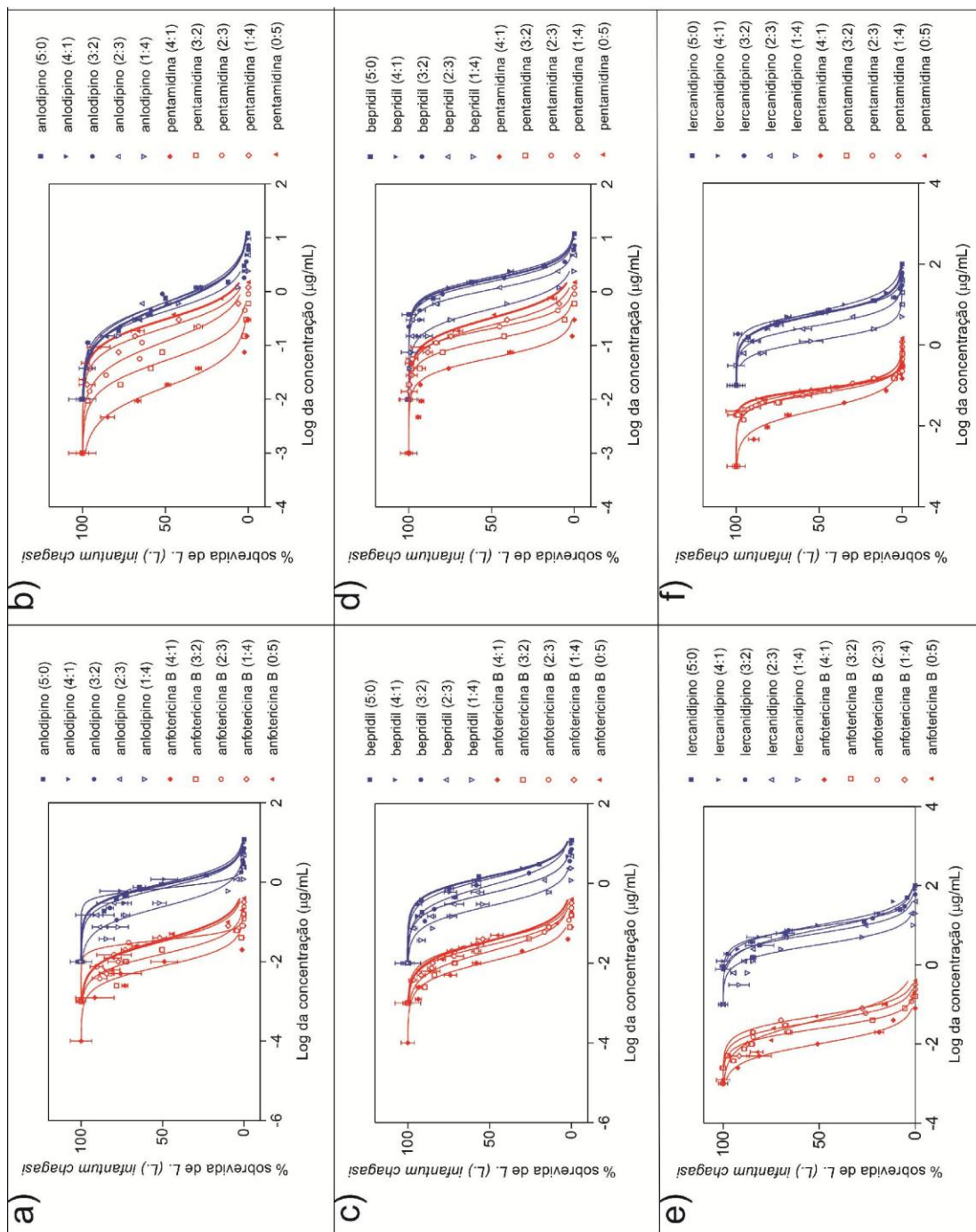


Figura 21: Curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

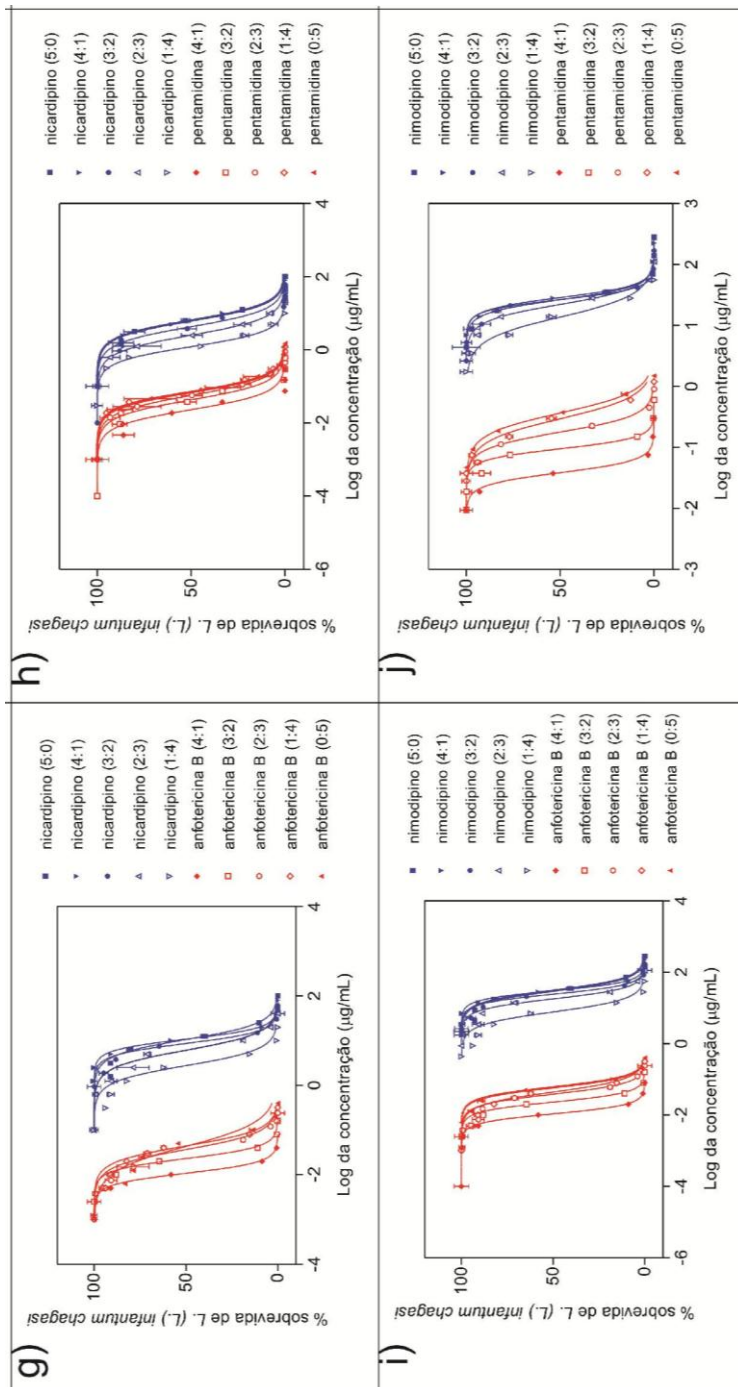


Figura 21 (continuação): Curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamida (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

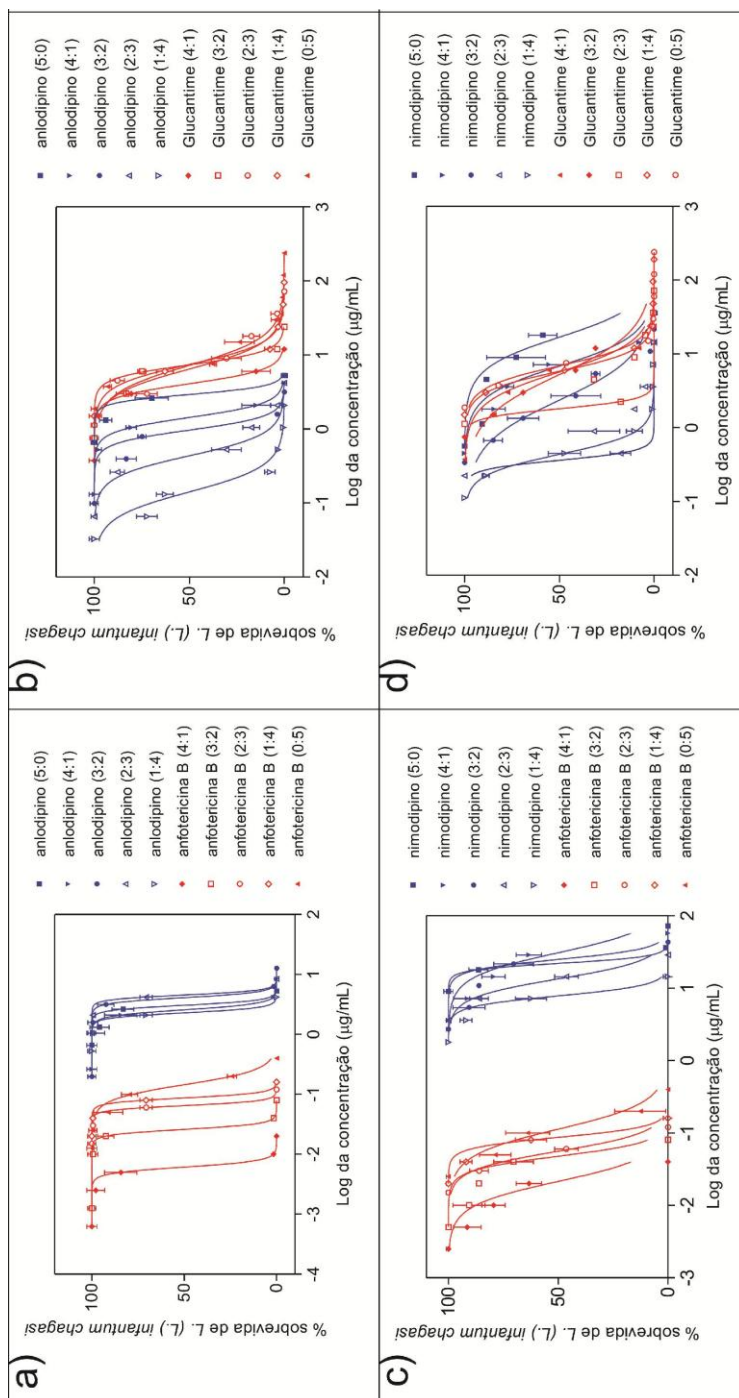


Figura 22: Curvas de dose-resposta obtidas pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

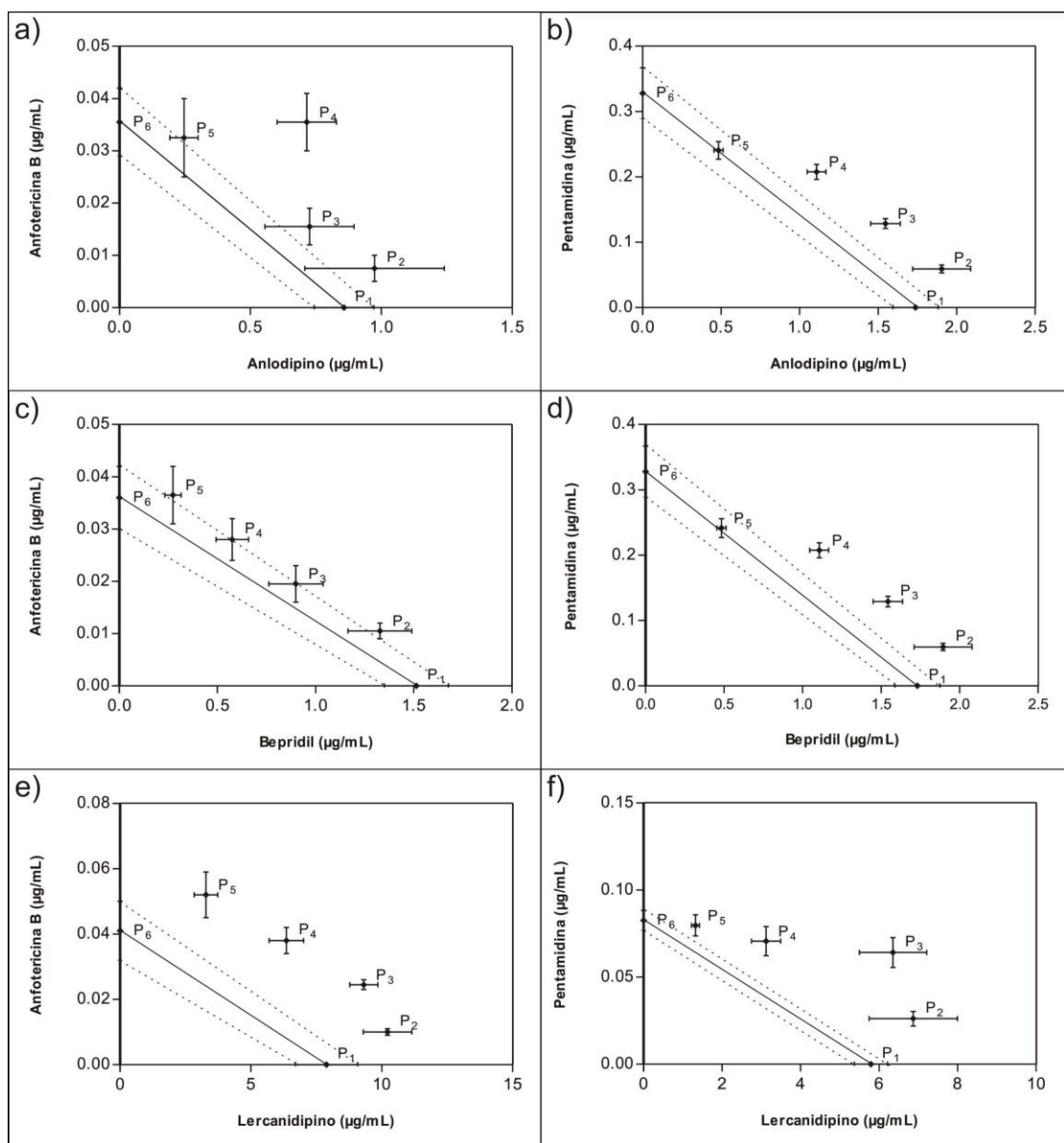


Figura 23: Isobogramas obtidos com base nos valores de CE_{50} pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

As barras ao redor dos pontos correspondem aos valores de desvio padrão. Os pontos P1 a P6 correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 dos BCC e fármacos padrão, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade e as linhas pontilhadas indicam os intervalos de confiança da linha de aditividade.

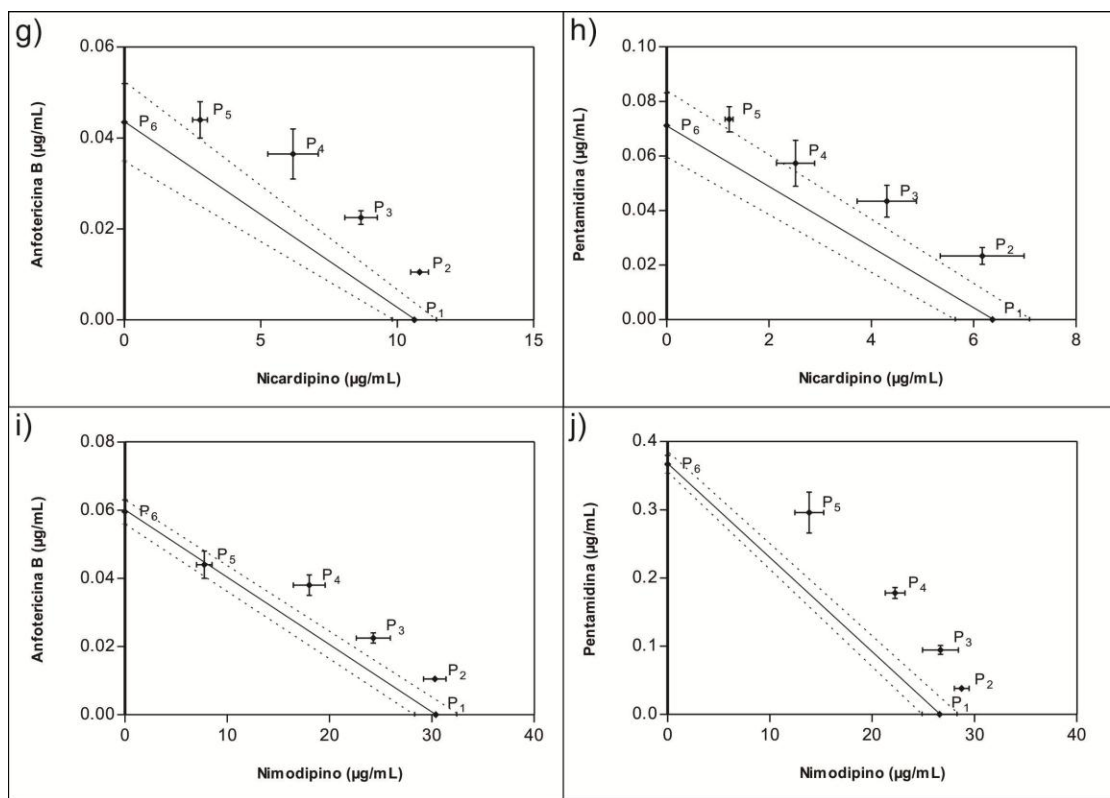


Figura 23 (continuação): Isobogramas obtidos com base nos valores de CE_{50} pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

As barras ao redor dos pontos correspondem aos valores de desvio padrão. Os pontos P1 a P6 correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 dos BCC e fármacos padrão, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade e as linhas pontilhadas indicam os intervalos de confiança da linha de aditividade.

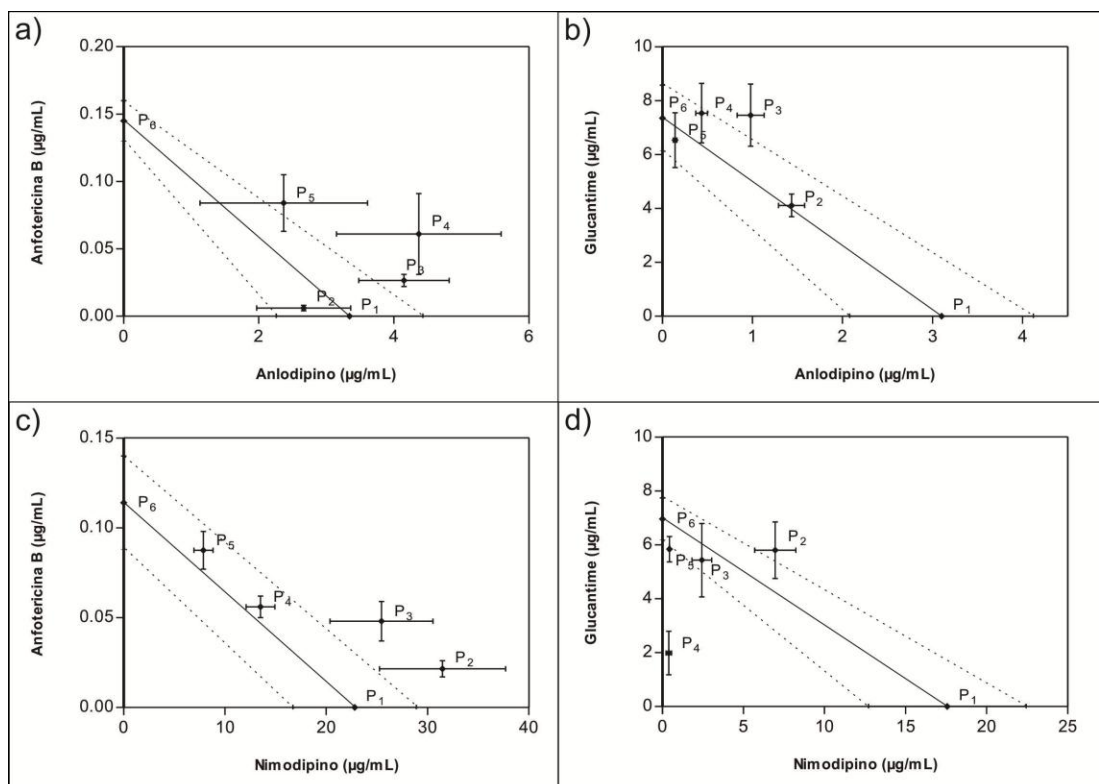


Figura 24: Isobogramas obtidos com base nos valores de CE_{50} pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

As barras ao redor dos pontos correspondem aos valores de desvio padrão. Os pontos P1 a P6 correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 dos BCC e fármacos padrão, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade e as linhas pontilhadas indicam os intervalos de confiança da linha de aditividade.

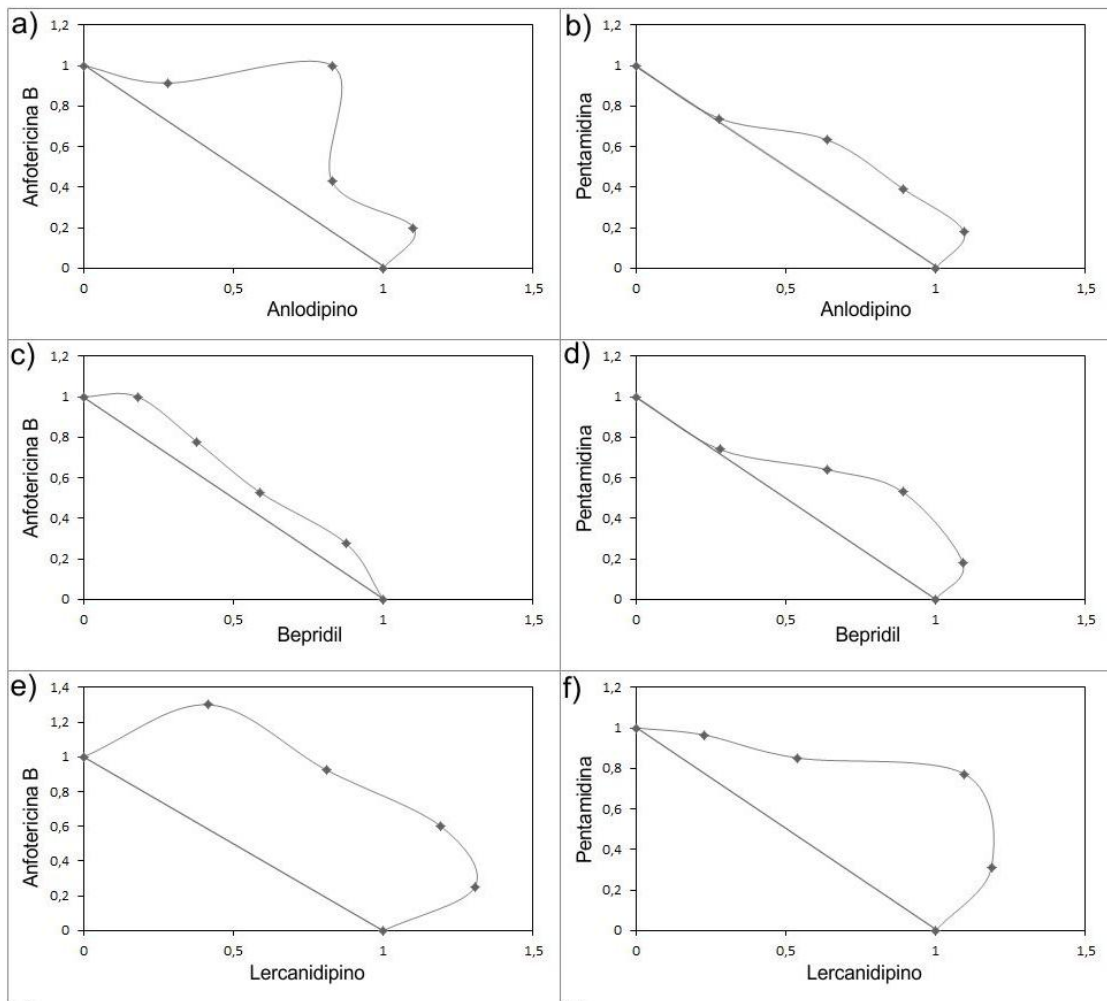


Figura 25: Isobogramas obtidos com base nos valores de CIFs pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

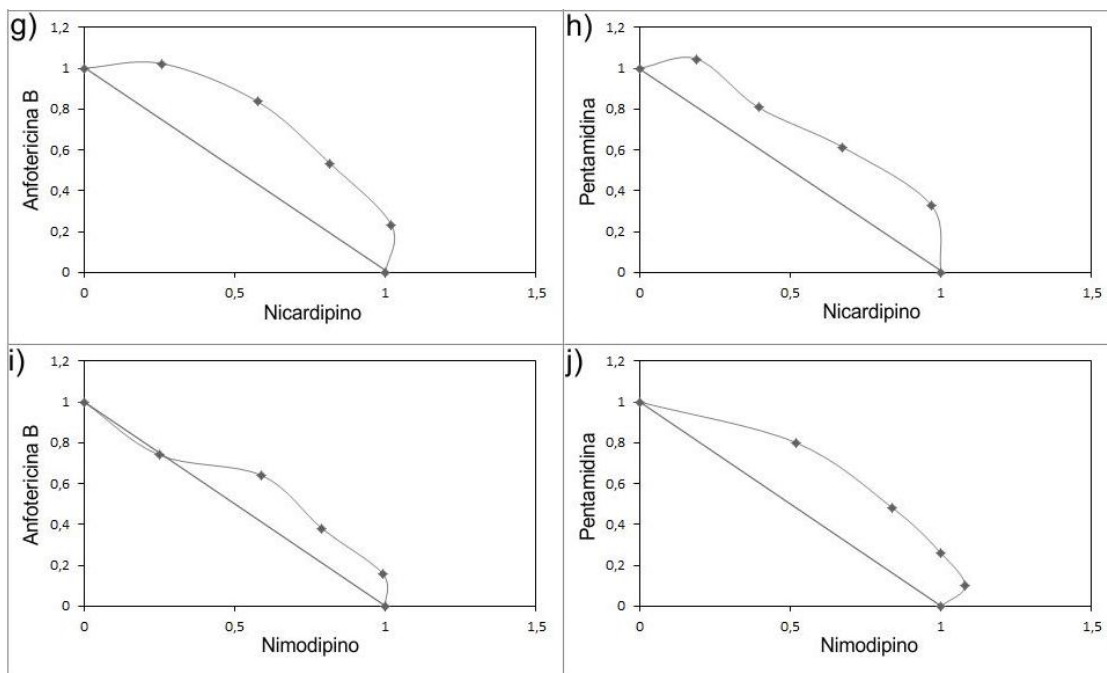


Figura 25 (continuação): Isobologramas obtidos com base nos valores de CIFs pela associação dos BCC anlodipino (a, b), bepridil (c, d), lercanidipino (e, f), nicardipino (g, h) e nimodipino (i, j) com os fármacos padrão anfofericina B (esquerda) e pentamidina (direita) em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

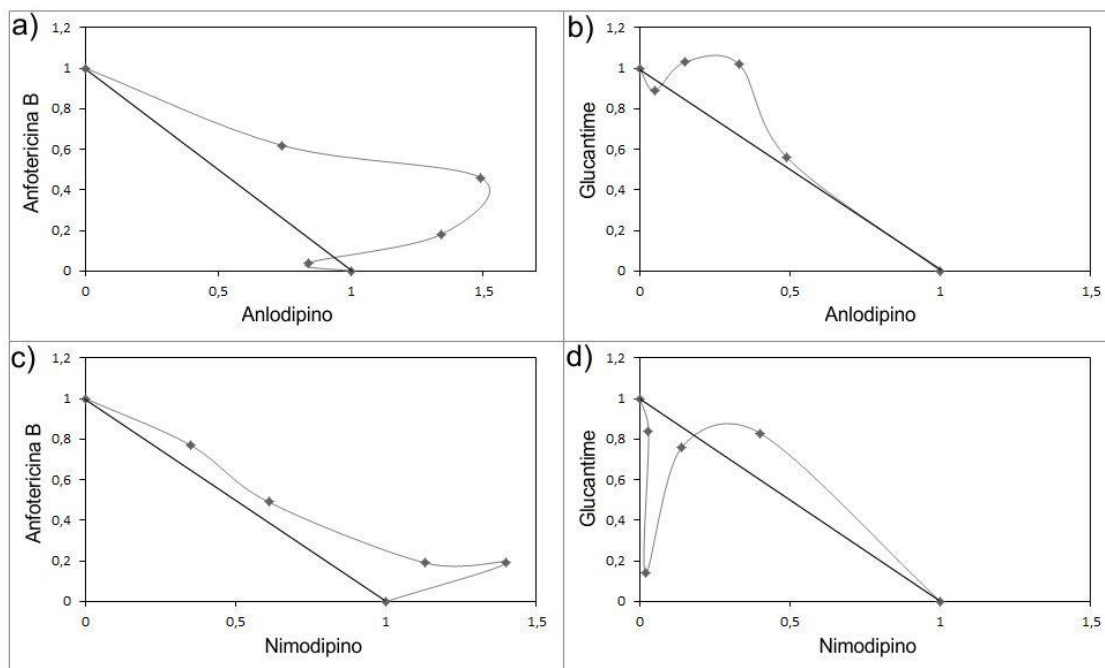


Figura 26: Isobogramas obtidos com base nos valores de CIFs pela associação dos BCC anlodipino (a, b) e nimodipino (c, d) com os fármacos padrão anfotericina B (esquerda) e Glucantime (direita) em amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

3. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram realizados isobogramas *in vitro* em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, para identificação das interações entre os BCC anlodipino, bepridil, lercanidipino, nicardipino e nimodipino e os fármacos padrão pentamidina e anfotericina B. Os BCC anlodipino e nimodipino foram também combinados com Glucantime e anfotericina B para identificação das interações *in vitro* em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

O isobograma é uma representação gráfica, onde são plotados os valores das CE_{50} ou CIFs de dois fármacos, quando administrados em conjunto. Neste gráfico, os interceptos são os pontos que definem a linha de aditividade, e todos os pontos desta linha são coordenadas que representam teoricamente os pares de doses dos fármacos administrados em conjunto que dariam um efeito aditivo. A representação gráfica do isobograma fornece uma visão das doses aditivas teóricas (e doses experimentais) e é conveniente para representar os resultados, mas não é usado para análises estatísticas (Tallarida et al., 1997). Para esta finalidade, são usados os valores de Σ CIF (Tallarida, Kimmel, Holtzman, 1997).

Tradicionalmente, os valores de CIFs podem ser assim classificados: sinergismo: $CIF < 1$; antagonismo: $CIF > 1$; interação indiferente: $CIF = 1$ (Berembaum 1978). Porém, observa-se que esta classificação leva a erros de interpretação, devido às variações experimentais. Diante disso, Odds (2003) propôs a interpretação dos valores de CIF da seguinte maneira: sinergismo: $CIF < 0,5$; antagonismo: $CIF > 4$; interação indiferente: $CIF > 0,5$ e < 4 . Por este motivo, a classificação proposta por Odds (2003) foi adotada para a análise dos valores de CIF no presente trabalho.

A terminologia utilizada para interpretar os resultados dos isobogramas é muitas vezes objeto de debate (Johnson et al., 2004). Greco e colaboradores (1995) propuseram um conjunto de termos que são

consenso instrutivo. Nesta proposta, sinergismo e antagonismo têm significado claro e intuitivo. Os termos utilizados para descrever os resultados que não são nem sinérgicos nem antagônicos, no entanto, podem causar interpretações equivocadas. Isso porque o termo "aditivo" transmite uma imprecisa mensagem e pode ser interpretado como se referindo a uma interação positiva. Termos como "subaditivo" só reforçam essa concepção errônea. Possíveis alternativas ao termo "aditivo" incluem os termos "ausência de interação" e "indiferente" (Odds, 2003; Johnson et al., 2004). A utilização destes termos oferece ao leitor um lembrete constante da natureza neutra do resultado. Por esta razão, neste trabalho são usados os termos "sinérgico", "indiferente", e "antagônico" para a interpretação das interações entre os fármacos.

Apesar de os amastigotas intracelulares proverem informações mais relevantes nos estudos de fármacos *in vitro* para LV, o uso de promastigotas axênicos também poderia prover informações úteis, especialmente em estudos de associação de fármacos. A presença da célula hospedeira poderia contribuir para a ocorrência de sinergismo, por exemplo, devido à ativação do macrófago. Realizando-se o estudo com ambas as formas do parasita, os resultados obtidos podem ser comparados, levando-se em consideração a interferência do macrófago no experimento.

O método de isoblograma baseado em proporções fixas, utilizado no presente trabalho, é mais vantajoso em relação ao método do xadrez (ou *checkerboard*) porque as curvas dose-resposta geradas pelas proporções fixas dependem das taxas de concentração dos fármacos, cada um sendo calculado em uma faixa de 100 a 0% de inibição do crescimento do parasita, permitindo uma curva de regressão acurada e o cálculo do CE₅₀ (Fivelman, Adagu, Warhurst, 2004). Entretanto, este método não determina necessariamente a eficácia de uma associação de fármacos no hospedeiro, já que isto depende de características farmacocinéticas (Seifert, Croft, 2006).

Vale ressaltar que os ensaios de associação *in vitro* medem a atividade parasitária direta, mas ignoram a farmacocinética destes fármacos.

Os ensaios *in vitro* nem sempre são preditivos de interações *in vivo* e não avaliam os possíveis eventos adversos causados por associações de fármacos (Kremsner, Krishna 2004; Seifert e Croft, 2006). Este contexto é o raciocínio para a realização de estudos *in vitro* e para a identificação de interações sinérgicas em nível celular como um primeiro passo; o segundo passo é a avaliação das interações *in vivo* (Seifert e Croft, 2006).

A posição relativa dos pontos no isoblograma foi avaliada com os valores das CIFs e com a representação dos intervalos de confiança entre os CE_{50} obtidos. Neste último, pôde-se observar uma faixa de confiança em torno da isóbole de aditividade e os intervalos de confiança em torno dos valores de CE_{50} , tornando possível a visualização da amplitude de variação da dose estimada (Kruse et al., 2006). A comparação entre estas duas diferentes formas de construção de isobogramas mostrou que a visualização dos intervalos de confiança e faixas de confiança torna o gráfico mais informativo e a interpretação das interações desta forma é mais segura. Mesmo assim, os valores de CIF são usados com mais frequência para construção de isobogramas, e por isso foram também apresentados neste trabalho. Neste tipo de gráfico de dispersão, podem ser adicionadas as linhas de tendência, que permitem fazer uma estimativa da relação entre variáveis para que determinado valor possa ser previsto. Desta forma, ambos os isobogramas (baseado nos valores de CE_{50} ou das CIFs) apresentam características peculiares e podem ser considerados em conjunto.

As associações dos BCC com os fármacos padrão foram classificadas como indiferente, de acordo com os valores de $\bar{x} \sum CIFs$. Estes resultados sugerem que não ocorreram interações físico-químicas e biológicas entre os BCC e os fármacos padrão. A associação de nimodipino e Glucantime mostrou-se mais promissora em amastigotas, de acordo com a análise gráfica do isoblograma e conforme observado pelo valor da $\bar{x} \sum FIC$, embora tenha sido também classificada como indiferente.

Os resultados das associações de BCC e os fármacos padrão são também apresentados no anexo 8 na forma de artigo científico.

CAPÍTULO 4

Furazolidona

1. INTRODUÇÃO

Furazolidona é um nitrofurano sintético, com atividade antibacteriana e antiprotozoária. Este fármaco é ativo contra uma série de microorganismos incluindo *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp (Llovet et al., 1990), *Pneumocystis jiroveci* (Walzer, Kim, Foy, 1991), *Helicobacter pylori* (Guslandi 2001; Cianci et al., 2006) e diferentes espécies de *Leishmania* (Berman, Lee 1983; Neal, Bueren, Hooper, 1988). Furazolidona é usada no tratamento de tricomoníase (Giron Blanc, 1959), cólera e giardíase (Webster, 1960; Lerman, Walker, 1982; Khaw, Panosian, 1995).

Quando administrado por via oral a camundongos, furazolidona mostrou baixa toxicidade, com um valor de DL₅₀ de 1,78 mg/kg (Beveridge et al., 1980). Costa et al. (1985) demonstraram ausência de atividade clínica da furazolidona administrada oralmente a pacientes com as lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* e sugeriram que os resultados foram devidos à pobre absorção oral do fármaco.

Levando-se em consideração que a furazolidona apresenta atividade *in vitro* contra diferentes microrganismos, incluindo protozoários patogênicos como *Leishmania* spp, e sabendo-se que este fármaco apresenta pobre absorção oral (Costa et al., 1985), o desenvolvimento de formulações lipossomais de furazolidona poderia contribuir para a descoberta de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose.

2. RESULTADOS

2.1. Determinação da atividade antiparasitária e da citotoxicidade

Furazolidona apresentou atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi* e um IS de 8, considerando-se a citotoxicidade contra monócitos THP-1. Promastigotas de *Leishmania* foram também suscetíveis à furazolidona, com valores de CE₅₀ entre 0,47 a 0,73 µg/mL (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp. e citotoxicidade da furazolidona.

Célula	CE ₅₀ (95% IC)	
	µg/mL	µM
Promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	0,71 (0,56 - 0,90)	3,15 (2,49 - 3,99)
Amastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	1,58 (1,51 - 1,66)	7,02 (6,71 - 7,37)
Promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	0,47 (0,41 - 0,53)	2,09 (1,82 - 2,35)
Promastigotas de <i>L. (L.) major</i>	0,61 (0,54 - 0,68)	2,71 (2,39 - 3,02)
Promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	0,73 (0,66 - 0,80)	3,24 (2,93 - 3,55)
Citotoxicidade - monócitos THP-1	13,08 (10,14 - 16,88)	58,09 (45,03 - 74,97)
Citotoxicidade - macrófagos peritoneais	13,45 (11,49 - 15,75)	59,73 (51,03 - 69,95)

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%.

2.2. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* causadas por furazolidona

Os danos ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* causados por furazolidona foram observados após diferentes períodos de incubação (Figura 27). As alterações foram tempo-dependente, iniciando os danos após 12 horas de incubação. Após este período, verificou-se abundância de vacúolos intracitoplasmáticos (Figura 27a). Após 20 horas (Figura 27c) verifica-se alteração da forma promastigota para uma forma arredondada, semelhante à forma amastigota, com abundância de vacúolos, porém sem danos ao cinetoplasto e núcleo. A perda de organelas citoplasmáticas foi verificada após 26 horas de incubação (Figura 27d, e), com significativo aumento da área das mitocôndrias e danos intensos ao núcleo, como o descolamento da membrana nuclear (Figura 27d, seta). Apesar do intenso dano celular, não se verificou a indução de poros na membrana plasmática. Todos os parasitas foram destruídos após 40 horas de incubação.

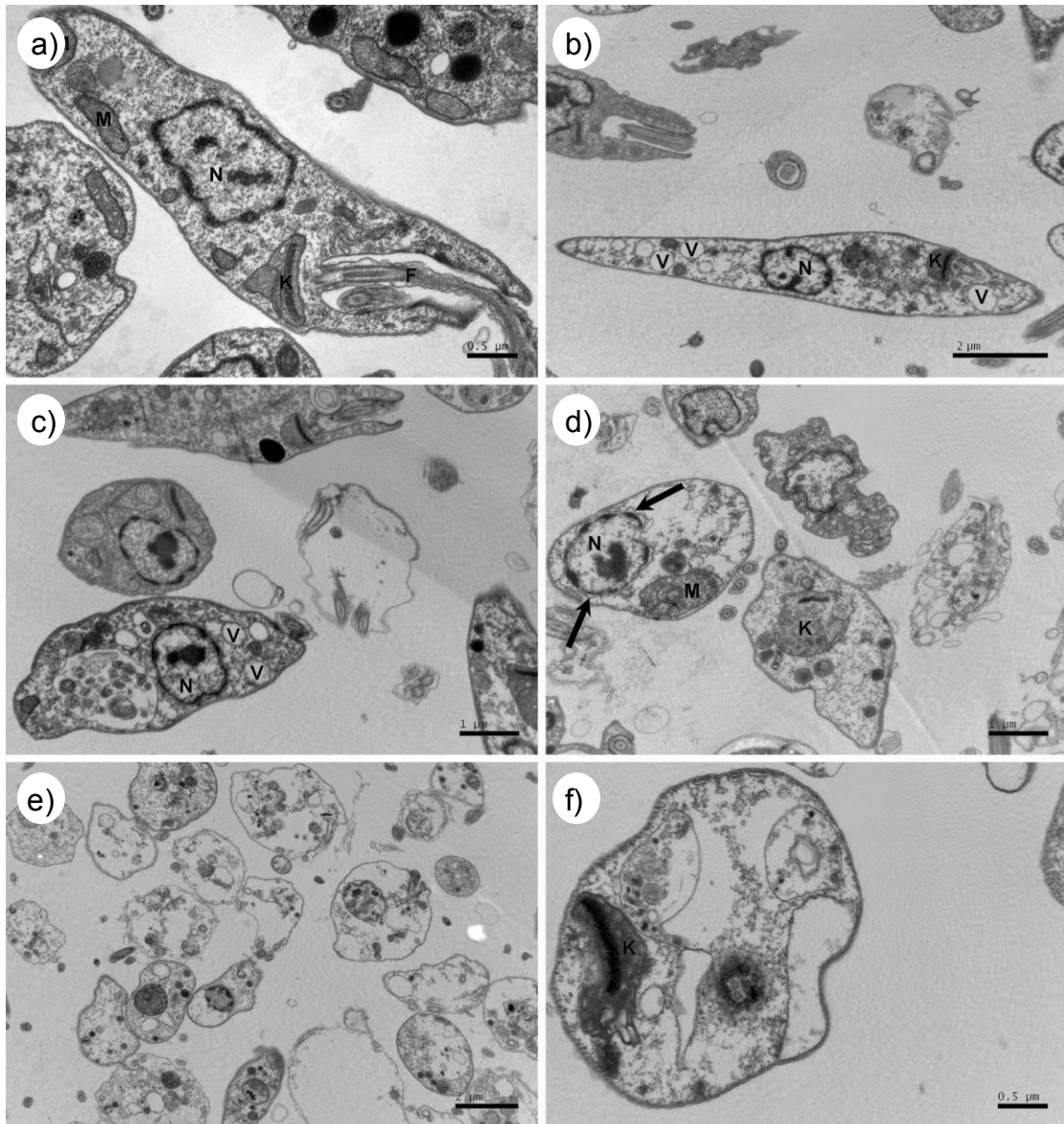


Figura 27: Imagem adquirida em MET. Observação de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* incubados com furazolidona. Os promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C em estufa BOD.

a) controle; b) 12 horas de incubação; c) 20 horas de incubação; d,e) 26 horas de incubação; f) 40 horas de incubação; K- cinetoplasto; M- mitocôndria; N- núcleo; F- flagelo; V- vacúolo.

2.3. Avaliação da produção de NO

Furazolidona foi incubada por com macrófagos peritoneais em concentrações não tóxicas. Após 24 horas, observou-se que furazolidona não induziu a produção de NO e causou inibição de 50% na produção de NO quando incubado com LPS (Figura 28).

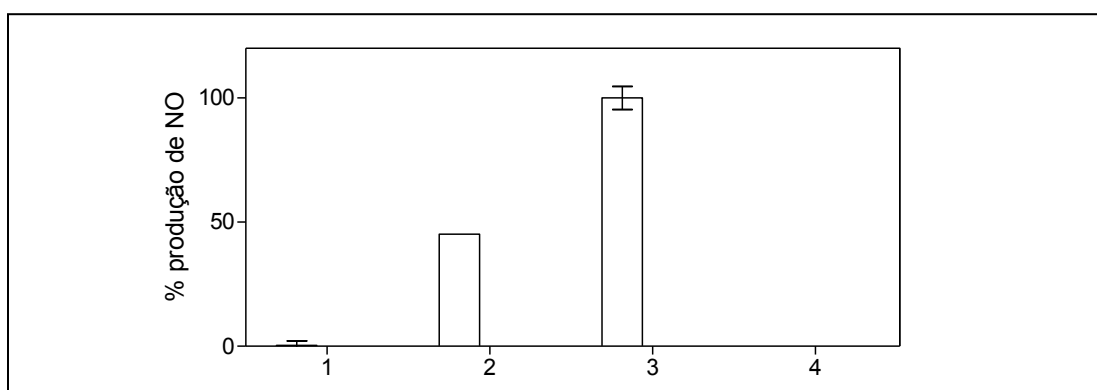


Figura 28: Dosagem da produção de NO por macrófagos após incubação com furazolidona.

1: Furazolidona; 2: Furazolidona + LPS; 3: LPS; 4: controle.

2.4. Avaliação *in vivo* da furazolidona livre e sua formulação lipossomal

Furazolidona reduziu a carga parasitária em 82% ($p < 0,05$) no baço e 85% no fígado ($p < 0,05$) dos hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Glucantime reduziu a carga parasitária em 95% ($p < 0,05$) e 92% ($p < 0,05$) no baço e fígado, respectivamente. Furazolidona lipossomal reduziu a carga parasitária do baço em 74% ($p < 0,05$), porém não se observou redução significativa no fígado quando comparado ao grupo controle (Figura 29 e Tabela 11).

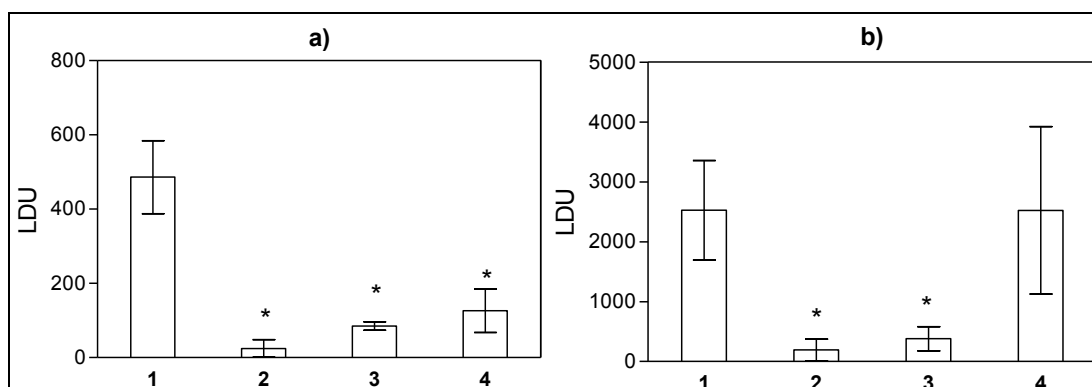


Figura 29: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* do fármaco furazolidona e sua formulação lipossomal. Carga parasitária no baço (a) e no fígado (b) de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, determinada pela técnica de LDU.

1: controle; 2: Glucantime; 3: furazolidona; 4: furazolidona lipossomal; * P < 0,05 quando comparado ao grupo controle.

Tabela 11: Avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* do fármaco furazolidona e sua formulação lipossomal. Carga parasitária no baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*.

Fármaco ou formulação	Baço		Fígado	
	Carga parasitária (SEM)	% redução na carga parasitária*	Carga parasitária (SEM)	% redução na carga parasitária*
Furazolidona	84,94 (11,48)**	82,25	379,85 (202,99)**	85,00
Furazolidona LP	126,09 (58,72)**	74,1	1710,67 (711,44)	32,3
Glucantime	24,46 (26,63)**	95,0	191,73 (179,7)**	92,4
Controle	486,05 (98,08)	0	2526,16 (830,47)	0

LP: formulação lipossomal; SEM: Desvio padrão da média; *carga parasitária determinada pela técnica de LDU; ** P < 0,05 quando comparado ao grupo controle

3. DISCUSSÃO

Furazolidona apresentou atividade semelhante ao fármaco padrão pentamidina em promastigotas ($P < 0,05$), e apresentou atividade 17 vezes maior que Glucantime contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*. Existem relatos sobre a atividade de furazolidona contra amastigotas de *L. (L.) tropica* ($CE_{50} = 0,53 \mu\text{g/mL}$), *L. (L.) donovani* ($0,33 \mu\text{g/mL}$), *L. (L.) major* ($3,1 \mu\text{g/mL}$), e *L. (L.) enriettii* ($3,26 \mu\text{g/mL}$) (Berman, Lee, 1983; Neal, Bueren, Hooper, 1988). Estes valores de CE_{50} estão próximos ao encontrado no presente estudo contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* ($CE_{50} = 1,58 \mu\text{g/mL}$).

O estudo das alterações ultraestruturais causadas por furazolidona em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* confirmam sua atividade anti-*Leishmania*, como observado pela completa alteração da morfologia e perda de organelas. Estes resultados sugeriram que a mitocôndria e a membrana nuclear são os alvos de ação deste fármaco.

A produção de NO pelo macrófago após a incubação com furazolidona foi mensurada, com o objetivo de avaliar se a morte dos amastigotas intracelulares está relacionada à ativação do macrófago. O NO é um metabólito frequentemente produzido pelos macrófagos como um mecanismo defensivo contra microorganismos, devido à sua capacidade de formar espécies reativas de nitrogênio (Balestieri et al., 2002). Não foi observado aumento na produção de NO pelos macrófagos na presença de furazolidona, o que sugere que sua ação seja resultado de uma atividade direta contra o parasita. Observou-se, também, que furazolidona inibiu a produção de NO pelo macrófago, sugerindo um possível mecanismo antiinflamatório. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese. No organismo, o NO é sintetizado a partir de arginina e O_2 , pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada et al., 1991). Na literatura, não há relatos da inibição da atividade da NOS mediada por furazolidona.

No presente estudo, furazolidona apresentou um IS igual a 8,5 e não foi observada toxicidade para os macrófagos em concentrações próximas ao CE₅₀ contra amastigotas. Com base na atividade *in vitro* apresentada por furazolidona contra *L. (L.) infantum chagasi*, foram realizados estudos experimentais para avaliar a eficácia *in vivo* deste fármaco. Desta forma, foi possível observar que furazolidona reduziu a carga parasitária do baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e apresentou eficácia semelhante ao Glucantime, quando administrado na mesma dose.

Furazolidona mostrou redução não significativa da carga parasitária no tratamento oral de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* (Neal, Bueren, Hooper, 1988). Costa e colaboradores (1985) demonstraram ausência de atividade clínica quando administrada oralmente a pacientes com as lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* e sugeriram que os resultados foram devidos à pobre absorção oral do fármaco. Em contraste, os resultados apresentados no presente trabalho demonstram a eficácia de furazolidona no tratamento de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Estas diferenças entre resultados podem ser atribuídas aos seguintes fatores: i) a diferença na suscetibilidade de espécies de *Leishmania* para um fármaco específico, especialmente quando considerado o modelo *in vivo*; ii) o diferente modelo animal e iii) a diferente via de administração.

Os ensaios *in vivo* demonstraram que o tratamento com furazolidona lipossomal (0,5 mg/kg/dia) levou à redução da carga parasitária no baço, em uma dose 100 vezes menor que o fármaco livre (50 mg/kg/dia). Estes resultados serão discutidos no capítulo 6. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* da furazolidona são também apresentados nos anexos 4 e 5 na forma de artigo científico.

CAPÍTULO 5

Buparvaquona

1. INTRODUÇÃO

Buparvaquona é uma naftoquinona usada na clínica veterinária para terapia e profilaxia da teileriose. Além disso, este fármaco apresenta promissora atividade contra protozoários, incluindo *Leishmania* spp. (Croft et al., 1992), *Plasmodium falciparum* (Gokhale et al., 2003) e *Cryptosporidium parvum* (Müller, Jacobs, 2002).

Apesar de sua atividade anti-*Leishmania in vitro* em concentrações nanomolares e notável seletividade (Croft et al., 1992), em experimentos *in vivo*, buparvaquona a 100 mg/kg/dia mostrou baixa supressão da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) donovani* (Croft et al., 1992). Outro experimento relata o tratamento de cães infetados com *L. (L.) infantum* com buparvaquona a 5 mg/kg/dia por 12 dias, mas nenhum efeito foi observado (Vexenat et al., 1998).

Desde a sua descoberta como um agente anti-*Leishmania* (Croft et al., 1992), vários derivados de buparvaquona foram propostos, visando superar a elevada lipofilicidade ($\log P = 5,3$). Como alternativa, pró-fármacos solúveis em água foram sintetizados e testados em camundongos infectados com *L. (L.) donovani*. Buparvaquona-3-fosfato mostrou ser a melhor formulação oral, mas apenas uma leve redução na carga parasitária no fígado (34%) pôde ser observada quando administrado a 50 mg/kg/dia (Garnier et al., 2007a; 2007b). A baixa atividade *in vivo* deste composto é consequência de sua baixa hidrossolubilidade (< 1 mg/L), o que compromete a biodisponibilidade pelas vias oral, subcutânea e tópica (Müller, Jacobs, 2002). Diante disso, buscou-se desenvolver uma formulação lipossomal de buparvaquona, visando à liberação dirigida de fármaco aos macrófagos infectados. Buscou-se, ainda, avaliar a atividade *in vitro* da buparvaquona contra espécies de *Leishmania* encontradas nas Américas.

2. RESULTADOS

2.1 Determinação da atividade antiparasitária e da citotoxicidade

Buparvaquona apresentou atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi* e ausência de citotoxicidade na concentração máxima testada (100 µg/mL), o que indicou um IS maior que 136. Promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram incubados com buparvaquona por 24 e 72 horas e não foram observadas diferenças nos valores de CE₅₀. Outras espécies de *Leishmania* foram também suscetíveis à buparvaquona, com valores de CE₅₀ entre 1,5 a 4,19 µM (Tabela 12).

Tabela 12: Valores de CE₅₀ contra *Leishmania* spp. e citotoxicidade da buparvaquona.

Célula	CE ₅₀ (95% IC)	
	µg/mL	µM
Promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ¹	0,73 (0,67 - 0,80)	2,24 (2,05 - 2,45)
Promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ²	0,76 (0,68 - 0,86)	2,33 (2,08 - 2,63)
Amastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	0,49 (0,46 - 0,53)	1,50 (1,41 - 1,62)
Promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	1,37 (1,18 - 1,59)	4,19 (3,61 - 4,87)
Promastigotas de <i>L. (L.) major</i>	1,07 (0,93 - 1,23)	3,28 (2,85 - 3,77)
Promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	0,49 (0,38 - 0,62)	1,50 (1,16 - 1,90)
Citotoxicidade - células LLC-MK2	> 100	> 229,75
Citotoxicidade - monócitos THP-1	> 100	> 229,75
Citotoxicidade - macrófagos peritoneais	> 100	> 229,75

CE₅₀: concentração efetiva 50%; IC 95%: intervalo de confiança 95%; ¹: 24 horas de incubação; ²: 72 horas de incubação.

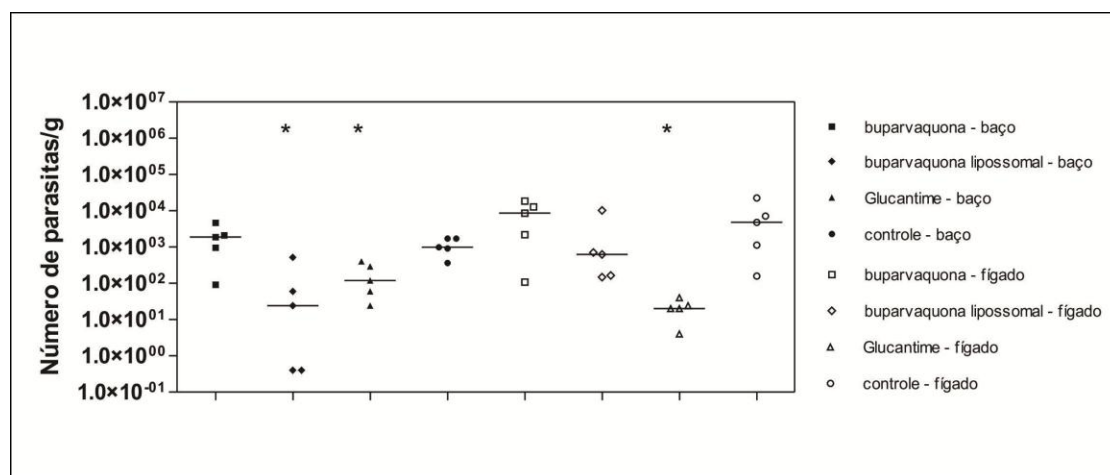
2.2. Avaliação *in vivo* da buparvaquona e sua formulação lipossomal

Não foi observada redução da carga parasitária nos animais tratados com buparvaquona livre a 20 mg/kg/dia. Estes animais apresentaram em média 1.944 amastigotas por grama no baço (SEM = 770) e 8.532 amastigotas no fígado (SEM = 3.424).

Buparvaquona lipossomal reduziu em 89,4% ($P < 0,05$) o número de amastigotas no baço e em 67,2% ($P > 0,05$) no fígado, e os animais neste grupo apresentaram uma média de 120 amastigotas por grama no baço (SEM = 120) e 2.372 amastigotas no fígado (SEM = 1.963)

Glucantime a 50 mg/kg/dia reduziu o número de amastigotas em 84,3% ($P < 0,05$) e 99,7% ($P < 0,05$), com uma média de 179 (SEM = 71) e 21,6 (SEM = 5,7) amastigotas por grama no baço e fígado, respectivamente.

O grupo controle resultou em uma média de 1.141 amastigotas por grama no baço (SEM = 259) e 7.234 amastigotas por grama no fígado (SEM = 4.089) (Figura 30).



3. DISCUSSÃO

No presente trabalho, espécies cutâneas brasileiras foram suscetíveis a buparvaquona, sendo que a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou o menor valor de CE₅₀. Buparvaquona também foi eficaz contra outras espécies, como *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum chagasi*, com valores de CE₅₀ semelhante à pentamidina.

A atividade anti-*Leishmania in vitro* de buparvaquona foi descrita na literatura, com valores de CE₅₀ entre 0,001 e 0,042 µM contra promastigotas (Mantyla et al., 2004), valores inferiores aos aqui encontrados (CE₅₀ = 1,50 a 4,19 µM). Ainda que sejam espécies distintas, consideramos que estas diferenças sejam devidas aos diversos protocolos adotados nos experimentos.

Buparvaquona apresentou também atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*, com valor CE₅₀ aproximadamente 27 vezes menor do que o fármaco padrão Glucantime. Este é o primeiro relato de atividade de buparvaquona contra *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. Considerando as diferenças de suscetibilidade entre as espécies de *Leishmania*, o valor de CE₅₀ observado contra amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (CE₅₀ = 1,50 µM) mostrou-se consistente com o relatado para amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (CE₅₀ entre 0,43 e 5,49 µM) (Mantyla et al., 2004).

Buparvaquona não mostrou nenhuma atividade hemolítica e citotoxicidade para células de mamíferos até a concentração máxima testada, o que indicou um IS maior que 150. Devido a isto, consideramos promissores a síntese de análogos e estudos de QSAR utilizando buparvaquona como protótipo. O estudo de análogos de buparvaquona levou à síntese de um composto com alta solubilidade em água e boa estabilidade química para formulação, sendo rapidamente hidrolisado enzimaticamente *in vivo*. No entanto, em estudos experimentais, este

análogo mostrou baixa eficácia (Mantyla et al., 2004a, 2004b, Garnier et al., 2007a, 2007b).

Em experimentos *in vivo*, buparvaquona livre não levou à redução da carga parasitária do baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. O grupo tratado com este fármaco não foi significativamente diferente do grupo controle. Estes resultados corroboram os achados de Vexenat e colaboradores (1998). Os autores relataram a ausência de eficácia deste fármaco no tratamento de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, após 12 dias de tratamento à 5 mg/kg/dia (Vexenat et al., 1998). Em contraste, existe relato de redução de 60% da carga parasitária do fígado de camundongos infectados com *L. (L.) donovani* após tratamento com buparvaquona à 100 mg/kg/dia (Croft et al., 1992). Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes espécies e modelos animais, doses e vias de administração utilizados.

Sabendo-se que este composto apresenta baixa hidrossolubilidade, o que compromete sua biodisponibilidade (Müller, Jacobs, 2002), desenvolveu-se uma formulação lipossomal de buparvaquona e avaliou-se sua atividade *in vivo* em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. A confecção de buparvaquona lipossomal e os resultados do ensaio *in vivo* com esta formulação serão descritos no capítulo 6. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* da buparvaquona são também apresentados no anexo 9 na forma de artigo científico.

CAPÍTULO 6

Lipossomos

1. INTRODUÇÃO

Lipossomos são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso; são biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos (Batista, Carvalho, Magalhães, 2007). Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga de superfície, fluidez de membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, os lipossomos se tornaram bons candidatos a transportadores de fármacos, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos tóxicos da terapia (Torchilin, 2005). Inúmeros trabalhos de desenvolvimento de formulações com objetivo terapêutico para várias doenças relatam a eficácia e a segurança dos tratamentos realizados com formulações lipossomais, constatando uma grande vantagem em relação aos tratamentos convencionais (Schwendener 2007; Owais, Gupta, 2008).

A carga da superfície dos lipossomos pode ser manipulada pela introdução de lipídeos neutros, como também carregados positivamente ou negativamente na bicamada lipídica (Batista, Carvalho, Magalhães, 2007). Em geral, a presença de uma carga eletrostática na superfície dos lipossomos promove a interação com biomoléculas, tais como as opsoninas, e com células, sendo então removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomos neutros (Laverman et al., 1999). Banerjee (2001) afirma que a captura de lipossomos carregados negativamente no baço é cerca de duas vezes maior do que os carregados positivamente.

As propriedades do lipossomo, como tamanho, composição e teor de colesterol na superfície da bicamada lipídica determinam o grau de penetração dos lipossomos nos macrófagos (Agrawal, Gupta, 2000; Katragadda, Bridgman, Betageri, 2000; Schiffelers, Storm, Bakker-

Woudenberg, 2001; Ahsan et al., 2002). Lipossomos carregados negativamente contendo fosfatidilserina são capazes de fornecer maior quantidade de fármaco aos macrófagos do que os lipossomos neutros ou positivos (Katragadda, Bridgman, Betageri, 2000).

A inclusão de colesterol na composição dos lipossomos, que é uma prática frequente, aumenta a rigidez da bicamada lipídica, que então dificulta a interação com a célula. Assim, a presença de quantidades crescentes de colesterol diminui a penetração celular de vesículas (Katragadda, Bridgman, Betageri, 2000; Ahsan et al., 2002). O colesterol também favorece a estabilidade dos lipossomos contra lipoproteínas séricas, aumentando o tempo de circulação no sangue, mas diminui a porcentagem de encapsulação do fármaco, pois modifica a espessura da membrana (Karlowsky, Zhanel, 1992; Vitas, Díaz, Gamazo, 1996).

Após administração intravenosa, lipossomos convencionais são rapidamente capturados pelo SFM. A tendência dos lipossomos de serem capturados pelo SFM pode ser uma vantagem no tratamento de diversas doenças infecciosas causadas por agentes intracelulares (Batista, Carvalho, Magalhães, 2007). Além disso, foi demonstrado que a inclusão de fosfatidilserina na membrana de lipossomos resulta na liberação dirigida de fármacos para amastigotas intracelulares, como resultado da interação com os receptores *scavenger* de macrófagos (SRs) (Tempone et al., 2004).

O principal mecanismo pelo qual os lipossomos são capturados pelas células fagocíticas segue várias etapas: adsorção pela membrana celular, interiorização da vesícula por meio de um mecanismo dependente de energia, fusão das vesículas de endocitose com os lisossomos e degradação dos lipossomos por enzimas lisossomais, liberando o fármaco encapsulado dentro deles (Karlowsky, Zhanel, 1992; Ahsan et al., 2002). Devido a isto, os lipossomos são úteis no tratamento de infecções causadas por microorganismos que residem no lisossoma (Briones, Colino, Lanao, 2008).

Os amastigotas vivem no interior de fagolisossomos localizados dentro dos macrófagos, que constituem importantes barreiras estruturais que

devem ser superadas pelos fármacos anti-*Leishmania*. O uso de fármacos encapsulados em lipossomos visa superar essas barreiras, visto que este transportador é facilmente fagocitado pelas células-alvo (Romero, Morilla, 2008).

Vários métodos são preconizados para a preparação dos diferentes tipos de lipossomos. A maioria dos métodos inclui a hidratação de um filme lipídico, onde primeiramente os lipídeos são dissolvidos em solvente orgânico, seguido da evaporação do solvente com consequente formação do filme lipídico. A hidratação deste último pode ser efetuada com água ou solução tampão, sob agitação. Diferentes métodos são utilizados para produzir dispersões homogêneas de lipossomos, podendo-se empregar processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os mais frequentes são os processos mecânicos, em que estão incluídos: extrusão através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades, congelamento e descongelamento sucessivos e sonicação (Lasic, 1993).

Durante a confecção de lipossomos, o fármaco pode ser incorporado à solução tampão, caso seja um composto hidrofílico, ou pode ser dissolvido na mistura lipídica, caso seja um composto lipofílico (Figura 31) (Batista, Carvalho, Magalhães, 2007).

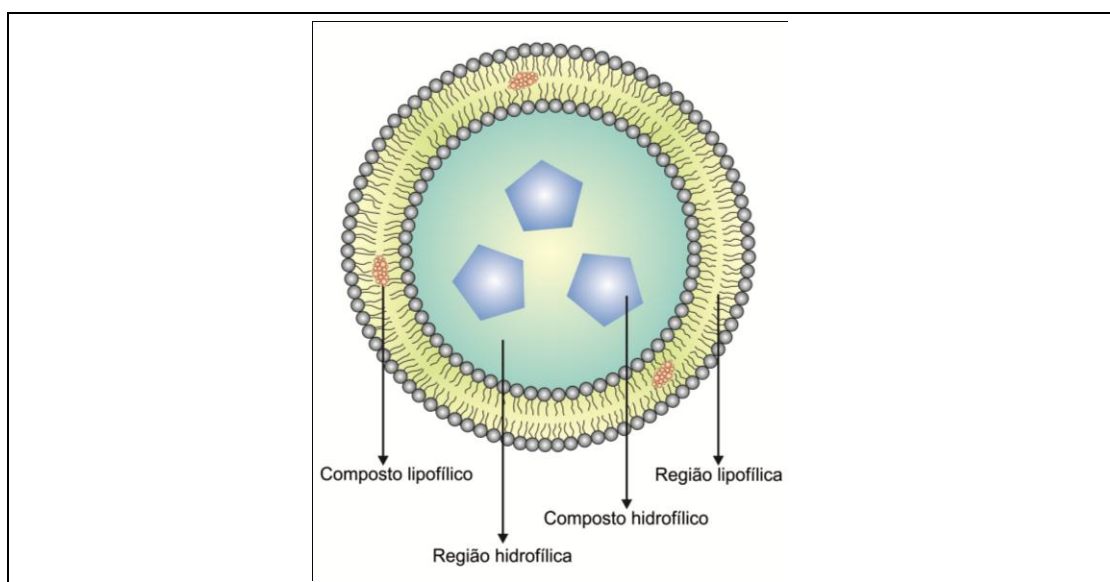


Figura 31: Estrutura de um lipossomo e representação esquemática da possível incorporação de compostos hidrofílicos ou lipofílicos.

Na LV, as formulações lipossomais são amplamente utilizadas, como as já mencionadas formulações de anfotericina B. Embora o preço desses fármacos fosse inicialmente proibitivo para países subdesenvolvidos, hoje estão disponíveis a preços mais baixos devido aos esforços da OMS e organizações não governamentais (Griensven et al., 2010). Além da anfotericina B, existem relatos de estudos experimentais com antimoniais encapsulados em lipossomos, os quais se mostraram significativamente mais efetivos *in vitro* e *in vivo* em relação ao fármaco livre (Schettini et al., 2006; Tempone, de Andrade Jr, 2008; Borborema et al., 2011).

Considerando-se a atividade anti-*Leishmania* apresentada por nimodipino, furazolidona e buparvaquona, conforme apresentado nos capítulos 1, 4 e 5, o encapsulamento destes fármacos em lipossomos carregados negativamente poderia contribuir para a liberação dirigida aos macrófagos infectados.

2. RESULTADOS

2.1. Preparação de furazolidona lipossomal

A concentração de furazolidona presente na formulação lipossomal foi estimada em 250 µg/mL. O conteúdo lipídico da formulação resultou em uma média de 15,5 mg/mL de fosfolípidos por formulação. Verificou-se que os lipossomos apresentaram um diâmetro médio interno de 149 nm (Figura 32).

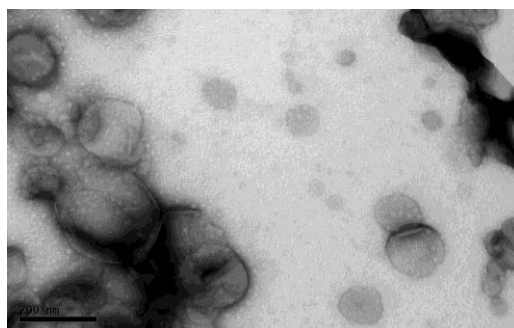


Figura 32: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo furazolidona.

2.2. Estudo de biodistribuição de furazolidona lipossomal em hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi*

Após 7 horas de administração, furazolidona lipossomal foi encontrada no baço, fígado e na medula óssea de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. A observação sob microscópio de fluorescência convencional permitiu a visualização de lipossomos no baço, fígado e medula óssea (Figura 33). Sob microscópio confocal, foi possível a observação de lipossomos co-localizados com os parasitas (Figura 34). A sequência de seções ópticas gerou uma imagem tridimensional que pode ser acessada no seguinte endereço eletrônico: [doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.04.006) (Tempone et al, 2010 - dados suplementares).

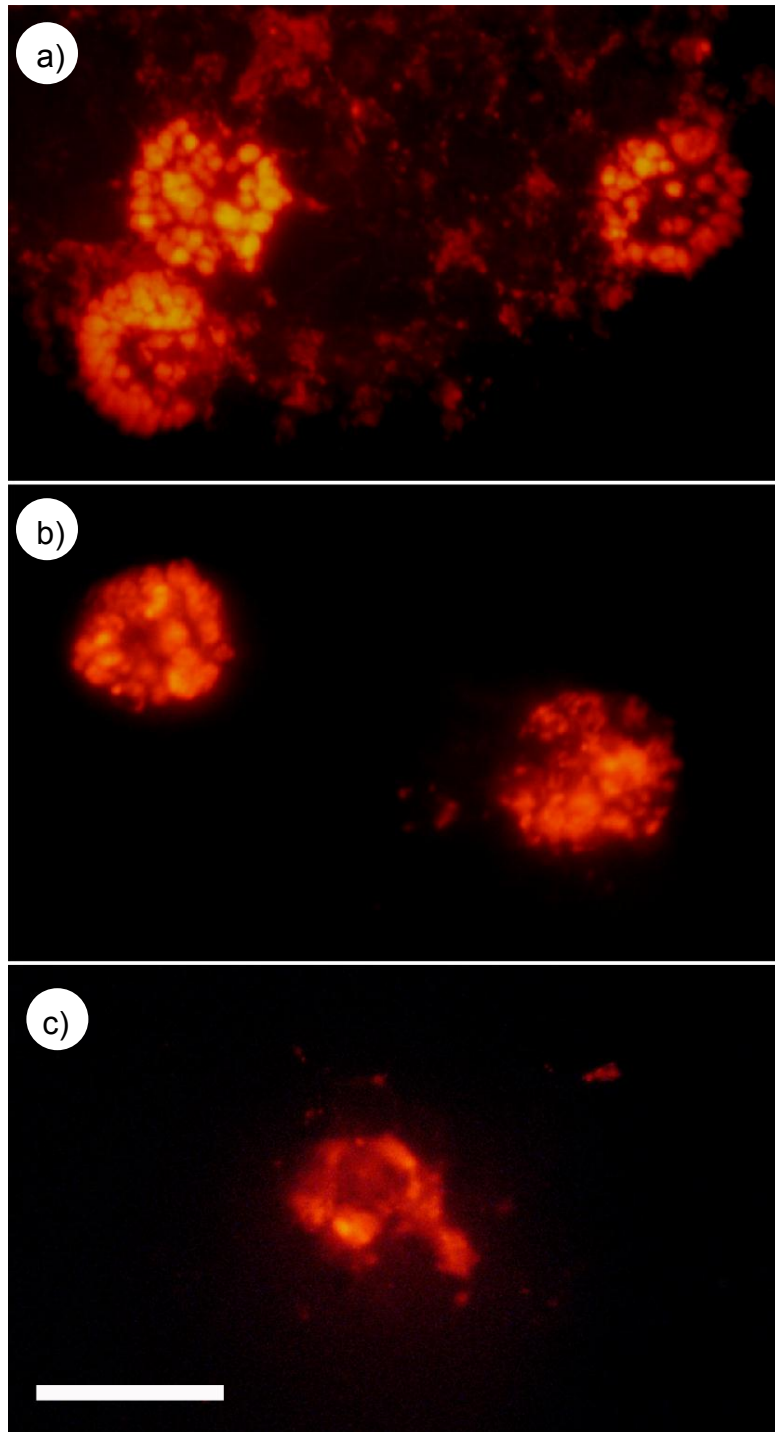


Figura 33: Imprinting de baço (a), fígado (b) e esfregaço de medula óssea (c) de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* observados sob microscópio de fluorescência. Furazolidona lipossomal visualizada em vermelho.

Barra: 20 μm .

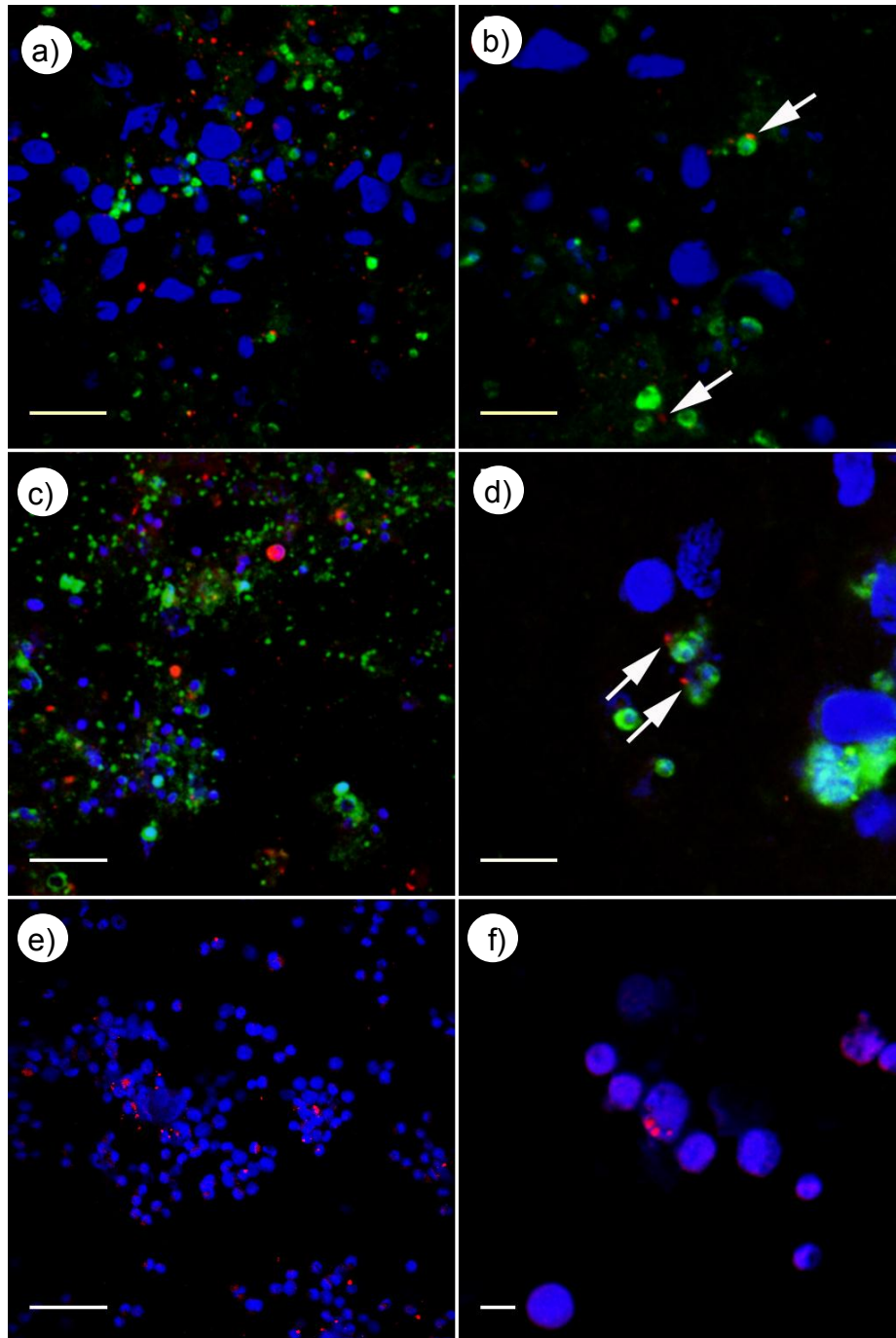


Figura 34: Imprinting de baço (a, b) e fígado (c, d) e esfregaço de medula óssea (e, f) de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* observados sob microscópio confocal. Furazolidona lipossomal visualizada em vermelho; parasitas em verde; núcleos e cinetoplastos em azul.

Setas em B e D indicam lipossomos co-localizados com os amastigotas. Barras: A: 20 μm , B: 10 μm , C: 50 μm , D: 10 μm , E: 50 μm ; F: 10 μm .

2.3. Preparação de nimodipino lipossomal

O diâmetro médio dos lipossomos foi estimado em 568 nm (SEM = 45) (Figura 35). A concentração de nimodipino presente na formulação lipossomal foi estimada em 515,64 µg/mL (SEM = 44.36), utilizando-se uma curva padrão ($r^2 = 0,99898$).

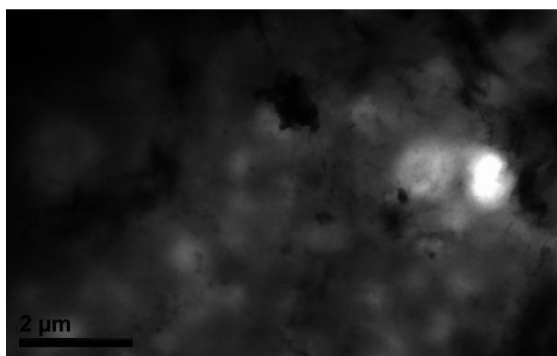


Figura 35: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo nimodipino.

2.4. Preparação de buparvaquona lipossomal

O diâmetro médio dos lipossomos foi estimado em 561 nm (SEM = 21) (Figura 36). A concentração de buparvaquona presente na formulação lipossomal foi estimada em 72,63 µg/mL (SEM = 17,27) pela construção de uma curva padrão ($r^2 = 0,9988$).

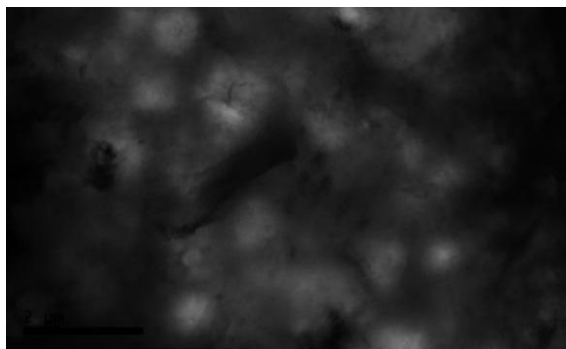


Figura 36: Imagem adquirida em MET de lipossomos contendo buparvaquona.

3. DISCUSSÃO

Quando administrados a hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, nimodipino, furazolidona e buparvaquona lipossomais reduziram significativamente a carga parasitária do baço, conforme exposto nos capítulos 1, 4 e 5, respectivamente. Este fato possivelmente foi devido à liberação dirigida de fármaco aos macrófagos infectados, por meio da interação dos lipossomos com os SRs, causando a morte dos amastigotas nos órgãos infectados (Tempone et al., 2004).

Lipossomos contendo fosfatidilserina são direcionados aos amastigotas intracelulares no interior dos macrófagos, através dos SRs (Platt, Silva, Gordon, 1999; Rigotti, Acton, Krieger, 1995). Os SRs são abundantes nos macrófagos como também nas células endoteliais do fígado, e representam candidatos atrativos para mediar a ligação e captação de lipossomos contendo fosfolipídeos carregados negativamente devido à sua ampla especificidade de ligação a compostos polianiônicos (Dhaliwal, Steinbrecher, 1999). Macrófagos infectados com *L. (L.) infantum chagasi* apresentam um aumento na regulação dos SRs CD36, SR-B1 e MARCO, e conseqüentemente podem representar um importante alvo para os lipossomos com fosfatidilserina (Tempone, 2004).

Furazolidona foi encapsulada em lipossomos contendo fosfatidilserina e marcada com o fluoróforo DIL C18, um ligante de alta afinidade para membranas lipossomais. Quando administrado aos hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, verificou-se a presença de furazolidona lipossomal nos órgãos-alvo como fígado, baço e medula óssea. Observou-se co-localização desta formulação com os amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Sugerimos que duas características desta formulação tenham contribuído para seu direcionamento às células-alvo: i) o tamanho nanométrico e ii) a inclusão de fosfatidilserina.

As diferenças de tratamento encontrado no baço e no fígado do grupo tratado com as formulações lipossomais poderiam ser atribuídas às

diferenças na carga parasitária de ambos os órgãos. Além disso, este fato corrobora a eficácia da biodistribuição, que provavelmente contribuiu para a eficácia da formulação no baço. A baixa redução da carga parasitária do fígado por estas formulações pode ser consequência de baixa dosagem administrada em relação à elevada carga de parasitos. O estudo de outras técnicas de confecção de lipossomos, visando à encapsulação de maior quantidade do fármaco, poderá resultar em maior eficiência nos estudos *in vivo*, especialmente no fígado.

A dose administrada de nimodipino, furazolidona e buparvaquona lipossomais foi 46, 100 e 60 vezes menor do que o fármaco livre, respectivamente. Estes dados demonstram uma melhora considerável na atividade destes fármacos, o que confirma os achados de Tempone e colaboradores (2004), que sugeriram que lipossomos contendo fosfatidilserina podem melhorar o índice terapêutico de fármacos. O presente estudo enfatiza o uso de sistemas de liberação dirigida de fármacos, como lipossomos, no tratamento de doenças infecciosas envolvendo o SFM, corroborando os achados de Borborema e colaboradores (2011).

Buparvaquona lipossomal foi injetado i.p. por oito dias consecutivos, resultando em uma redução significativa do número de amastigotas no baço quando comparado ao grupo não tratado. Esta formulação causou redução não significativa da carga parasitária no fígado, quando comparado ao grupo controle. Também deve ser notado que, quando o número absoluto de parasitas é considerado, 80% dos animais apresentaram menos que 1.000 amastigotas por grama. As diferenças de tratamento encontrado no baço e no fígado do grupo tratado com buparvaquona lipossomal poderiam ser atribuídas às diferenças na carga parasitária de ambos os órgãos. Para alcançar níveis semelhantes de tratamento no baço, uma maior quantidade de fármaco deve ser entregue em um tratamento prolongado, como consequência do número seis vezes maior de amastigotas no fígado quando comparado com o baço. Além disso, o maior acúmulo de lipossomos no baço pode ter contribuído para as diferenças encontradas.

O uso de lipossomos contendo fosfatidilserina mostrou-se eficaz na liberação dirigida de fármacos aos macrófagos infectados, possivelmente devido à interação com os SRs (Tempone et al., 2004). Desta forma, consideramos o uso de lipossomos contendo fosfatidilserina uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas formulações para o tratamento da LV.

Os resultados dos testes *in vivo* das formulações lipossomais de buparvaquona, furazolidona e nimodipino são também apresentados na forma de artigo científico nos anexos 9, 5 e 10, respectivamente.

CAPÍTULO 7

Avaliação do tratamento experimental por qPCR

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a biologia celular tem mudado de forma significativa as oportunidades para realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, diagnóstico e controle das doenças infecciosas. Em 1983, o desenvolvimento da PCR foi considerado como o grande avanço da biologia molecular (Mullis, 1990). Porém, apesar da PCR convencional ser altamente sensível e específica, esta técnica apresenta algumas limitações, tais como, a necessidade de se realizar a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, o uso de reagentes nocivos à saúde do operador, como o brometo de etídio, riscos de contaminação e a ausência da capacidade quantitativa. Estas desvantagens passaram a ser mais evidenciadas no final do século XX e início do século XXI devido ao surgimento de uma nova tecnologia, a PCR em tempo real, cuja sigla em inglês é qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).

As características da qPCR possibilitam a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. Desta forma, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são inúmeras e incluem: rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (Sundsford et al., 2004; Yang, Rothman, 2004). Essa tecnologia é altamente sensível e já está sendo desenvolvida para o acompanhamento de inúmeras doenças, tais como AIDS, hepatite C, dengue, toxoplasmose e leishmaniose (Nicolas et al., 2002; Mary et al., 2004; Raoult; Fournier, Drancourt, 2004; Francino et al., 2006; Manna et al., 2006; Kompalic-Cristo et al., 2007; Manna et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2007).

A qPCR é uma técnica capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento, em tempo real, do produto amplificado. No diagnóstico da LV, a técnica vem sendo utilizada em animais e em humanos, possibilitando a realização do diagnóstico e monitoramento da terapia humana ou experimental (Bretagne et al., 2001; Nicolas et al., 2002; Bossolasco et al., 2003; Mortarino et al., 2004; Rolão et al., 2004; Roura, Sanchez; Mary et al., 2004; Vitale et al., 2004; Wortmann et al., 2004; Francino et al., 2006; Colombo et al., 2011). Mary et al. (2004) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *L. (L.) infantum chagasi* em amostras de sangue dos pacientes, permitindo discriminar entre pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, promovendo o diagnóstico e monitoramento da terapia com segurança e rapidez.

Os estudos de determinação de eficácia de fármacos em modelos experimentais de leishmaniose envolvem múltiplas dificuldades técnicas, como a necessidade de um grande número de animais, que devem ser mantidos por longos períodos. Em modelo experimental de LV, a avaliação do progresso da infecção em hamsters é realizada pela quantificação da carga parasitária, comumente feita por protocolos de diluição limitante e pela observação microscópica de lâminas confeccionadas por aposição dos órgãos infectados. Estas técnicas envolvem enorme variabilidade, são laboriosas e demandam muito tempo. Além disso, a técnica de diluição limitante requer enorme gasto de material. Em contrapartida, a implementação da qPCR representa um enorme ganho de tempo e aumento do potencial de avaliação de fármacos e possibilita a avaliação de parasitas viáveis, por meio da quantificação de RNA nos tecidos dos animais experimentais.

Diante do exposto, buscou-se desenvolver um protocolo de qPCR visando quantificar a carga parasitária de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* após tratamento experimental.

2. RESULTADOS

2.1. Construção da curva padrão de DNA de *L. (L.) infantum chagasi*

A curva padrão de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* foi obtida por diluição seriada de promastigotas obtidos de meio de cultura. O número de C_T (valor *cycle threshold*) foi plotado contra o número de parasitas, resultando em uma curva padrão de promastigotas (Figura 37). Subsequentemente, o número de parasitas do experimento *in vivo* foi calculado no baço e fígado. O número de parasitas foi calculado pelo C_T , usando os dados de regressão linear de promastigotas, pela equação: $y = a + bx$. Assim, foi possível calcular o número de parasitas presentes em cada amostra

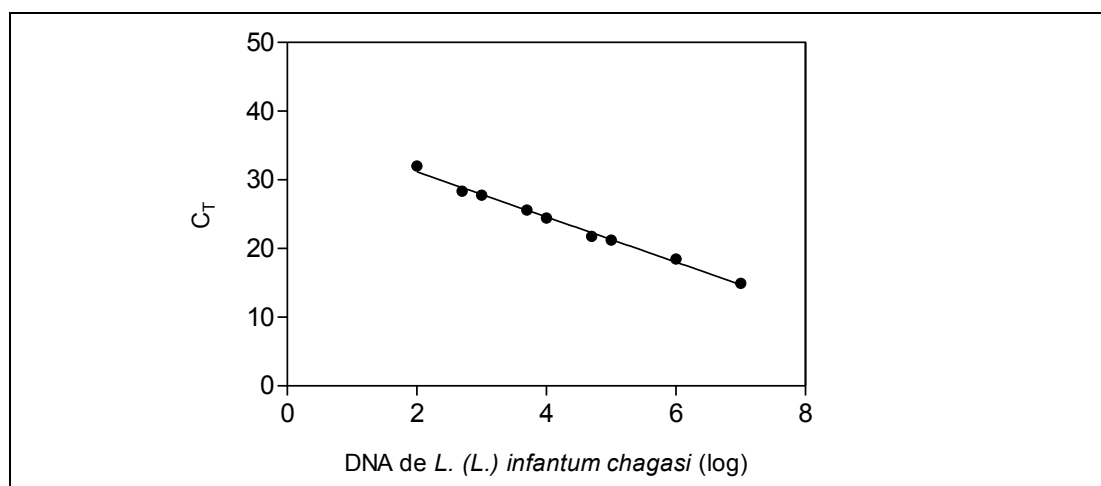


Figura 37: Curva padrão de DNA de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, obtida pelo valor C_T e pelo número de promastigotas de *Leishmania* (Log).

Slope = 3.28; $r^2 = 0.993$; y intercept = 37.74.

2.2. PCR convencional

Os animais dos grupos tratados com bepridil, Glucantime e o grupo controle deste experimento foram positivos na PCR convencional. Além do controle positivo do experimento, que constituiu-se de animais tratados com o veículo utilizado na diluição do bepridil, também foi utilizado como controle positivo DNA extraído de promastigotas de cultura. Como controle negativo do experimento, utilizou-se baço e fígado de hamsteres não infectados, e este se mostrou negativo no PCR convencional (Figura 38).

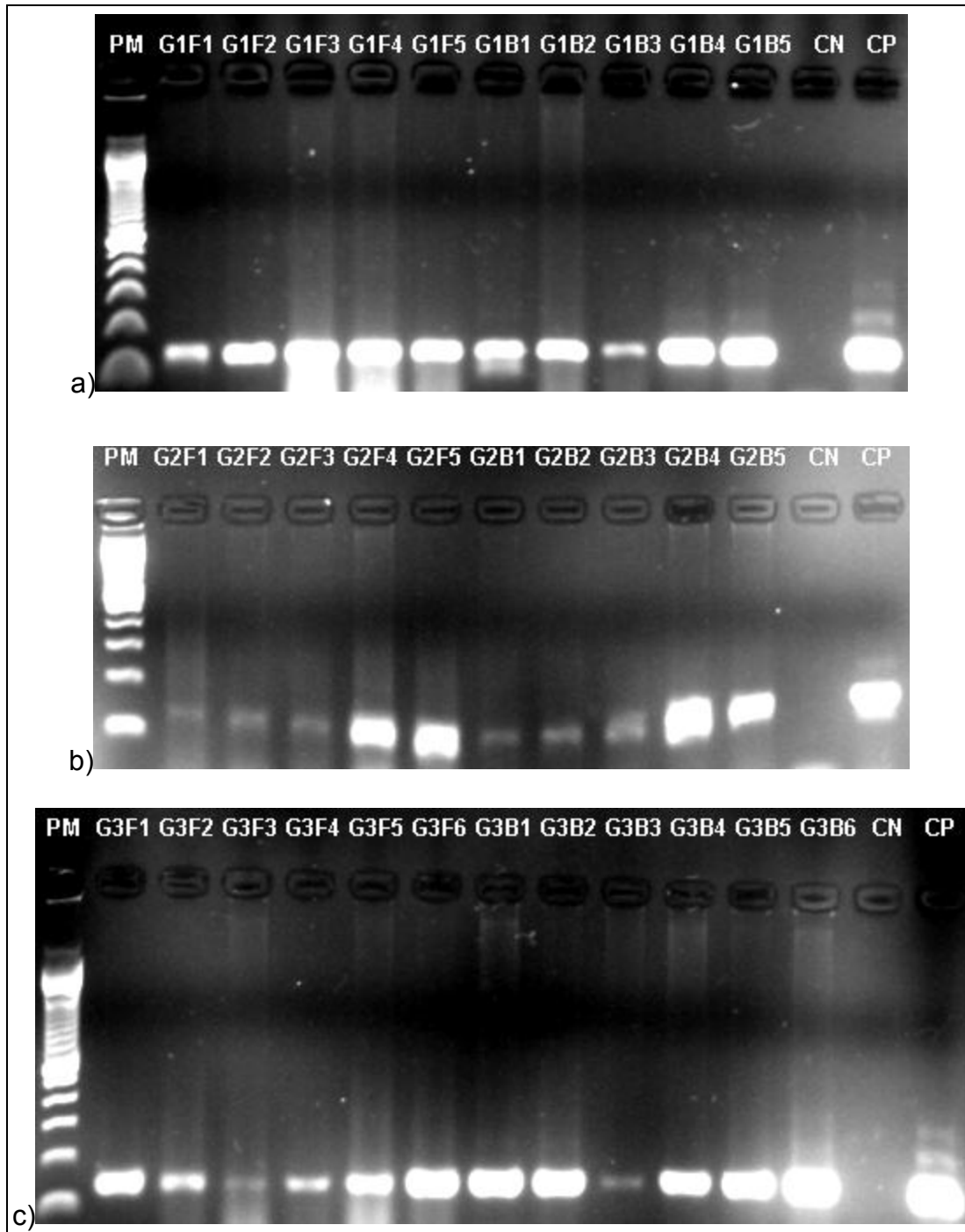


Figura 38: Fotografia de gel de agarose com amostras de cDNA amplificadas de baço e fígado de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi* após tratamento experimental. Grupo tratado com bepridil (a), grupo tratado com Glucantime (b) e grupo controle (c).

G1: grupo tratado com bepridil a 12 mg/kg/dia por 10 dias; G2: grupo tratado com Glucantime a 50 mg/kg/dia por 10 dias; G3: Grupo controle. B: baço; F: fígado; CN: Controle negativo; CP: controle positivo; PM: marcador molecular.

2.3. qPCR

O experimento de avaliação da eficácia *in vivo* do BCC bepridil foi utilizado para padronização da qPCR para a finalidade de quantificação do tratamento experimental. Este experimento constituiu-se de três grupos (n = 5/grupo), conforme exposto no capítulo 1. Além do controle positivo do experimento, que se constituiu de animais tratados com o veículo utilizado na diluição do bepridil, também foi utilizado como controle positivo DNA extraído de promastigotas de cultura. Como controle negativo do experimento, utilizou-se baço e fígado de hamsteres não infectados.

Os animais dos grupos tratados com bepridil, Glucantime e o grupo controle deste experimento foram positivos na qPCR. No baço, foram observados valores de C_T entre 17 e 26 (bepridil), entre 27 e 36 (Glucantime) e entre 22 e 29 (grupo controle). No fígado, foram observados valores de C_T entre 20 e 29 (bepridil), entre 32 e 40 (Glucantime) e entre 26 e 35 (grupo controle) (Figura 39). Em relação aos controles da reação, as amostras apresentaram valores de C_T entre 17 e 18 (controle positivo) e entre 38 e 40 (controle negativo).

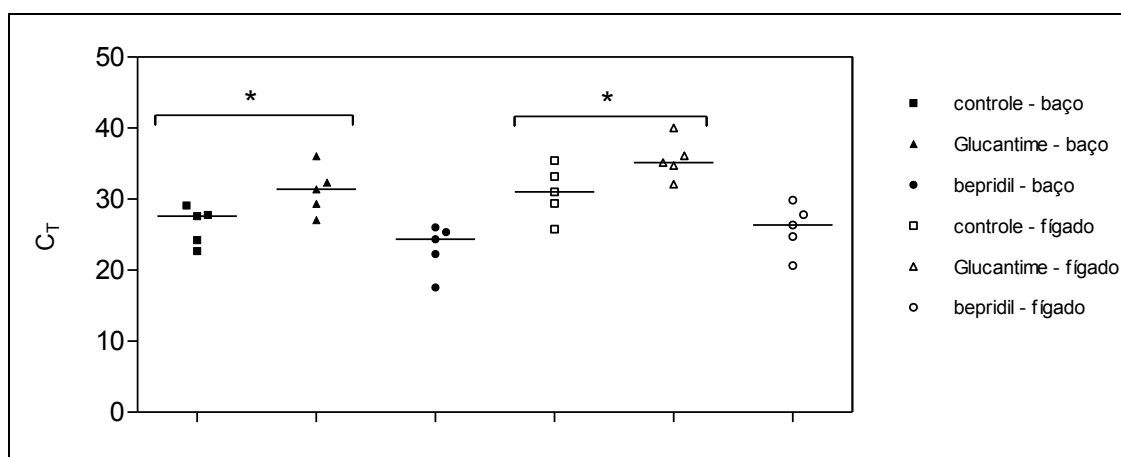


Figura 39: Valores de C_T obtidos por qPCR das amostras de baço e fígado após tratamento experimental.

* $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Foi feita a pesagem dos órgãos (massa total), visando comparar a massa do órgão com o valor de C_T . Conforme observado na Figura 40, encontrou-se correlação entre os valores de C_T e massa dos órgãos, exceto entre os valores encontrados no baço do grupo controle.

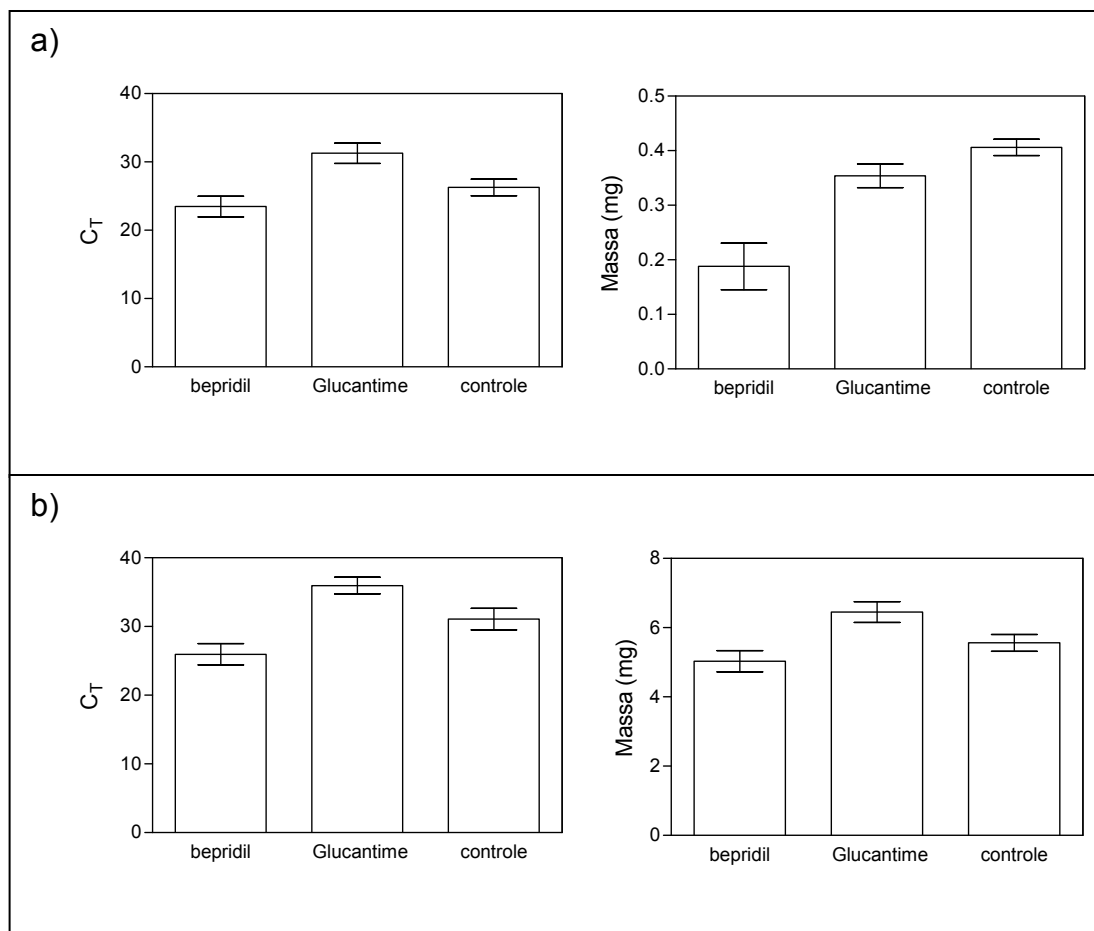


Figura 40: Comparação entre os valores de C_T e a massa do baço (a) e fígado (b) dos animais infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, submetidos a tratamento experimental.

Os demais experimentos que utilizaram a qPCR para a avaliação da carga parasitária foram realizados da mesma maneira, como foi descrito para o tratamento experimental do BCC bepridil, e o número de parasitas por grama de material foi calculado de acordo com a curva padrão de DNA, a partir dos valores de C_T obtidos na qPCR, após pesagem dos fragmentos de órgãos.

3. DISCUSSÃO

O protocolo de qPCR apresentado no presente trabalho mostrou-se útil para a quantificação de *Leishmania* em hamsteres, permitindo a avaliação de um maior número de candidatos a fármacos em modelo experimental em menor tempo. Além disso, este o protocolo pode ser particularmente útil em situações experimentais nas quais não podem ser visualizados parasitas por aposição de órgãos de animais com baixo número de parasitas.

O hamster é considerado o modelo ideal para o estudo de candidatos a fármacos para a LV, como resultado de uma infecção semelhante à humana (Kaur et al., 2010). A avaliação do tratamento *in vivo* habitualmente é baseada em técnicas de contagem por microscopia óptica, por observação de lâminas coradas com Giemsa (Stauber et al., 1958). A quantificação de parasitas por microscopia tem baixa sensibilidade, é demorada e não é segura quando os parasitas não estão dispersos igualmente na lâmina (Bretagne et al., 2001). A diluição limitante em meio de cultura tem sido usada como uma técnica complementar na avaliação de fármacos *in vivo* (Buffet et al., 1995), mas os ensaios permanecem laboriosos e podem ser limitados por contaminação microbiana (Bretagne et al., 2001). Estes problemas podem ser superadas pelo uso da qPCR, que é uma técnica altamente sensível, embora ainda não disponível em todos os laboratórios, devido ao elevado custo do equipamento.

Segundo Prina e colaboradores (2007), o DNA de *Leishmania* é degradado rapidamente após a morte de parasita. Ainda assim, optou-se por utilizar a quantificação de RNA, já que a tecnologia da expressão gênica é usualmente usada para demonstrar parasitas vivos.

A comparação dos valores de C_T com a massa dos órgãos sugeriu que existe alguma correlação entre estes valores, ou seja, a massa total do órgão é inversamente proporcional ao número de amastigota presente no fragmento de órgão. Porém investigações adicionais são

necessárias para confirmar esta hipótese, já que não foi observada correlação entre os valores de C_T e a massa do baço no grupo controle.

Os resultados dos testes *in vivo* que utilizaram a metodologia de qPCR são também apresentados nos anexos 7, 9 e 10, na forma de artigo científico, para avaliação do tratamento experimental dos fármacos bepridil (anexo 7), buparvaquona (anexo 9), anlodipino, fendilina e nimodipino (anexo 10).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças parasitárias representam uma ameaça crescente para a saúde e o bem-estar humanos. A leishmaniose e doença de Chagas são causa de sofrimento para muitos milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente nas zonas tropicais e subtropicais. No entanto, as ferramentas terapêuticas disponíveis para o tratamento destas doenças são extremamente limitadas. Muitas delas foram desenvolvidas na primeira parte deste século e envolvem riscos. A seleção de parasitas resistentes aos fármacos disponíveis é também responsável pela persistência da doença e elevado número de óbitos. Novos fármacos não estão sendo desenvolvidos com rapidez suficiente e vacinas potenciais até agora não cumpriram as expectativas em ensaios clínicos. Embora alternativas antiparasitárias sejam urgentemente necessárias, a resposta a esta crise é inadequada devido à falta de financiamento e comprometimento da indústria farmacêutica para converter estas abordagens em novas terapias (OMS, 2009).

A pesquisa por fármacos mais eficazes que atendam aos padrões atuais de segurança e o estudo de associações de fármacos, visando reduzir a duração do tratamento da leishmaniose continua a ser alta prioridade. Neste cenário encontra-se o presente estudo, cujo objetivo foi a pesquisa de novas alternativas terapêuticas antiparasitárias.

Inicialmente, investigou-se a atividade do BCC nimodipino e do nitrofurano furazolidona contra diferentes espécies de *Leishmania* e os danos ultraestruturais causados aos parasitas foram avaliados após curto período de incubação com estes fármacos. Ambos compostos apresentaram atividade contra *Leishmania* spp. e moderada citotoxicidade *in vitro* contra células de mamíferos. Sob microscopia eletrônica de transmissão, em colaboração com a Profa. Noemi Nosomi Taniwaki (Instituto Adolfo Lutz/SP) observou-se que nimodipino induziu alterações principalmente na mitocôndria e membrana plasmática, enquanto que furazolidona causou

alterações no núcleo e mitocôndrias de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

Nesta primeira etapa, verificou-se o potencial anti-*Leishmania* do BCC nimodipino, uma 1,4-diidropiridina. Outros medicamentos pertencentes a esta mesma classe foram então incluídos no estudo (anlodipino, azelnidipino, cilnidipino, lercanidipino, nicardipino, nifedipino e nitrendipino), visando à triagem farmacológica e ao estudo de QSAR, em colaboração com o Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti (Universidade Federal da Paraíba). Posteriormente, ampliou-se o estudo dos BCC para compostos não pertencentes à classe das 1,4-diidropiridinas (bepridil, fendilina, lidoflazina e mibefradil). Estes compostos apresentaram variável atividade contra *Leishmania* spp. e citotoxicidade média a baixa.

Embora o foco principal do trabalho fosse a leishmaniose, foram também realizados ensaios para avaliação da atividade contra *T. cruzi*. A descoberta de um composto útil para o tratamento de ambas as infecções seria um resultado importante, especialmente nas Américas. No presente trabalho, encontrou-se atividade dos BCC testados contra *T. cruzi*, mostrando o potencial desta classe de fármacos como candidatos a protótipos contra cinetoplastídeos.

Após esta primeira etapa de triagem, decidiu-se pela associação dos BCC com alguns dos fármacos usados no tratamento da LV. Considerando a atividade anti-*Leishmania* dos BCC, sua associação com os fármacos padrão poderia contribuir para a descoberta de novas alternativas para o tratamento da LV. Foram realizados isobogramas visando identificar as interações *in vitro* em promastigotas ou amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*. Anlodipino, bepridil, lercanidipino, nicardipino e nimodipino, foram combinados com os fármacos pentamidina e anfotericina B e mostraram interação indiferente em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Anlodipino e nimodipino, quando combinados com Glucantime e anfotericina B mostraram interação indiferente em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum chagasi*.

Com o objetivo de aprimorar a técnica de associação de fármacos, foi realizado um estágio na London School of Hygiene and Tropical Medicine (Universidade de Londres) no período de março a julho de 2011, sob orientação do Prof. Dr. Simon L. Croft e Dra. Karin Seifert. Decidiu-se incluir o fármaco buparvaquona no presente estudo, tendo em vista que sua atividade e seletividade já haviam sido descritas para *L. (L.) donovani*. Nesta etapa do trabalho, ainda no Brasil, foram realizados estudos *in vitro* com buparvaquona e verificou-se grande potencial contra *L. (L.) infantum chagasi*. Em seguida, foi desenvolvida uma formulação lipossomal de buparvaquona e esta foi avaliada em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Em Londres, realizou-se a associação de buparvaquona com alguns dos fármacos usados na clínica da leishmaniose. Estes resultados não foram apresentados, pois este estudo ainda não foi finalizado e terá continuidade.

No decorrer do trabalho, em colaboração com a Profa. Dra. Vera L. Pereira-Chioccola e com seu aluno Fábio Colombo (Instituto Adolfo Lutz/SP), desenvolveu-se um protocolo de qPCR para quantificação de RNA de *Leishmania* em hamsteres infectados. Esta ferramenta mostrou-se útil na avaliação do tratamento experimental, permitindo a quantificação de parasitas viáveis nos órgãos infectados. Com a padronização da qPCR para detecção e quantificação de RNA de *L. (L.) infantum chagasi*, quatro BCC (anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino) foram ensaiados em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Os resultados foram negativos, pois nenhum fármaco conseguiu eliminar ou mesmo reduzir parcialmente a infecção em hamsteres.

No presente trabalho, foram também desenvolvidas formulações lipossomais de buparvaquona, furazolidona e nimodipino. Sob microscopia confocal, em colaboração com o Prof. Renato Arruda Mortara (Universidade Federal de São Paulo), observou-se a colocalização dos lipossomos de furazolidona com os amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em hamsteres infectados. Buparvaquona, furazolidona e nimodipino lipossomais apresentaram redução da carga parasitária em hamsteres infectados. Estes

resultados corroboraram o potencial de formulações lipossomais contendo fosfatidilserina para a liberação dirigida às células alvo na LV, possivelmente devido à interação com os SRs.

Levando-se em consideração que furazolidona livre e lipossomal, assim como buparvaquona lipossomal, se apresentaram eficazes no tratamento da LV, sugerem-se futuros experimentos que considerem diferentes doses, regimes terapêuticos e vias de administração. O QSAR e a síntese de análogos utilizando buparvaquona e furazolidona como protótipos seriam também promissores, assim como o QSAR de BCC, utilizando um número maior de compostos.

Ao longo deste trabalho, pode-se notar que a pesquisa de fármacos para doenças parasitárias é uma atividade multidisciplinar e depende da interação de grupos de pesquisa de diferentes áreas do conhecimento.

Por fim, espera-se que os resultados obtidos tenham contribuído para a pesquisa de novas alternativas para leishmaniose e doença de Chagas e tenham criado novos caminhos e questionamentos para futuros estudos.

6. CONCLUSÕES

- Buparvaquona, furazolidona e os BCC são ativos *in vitro* contra *Leishmania* spp. e podem ser usados como protótipos na pesquisa de fármacos;
- Não houve interações farmacológicas entre os BCC e os fármacos padrão testados;
- Anlodipino, bepridil, fendilina e nimodipino não são eficazes no tratamento de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum chagasi*, nas vias e doses testadas;
- As 1,4-diidropiridinas podem ser usadas como protótipos para o desenho de novos análogos com possível atividade antiprotozoária;
- Lipossomos contendo fosfatidilserina podem melhorar o índice terapêutico de fármacos devido à liberação dirigida de fármaco aos macrófagos infectados;
- O protocolo de qPCR desenvolvido pode ser usado de forma sensível e rápida para a quantificação da carga parasitária no tratamento experimental de LV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abernethy DR, Schwartz JBN. Calcium-antagonist drugs. *Eng J Med* 1999, 341, 1447.

Agrawal AK, Gupta CM. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41:135–46.

Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suárez AI. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers— liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release* 2002; 79:29–40.

Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Boone SC, Chou SN, Kelly DL, Weir BK, Crabbe RA, Lavik PJ, Rosenbloom SB, Dorsey FC, Ingram CR, Mellits DE, Bertsch LA, Boisvert DP, Hundley MB, Johnson RK, Strom JA, Transou CR. Cerebral arterial spasm—a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med* 1993; 11:619-24.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:334-59.

Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006; 61:223-74.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22:552-7.

Alves WA. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. *Bepa* 2009; 6:25-9.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:673–83.

Balaban AT. From Chemical Topology to 3D Geometry. *J Chem Inf Comput Sci* 1997; 37:645-50.

Balaraman S, Tewary P, Singh VK, Madhubala R. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 30:639–47.

Balestieri FMP, Queiroz ARP, Scavone C, Costa VMA, Barral-Netto M, Abrahamsohn IA. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 2002; 4:23–9.

Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomat Applied* 2001; 16:3-21.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37:1097-106.

Batista CM, Carvalho CMB, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *RBCF* 2007; 43:167-79.

Ben Salah A, Buffet PA, Morizot G, Ben Massoud N, Zaatour A, Ben Alaya N. et al. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e432.

Benaim G, Bermudez R, Urbina JA. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39:61–8.

Benaim G, Sanders J, Garcia-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera A. et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem* 2006; 49:892–9.

Benaim G. Intracellular calcium signaling and regulation in Leishmania, p. 89-106. In Molecular and immune mechanism in the pathogenesis of cutaneous Leishmania. Austin: R. G. Landes Co. Medical Intelligence Unit; 1996.

Berembaum MC. A method for testing for synergism with any number of agents. J Infect Dis 1978; 137:122-13.

Berman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in Leishmania Mexicana amastigotes. Biochem Pharmacol 1987; 36:197-201.

Berman JD, Lee LS. Activity of oral drugs against Leishmania Tropica in human macrophages in vitro. Am J Trop Med Hyg 1983; 32:947-51.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27:916-20.

Berman JD. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. Curr Opin Infec Dis 1998; 11:707-10.

Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 2006; 43:917-24.

Beveridge E, Caldwell IC, Latter VS, Neal RA, Udall V, Waldron MM. The activity against Trypanosoma cruzi and cutaneous leishmaniasis, and toxicity, of moxipraquine (349C59). Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74:43-51.

Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K. et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dis 2007; 196:591-8.

Boainain E, Rassi A. Etiologic therapy of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 1979; 32:395-9.

Borborema SET, Schwendener RA, Junior JAO, de Andrade Jr HF, do Nascimento N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (Leishmania) major-infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38:341–7.

Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5080-4.

Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin Exp Immunol* 1977; 30:119-29.

Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:512-31.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:828-31.

Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release* 2008; 125:210–27.

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

Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2167-8.

Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* 2001; 31:1311-20.

Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:818-22.

Camargo-Neves VLF de, Katz G, Rodas LAC, Poletto DW, Lages LC, Spinola RMF, et al. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:1263-7.

Camargo-Neves VLF de. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Atual. *BEPA* 2004; 6:1-4.

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 2006; 25:471-9.

Cavalla D. APT drug R&D: the right active ingredient in the right presentation for the right therapeutic use. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:849–53.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis [acesso em 16 de nov 2007]. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature* 2007; 5:S7-16.

Cienci R, Montalto M, Pandolfi F, Gasbarrini GB, Cammarota G. Third-line rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2313-9.

Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* 2011; 109:267-74.

Conceição K, Konno K, Richardson M, Antoniazzi MM, Jared C, Daffre S, et al. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides* 2006; 27:3092–9.

Consonni V, Todeschini R, Pavan M, Gramatica P. Structure/response correlations and similarity/diversity analysis by GETAWAY descriptors. 2. Application of the novel 3D molecular descriptors to QSAR/QSPR studies. *J Chem Inf Comp Sci* 2002; 42:693-705.

Consonni V, Todeschini R, Pavan M. Structure/response correlations and similarity/diversity analysis by GETAWAY descriptors. 1. Theory of the novel 3D molecular descriptors. *J Chem Inf Comp Sci* 2002; 42:682-92.

Cossarizza A, Kalashnikova G, Grassilli E, Chiappelli F, Salvioli S, Capri M, et al. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp Cell Res* 1994; 214:323–30.

Costa JML, Sampaio RN, Tada MS, Almeida EA, Veiga EP, Magalhães AV, et al. Furazolidone treatment of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:274.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:3-24.

Croft SL, Brazil RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. *Ann Trop Med Parasitol*, 1982; 76:37-43.

Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30:827-32.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123:399-410.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:111–26.

Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:653-60.

de Almeida EA, Barbosa Neto RM, Guariento ME, Wanderley Jda S, de Souza ML. Clinical presentation of chronic Chagas disease in elderly individuals. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:311-5.

de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996; 348:1407-13.

Decit. Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pública* 2010; 44:200-2.

Den Boer M, Davidson RN. Treatment options for visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4:187–97.

Deniau M, Canavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97:115-33.

Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV coinfection. *Clin Dermatol* 1999; 17:317-25.

Dewar MJS, Healy EF, Holder AJ, Yuan YC. Comments on a comparison of AM1 with the recently developed PM3 method. *J Comp Chem* 1990; 11:541–42.

Dhaliwal B, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 1999; 286:191–205.

Diudea MV, Horvath D, Graovac A. 3D Distance Matrices and Related Topological Indices. *J Chem Inf Comp Sci* 1995; 35:129-35.

DNDi. Drug for neglected diseases initiative. Portfólio de projetos. [acesso em 20 out 2011]. Disponível em: DNDi. <http://www.dndi.org.br/centro-de-documentacao/faq.html#top>. 2011.

Docampo R, Moreno SNJ. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 33:151-9.

Docampo R, Scott D, Vercesi A, Moreno SNJ. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1995; 310: 1005-12.

Docampo, R, Vercesi A. Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *J Biol Chem* 1989; 264:108-11.

Dorlo TP, van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, de Vries HJ, Beijnen JH. et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2855-60.

Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol* 1992; 16:475-82.

Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol* 2007; 152:9-20.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today* 2011; 16:7-8.

Ei-On J. Current Status and Perspectives of the Immunotherapy of Leishmaniasis. *Isr Med Assoc J* 2009; 11:623-8.

FAPEAM. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. Ciclo de transmissão do *Trypanossoma cruzi*. [acesso em 28 jan 2012]. Disponível em <http://www.sect.am.gov.br/noticia.php?cod=6905>.

Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected tropical diseases. Br Med Bull 2010; 93:179-200.

Ferreira MMC, Montanari CA, Gáudio AC. Seleção de variáveis em QSAR. Quim Nova 2002; 25:439-48.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz [acesso em 28 de nov 2011]. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4097-102.

Fojo A, Akiyama SI, Hottesman MM, Pastan I. Reduced drug accumulation in multiple drug resistant human KB carcinoma cell lines. Cancer Research 1985; 45:3002-07.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 2006; 137:214-21.

García-Domenech R, García-March FJ, Soler RM, Gálvez J, Anton-Fos GM, de Julián-Ortiz J. V. New Analgesics Designed by Molecular Topology. Quant Struct Act Relat 1996; 15:201-7.

Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. J Antimicrob Chemother 2007a; 60:802-10.

Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence MJ, Brown MB, Croft SL. Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol* 2007b; 59:41-9.

Gasteiger J, Sadowski J, Schuur J, Selzer P, Steinhauer L, Steinhauer VJ. Chemical Information in 3D Space. *J Chem Inf Comput Sci* 1996; 36:1030–7.

Geary RC. The contiguity ratio and statistical mapping, *The incorporated statistician* 1954; 5:115-45.

Giron Blanc JJ. Treatment of vaginal trichomoniasis with furazolidone. *Tokoginecol Pract* 1959; 18:144-51.

Gokhale NH, Padhye SB, Croft SL, Kendrick HD, Davies W, Anson CE et al. Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents. 1. Synthesis, X-ray crystal-structures, electrochemistry and antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. *J Inorg Biochem* 2003; 95:249-58.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2007; 144:234-41.

Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RC, Cardoso JE, Oliveira-Silva F, Maciel FC, et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop* 2005; 93:161–7.

Gontijo CMF, Melo MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7:338-49.

Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol. Signals Recept* 2001; 10:147-61.

Gozalbes R, Brun-Pascaud M, García-Domenech R, Gálvez J, Girard PM, Doucet JP. et al. Prediction of quinolone activity against mycobacterium

avium by molecular topology and virtual computational screening. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44: 2764-70.

Greco, WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 1995; 47:331-385.

Gregorio Alapont C, García-Domenech R, Gálvez J, Ros MJ, Wolski S, García MD. Molecular topology: a useful tool for the search of new antibacterials. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10:2033-6.

Griensven JV, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:184–94

Guslandi M. Review article: alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1543-7.

Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother* 1983; 11:427–33.

Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 2002; 18:332-4.

Hemmer MC, Steinhauer V, Gasteiger J. The prediction of the 3D structure of organic molecules from their infrared spectra. *Vibrat Spectrosc* 1990; 19:151–64.

Higuchi ML; Benvenuti LA; Martins RM; Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res* 2003; 60:96-107.

Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:95-7.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Felton JM, Sabin AJ, Horton J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:1005-11.

Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 164:111-7.

Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:693-715.

Julián-Ortiz JV, Gálvez J, Muñoz-Collado C, García-Domenech R, Gimeno-Cardona CJ. Virtual combinatorial syntheses and computational screening of new potential anti-herpes compounds *J Med Chem* 1999; 42:3308-14.

Karlowsky JA, Zhanel GG. Concepts on the use of liposomal antimicrobial agents: applications for aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 1992; 15:654–67.

Katragadda A, Bridgman R, Betageri G. Effect of liposome composition and cholesterol on the cellular uptake of stavudine by human monocyte/macrophages. *Cell Mol Biol Lett* 2000; 5:483–93.

Kaur J, Singh BK, Tripathi RP, Singh P, Singh N. *Leishmania donovani*: A glycosyl dihydropyridine analogue induces apoptosis like cell death via targeting pteridine reductase 1 in promastigotes. *Exp Parasitol* 2009; 123:258–64.

Keseru G, Makaro GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today* 2006; 11:741.

Khaw M, Panosian CB. Human antiprotozoal therapy: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:427-39.

Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the

detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 2007; 101:619-25.

Kremsner PG, Kriska S. Antimalarial combinations. *Lancet* 2004; 364:285-94.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:619-42.

Kruse ND, Vidal RA, Trezzi MM. Curvas de Resposta e Isobograma como Forma de Descrever a Associação de Herbicidas Inibidores do Fotossistema II e da Síntese de Carotenóides. *Planta Daninha* 2006; 24:579-87.

Kumar KA, Ganguly K, Mazumdar K, Dutta NK, Dastidar SG, Chakrabarty AN. Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. *Acta Microbiol Pol* 2003; 52:285–92

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:811-27.

Langreth SG, Berman JD, Riordan GP, Lee LS. Finestructural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs in vitro. *J Protozool* 1983; 30:555-61.

Lasic DD. *Liposomes: from physics to applications*. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993.

Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Dams ETM, Storm G, Corstens FHM. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv Drug Del Rev* 1999; 37:225-35.

Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufevre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1953–7

Leardi R, Boggia R, Terrile M. Genetic algorithms as a strategy for feature selection. *J Chemom* 1992; 6:267-81.

Lerman SJ, Walker RA. Treatment of giardiasis. Literature review and recommendations. *Clin Pediatr* 1982; 21:409-14.

Li X, Ruan GR, Lu WL, Hong HY, Liang GW, Zhang YT. et al. A novel stealth liposomal topotecan with amlodipine: apoptotic effect is associated with deletion of intracellular Ca²⁺ by amlodipine thus leading to an enhanced antitumor activity in leukemia. *J Control Release* 2006; 112:186-98.

Lima LM. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Quim Nova* 2007; 30:1456-68.

Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. *BEPA* 2006; 26:07-11.

Livingstone D. *Data Analysis for Chemists*. Oxford: Oxford Science Publications, University Press; 1995.

Llovet T, Sánchez F, Mirelis B, Prats G. Sensitivity of enteropathogenic bacteria to furazolidone. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8:449-52.

Lohr SL. *Hasse Diagram in Statistical Consulting and Teaching*. New York: The American Statistician; 1995.

Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1327-32.

Lux H, Hart DT, Parker PJ, Klenner T. Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. *Adv Exp Med Biol* 1996; 416:201-11.

Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res* 1997a; 232:339-48.

Maarouf M, Lawrence F, Brown S, Robert-Gero M. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol. Res* 1997b, 83:198-202.

Maarouf M, Lawrence F, Croft SL, Robert-Gero M. Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol. Res* 1995; 81:421-5.

Mahmoudi N, Julian-Ortiz JV, Ciceron L, Gálvez J, Mazier D, Danis M. et al. Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:489–97.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 2006; 20:142:271-80.

Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2008; 177:279-82.

Mäntylä A, Garnier T, Rautio J, Nevalainen T, Vepsäläinen J, Koskinen A. et al. Synthesis, in vitro evaluation, and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone. *J Med Chem* 2004a; 47:188-95.

Mäntylä A, Rautio J, Nevalainen T, Vepsäläinen J, Juvonen R, Kendrick H. et al. Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorg Med Chem* 2004b; 12:3497-502.

Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 1987; 235:899.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5249-55.

Mattos DG, Pinheiro JM, Menezes RC, Costa DA. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004; 56:119-22.

Mauel J, Ransijn A. *Leishmania* spp. mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol* 1997; 87:98–111.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146:601-20.

McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:263-9.

Mendoza M, Uzcanga G., Pacheco R., Rojas H., Carrasquel L. M., Garcia-Marchan Y. et al. Anti-VSG antibodies induce an increase in *Trypanosoma evansi* intracellular Ca²⁺ concentration. *Parasitol* 2008; 135:1303–15.

Miert SV, Dyck SV, Schmidt TJ, Brun R, Vlietinck A, Lemiere G. et al. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. *Bioorg Med Chem* 2005; 13:661–9.

Mishra M, Biswas UK, Jha DN, Khan AB. Amphotericin versus pentamidine versus antimony unresponsive kala-azar. *Lancet* 1992; 340:1256-7.

Misra S, Naskar K, Sarkar D, Ghosh DK. Role of Ca²⁺ ion on *Leishmania*-macrophage attachment. *Mol Cell Biochem* 1991; 102:13-8.

Moncayo A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:577-91.

Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Banerjee S, Naskar K. et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1788–97.

Moore EM, Lockwood DN. Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:151–8.

Moran M, Guzman J, Ropars AL, McDonald A, Jameson N, Omune B. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? *PLoS Med* 2009; 6:e30.

Moran PAP. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 1950; 37:17–23.

Moreau G, Broto P. The autocorrelation of a topological structure: A new molecular descriptor. *Nou J Chim* 1980; 4:359-60.

Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1:14-5.

Moreno J, Canavate C, Chamizo C, Laguna F, Alvar J. HIV–*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:328-32.

Moreno SNJ, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:359–64.

Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parassitologia* 2004; 46:163-7.

Motro M, Shemesh J, Grossman E. Coronary benefits of calcium antagonist therapy for patients with hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16:349-55.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. [acesso em 05 jan 2012] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

MSF. Médicos sem fronteiras. Laboratório brasileiro deixa milhares sem tratamento contra doença de Chagas. [acesso em 08 de jan de 2012]. Disponível em: <http://www.msf.org.br/noticias/1376/laboratorio-brasileiro-deixa-milhares-sem-tratamento-contradoenca-de-chagas/>

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 145:1-10.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 2002; 277:24717-27.

Müller RH, Jacobs C. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *Int J Pharm* 2002; 237:151-61.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262:56-61.

Murray HW. Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS Patient Care STDs* 1999; 13:459-65.

Neal RA, van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:197.

Neal RA, van-Bueren J, Hooper G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 1988; 82:453-6.

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1666-9.

Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:111-7.

Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Bollo-Dragnic S, Marín-Catalán R, Pino L, Díaz-Araya G. et al. Isradipine and lacidipine: effects in vivo and in vitro on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Gen Pharmacol* 1998; 30:85-7

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:1.

Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994 – 1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:1231-9.

Olliaro P, Darley S, Laxminarayan R, Sundar S. Costeffectiveness projections of single and combination therapies for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 918-25.

Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:763-74.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Chagas disease (American trypanosomiasis). [acesso em 06 mar 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Chagas disease. [acesso em 07 jan 2011]. Disponível em: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. 2011b.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues. [acesso em mar 2009]. Disponível em: http://libdoc.who.int/hq/2003/TDR_PRD_03.1.pdf. 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis. [acesso em 23 out 2011]. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>. 2011a.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection, Ethiopia, Addis Ababa. [acesso em 15 jan 2007]. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf. 2007.

Oprea TI, Davis AM, Teague SJ, Leeson PD. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *J Chem Inf Computer Sci* 2001; 41:1308-15.

Owais M, Gupta CM. Targeted drug delivery to macrophages in parasitic infections. *Curr Drug Deliv* 2005; 2:311–8.

Palit P, Ali N. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1, 4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:374–7.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferongamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:122–7.

Pécoul B. New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. *PLoS Medicine* 2004; 1:E13-6.

Platt N, Silva RP, Gordon S. Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunology Letters* 1999; 65:15–9.

Pourshafie M, Morand S, Virion A, Rakotomanga M, Dupuy C, Loiseau PM. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24- Delta-sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin BResistant promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2409-14.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect* 2007; 9:1307-15.

PubChem Compound. [acesso em 15 out 2011]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

Quilitz R. The use of lipid formulations onf amphotericin B in cancer patients. *Cancer control* 1998; 5:439-49.

Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1425-30.

Randic M, Kleiner AF, DeAlba LM. Distance/distance matrices. *J Chem Inf Comput Sci* 1994; 34:277-86.

Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2004; ;2:151-9.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, de Jesús MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova* 2003; 26:550-5.

Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop* 1995; 59:187-96.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581-96.

Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO. et al. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 7:e484.

Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995; 270:16221-4.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430:463-7.

Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004; 90:1150-4.

Romero EL, Morilla MJ. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin. Drug Deliv* 2008; 5:805-23.

Rosenthal E, Marty P, del Giudice P, Pradier C, Ceppi C, Gastaut JA et al. HIV and *Leishmania* coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of *Leishmania*. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1093-5.

Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 1991; 30:335-40.

Roura X, Sánchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 1999; 144:262-4.

Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OGF, Melo MN, Michalick MSM, et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm* 2006; 315:140–7.

Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *J Antimicrob Chemother* 2001; 8:333–44.

Schuur JH, Selzer P, Gasteiger J. The coding of the three-dimensional structure of molecules by molecular transforms and its application to structure–spectra correlations and studies of biological activity. *J Chem Inf Comput Sci* 1996; 36:334–44.

Schwendener RA. Liposomes in biology and medicine. *Adv Exp Med Biol* 2007; 620:117–28.

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

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

Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F. et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:229-35.

Seifert K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. *Open Med Chem J* 2011; 5:39 31.

Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P. et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microb* 2007; 56:1213–8.

Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaiissi A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitology Internat* 2007; 56:3–7.

SES/CLVA. Secretaria de Estado da Saúde. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo, SP, Brasil. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. *Bepa* 2010; 7:77.

Sindermann H, Engel J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:S17-20.

Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res* 2006; 123:331–44.

Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2007; 147:315-9.

Song HO, Myoung-Hee AHN, Jae-Sook RYU, Duk-Young MIN, Kyoung-Hwan JOO. et al. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. *The Korean J Parasitol* 2004; 42:185-93.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool* 1958; 5:269–73.

Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem* 1980; 104:10–4.

Sundar S, Agrawal G, Rai M, Makharia MK, Murray HW. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trial. *BMJ* 2001; 323: 419-22.

Sundar S, Agrawal N, Arora R, Agarwal D, Rai M, Chakravarty J. Short-course paromomycin treatment of visceral leishmaniasis in India: 14-day vs 21-day treatment. *Clin Infect Dis* 2009; 49, 914-8.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* 2010; 362:504-12.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Shah A, Agrawal N, Rai M. Safety of a pre-formulated amphotericin B lipid emulsion for the treatment of Indian Kala-azar. *Trop Med Int Health* 2008a; 13:1208-12.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002; 28:1739-46.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clin Infect Dis* 2003; 37:800-4.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* 2007; 356:2571-81.

Sundar S, Mehta H, Chhabra A, Singh V, Chauhan V, Desjeux P, et al. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2006; 42:608-13.

Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis* 2004; 38:377-83.

Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Vaillant M, et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis* 2008b; 47:1000-6.

Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, et al. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:139-43.

Sundsford A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmevoll SO, Littauer P, et al. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS* 2004; 112:815-37.

Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 75:4194-8.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. Na improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986; 93:157-165.

Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem* 2001; 276:19150-9.

Talete SRL. DRAGON for Windows. Software for Molecular Descriptor Calculations, Version 5.4. [acesso em 03 out 2006]. Disponível em <http://www.talete.mi.it>.

Talete SRL. Mobydigs Academic version. Version 1.1. [acesso em 14 abr 2009]. Disponível em <http://www.talete.mi.it>.

Tallarida RJ, Kimmel HL, Holtzman SG. Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology* 1997; 133:378-82.

Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt T, Tosun F, et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1352-64.

Taylor JM, Simpson RU. Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer Res* 1992; 52:2413- 8.

Tempone AG, da Silva AC, Brandt CA, Martinez FS, Borborema SE, da Silveira MA, et al. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1076-80

Tempone AG, de Andrade Jr HF. Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against experimental visceral leishmaniasis. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2008; 67:131-6.

Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF Jr. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:60–8.

Tempone AG, Sartorelli P, Mady C, Fernandes F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007; 5:222-35.

Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sungh GP, Messik C, Olliaro P. Treatment of visceral leishmaniasis with injectible paromomycin (aminosidine). An open label randomized phase-II clinical study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:432-3.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 2011; 15:e525-32.

Todeschini R, Gramatica P. 3D-modelling and prediction by WHIM descriptors. Part 5. Theory development and chemical meaning of the WHIM descriptors. *Quant Struct Act Relat* 1997; 16:113-9.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:145–60.

Triggle DJ. The 1,4-dihydropyridine nucleus: A pharmacophoric template. *Mini Rev Med Chem* 2003; 3:166-75.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31:472-81.

Valiathan R, Dubey ML, Mahajan RC, Malla N. *Leishmania donovani*: effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp Parasitol* 2006; 114:103-8.

Vercesi AE, Docampo R. Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem J* 1992; 284:463-7.

Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. Presence of a Na^{+}/H^{+} exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett* 2000; 473:203-6.

Vexenat JA, Croft SL, Furtado Campos JH, Miles MA. Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 1998; 77:71-3.

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026:139-43.

Vitas AI, Díaz R, Gamazo C. Effect of composition and method of preparation of liposomes on their stability and interaction with murine monocytes infected with *Brucella abortus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996; 40:146-51.

Walzer PD, Kim CJ, Foy J. Furazolidone and nitrofurantoin in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:158-63.

Wasunna MK, Rashid JR, Mbui L, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, et al. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmani-asis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:871–6.

Webster BH. Furazolidone in the treatment of giardiasis. *Am J Dig Dis* 1960; 5:618-22

Wermuth CG. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2^a ed. London: Academic Press; 2008.

Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, et al. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:148-51.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; 279:39925-32.

Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:337-48.

Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 4:243-8.

Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:1446-52.

Yunzhe S, Rui Y, Wenliang Z, Xing T. Nimodipine semi-solid capsules containing solid dispersion for improving dissolution. *Int J Pharm* 2008; 359:144–9.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Masse B, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the

mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. FEBS Lett 1996; 384:53–7.

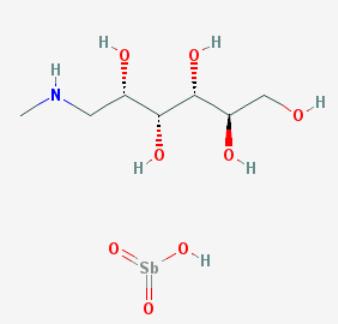
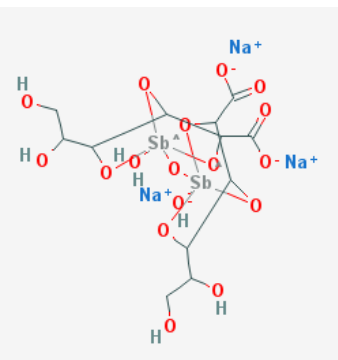
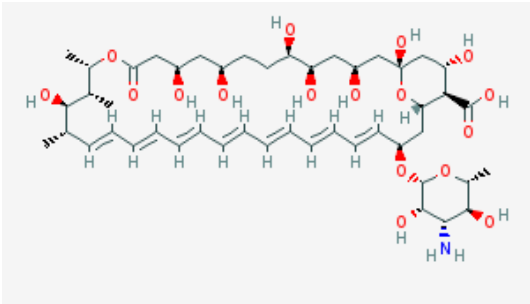
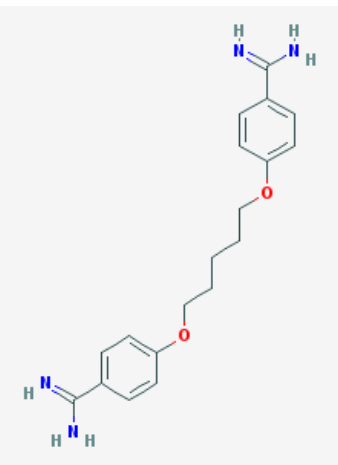
Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. Exp Med 1995; 181:1661-72.

Zorzetto R. Uma doença anunciada. Revista Fapesp 2008; 151:47-51.

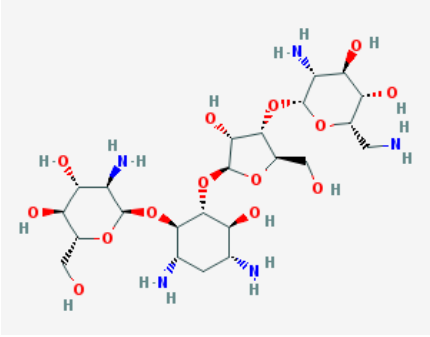
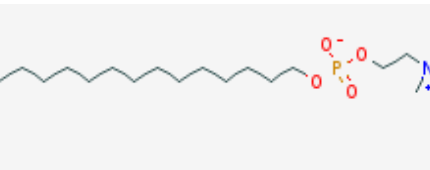
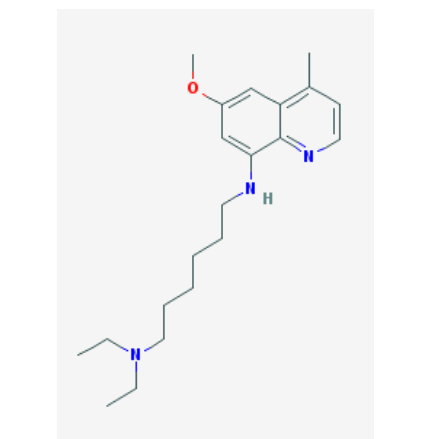
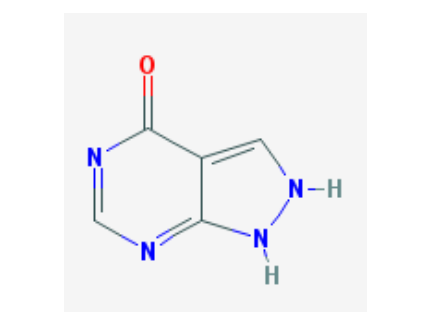
ANEXOS

ANEXO 1

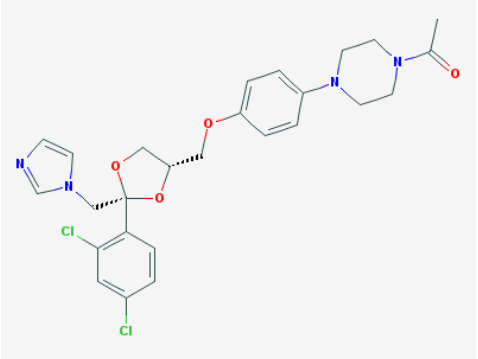
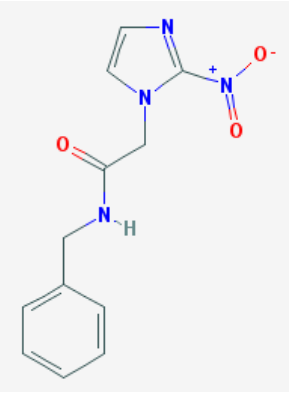
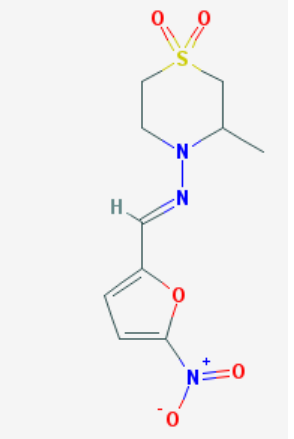
Fórmula molecular, estrutura e classificação dos fármacos usados no tratamento da LV e doença de Chagas.

Nome e fórmula molecular	Estrutura	Classificação
Antimoniato de meglumina (C ₇ H ₁₈ NO ₈ Sb)		Antimonial pentavalente
Estibogluconato de sódio (C ₁₂ H ₃₇ Na ₃ O ₂₆ Sb ₂)		Antimonial pentavalente
Anfotericina B (C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇)		Poliênico
Pentamidina (C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₂)		Benzamidina

Fórmula molecular, estrutura e classificação dos fármacos usados no tratamento da LV e doença de Chagas (continuação).

Nome e fórmula molecular	Estrutura	Classificação
Paromomicina ($C_{23}H_{45}N_5O_{14}$)		Aminoglicosídeo
Miltefosina ($C_{21}H_{46}NO_4P$)		Fosfolípídeo
Sitamaquina ($C_{21}H_{33}N_3O$)		Aminoquinolina
Alopurinol ($C_5H_4N_4O$)		Purina

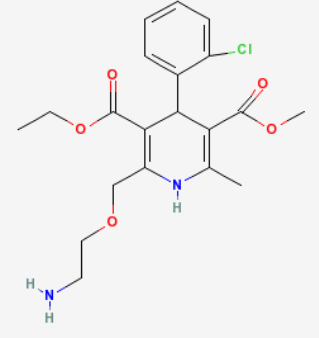
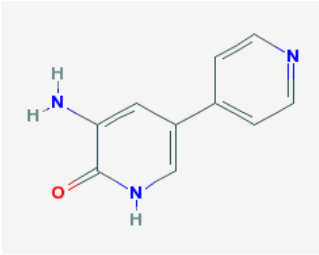
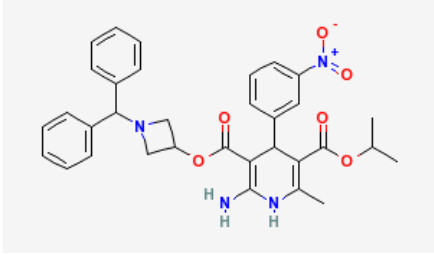
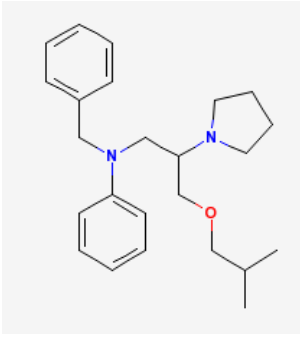
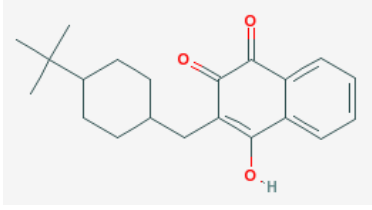
Fórmula molecular, estrutura e classificação dos fármacos usados no tratamento da LV e doença de Chagas (continuação).

Nome e fórmula molecular	Estrutura	Classificação
Cetoconazol $(C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4)$		Imidazol
Beznidazol $(C_{12}H_{12}N_4O_3)$		Nitroimidazol
Nifurtimox $(C_{10}H_{13}N_3O_5S)$		Nitrofurano

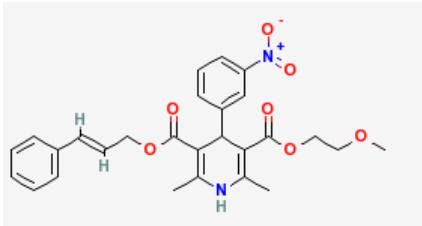
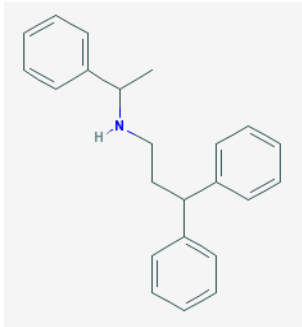
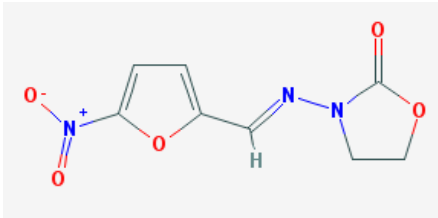
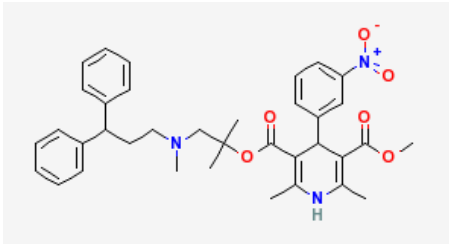
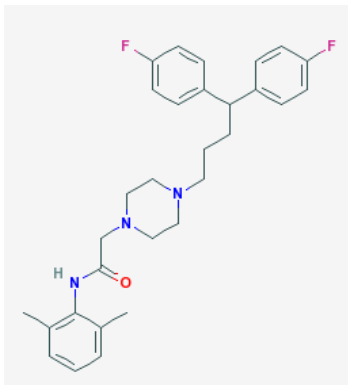
Fonte: PubChem, 2011.

ANEXO 2

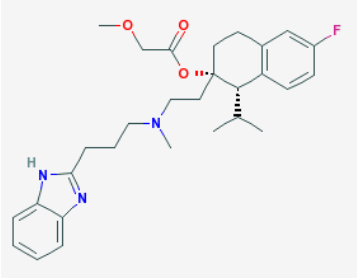
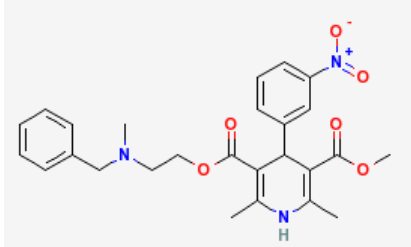
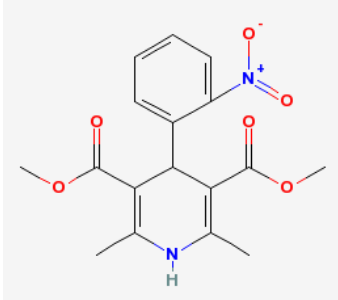
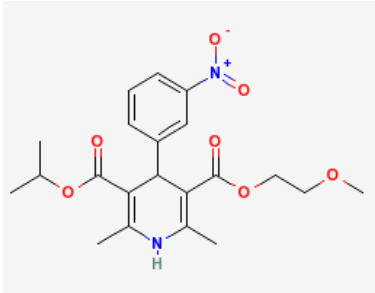
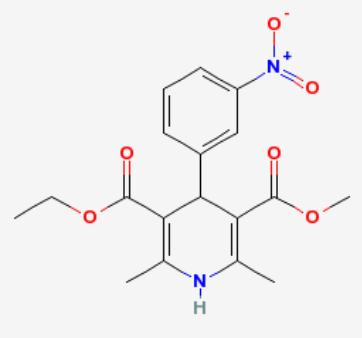
Nome, estrutura, fórmula e classificação dos fármacos em estudo.

Nome	Estrutura	Fórmula molecular	Classificação
Anlodipino		$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$	1,4-dihidropiridina
Anrinona		$C_{10}H_9N_3O$	Aminopiridina
Azelnidipino		$C_{33}H_{34}N_4O_6$	1,4-dihidropiridina
Bepridil		$C_{24}H_{34}N_2O$	Pirrolidina
Buparvaquona		$C_{21}H_{26}O_3$	Naftoquinona

Nome, estrutura, fórmula e classificação dos fármacos em estudo (continuação).

Nome	Estrutura	Fórmula molecular	Classificação
Cilnidipino	 <p>The structure shows a 1,4-dihydropyridine ring substituted with a nitro group at the 4-position, a methyl group at the 2-position, and a methyl group at the 3-position. It is also substituted with a benzylidene group at the 4-position and a methoxyethyl ester group at the 3-position.</p>	$C_{27}H_{28}N_2O_7$	1,4-dihidropiridina
Fendilina	 <p>The structure shows a central carbon atom bonded to two phenyl rings and a propyl chain. The propyl chain is further substituted with a phenyl ring and a methyl group, and the nitrogen atom is bonded to a methyl group and a phenyl ring.</p>	$C_{23}H_{25}N$	Fenetilamina
Furazolidona	 <p>The structure shows a furazolidone ring system substituted with a nitro group at the 2-position and a methyl group at the 4-position. It is also substituted with a methyl group at the 5-position and a methyl group at the 3-position.</p>	$C_8H_7N_3O_5$	Nitrofurano
Lercanidipino	 <p>The structure shows a 1,4-dihydropyridine ring substituted with a nitro group at the 4-position, a methyl group at the 2-position, and a methyl group at the 3-position. It is also substituted with a benzylidene group at the 4-position and a methoxyethyl ester group at the 3-position.</p>	$C_{36}H_{41}N_3O_6$	1,4-dihidropiridina
Lidoflazina	 <p>The structure shows a piperazine ring substituted with a methyl group at the 2-position and a methyl group at the 3-position. It is also substituted with a methyl group at the 4-position and a methyl group at the 5-position.</p>	$C_{30}H_{35}F_2N_3O$	Piperazina

Nome, estrutura, fórmula e classificação dos fármacos em estudo.

Nome	Estrutura	Fórmula molecular	Classificação
Mibefradil		$C_{29}H_{38}FN_3O_3$	Benzimidazol
Nicardipino		$C_{26}H_{29}N_3O_6$	1,4- diidropiridina
Nifedipino		$C_{17}H_{18}N_2O_6$	1,4- diidropiridina
Nimodipino		$C_{21}H_{26}N_2O_7$	1,4- diidropiridina
Nitrendipino		$C_{18}H_{20}N_2O_6$	1,4- diidropiridina

ANEXO 3

Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine

André Gustavo Tempone · Noemi Nosomi Taniwaki ·
Juliana Quero Reimão

Received: 17 March 2009 / Accepted: 18 March 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract In a search for novel antileishmanial drugs, we investigated the activity of the calcium channel blocker nimodipine against *Leishmania* spp. and explored the ultrastructural damages of parasites induced by nimodipine after a short period of incubation. Nimodipine was highly effective against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) chagasi*, with 50% inhibitory concentration values of 81.2 and 21.5 μ M, respectively. Nimodipine was about fourfold more effective than the standard pentavalent antimony against amastigotes and showed a Selectivity Index of 4.4 considering its mammalian cells toxicity. *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (L.) major* promastigotes were also susceptible to nimodipine in a range concentration between 31 and 128 μ M. Ultrastructural studies of *L. (L.) chagasi* revealed intense mitochondria damage and plasma membrane blebbing, resulting in a leishmanicidal effect as demonstrated by the lack of mitochondrial oxidative metabolism. The amastigote-killing effect suggests other mechanism than macrophage activation, as no upregulation of nitric oxide was seen. This calcium channel blocker is an effective in vitro antileishmanial compound and if adequately studied could be used as a novel drug candidate or as a novel drug lead compound for drug design studies against leishmaniasis.

Introduction

Neglected parasitic diseases affect millions of people in developing countries and protozoan parasites are among the

most important pathogens, causing a high morbidity and mortality. Leishmaniasis affects 12 million people worldwide and was responsible for almost 59,000 deaths in 2003 (Davies et al. 2003). The visceral form, with more than 500,000 cases, is a fatal disease and is caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Latin America and by *Leishmania donovani* in India. The therapy of leishmaniasis is particularly difficult, with a restricted therapeutic arsenal, very toxic drugs, and resistance cases especially in India (Santos et al. 2008; Croft et al. 2006). Despite the introduction of the oral anticancer drug Miltefosine in the clinical therapy in India, pentavalent antimonials remain the first line drugs for the New World's disease. Miltefosine is still under investigation, but it fails to treat the American cutaneous species (Soto and Berman 2006). Chemotherapeutic switching or "piggy-back therapy" has been one of the most important methods for the study and clinical introduction of novel drugs for leishmaniasis. This approach can deliver new drugs more quickly and at lower cost as much of the development work has already been done (Croft 2005). Some examples include the use of Miltefosine, amphotericin B, antifungal azoles for leishmaniasis.

Nimodipine (Fig. 1) is a 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker that acts by relaxing the arterial smooth muscle (Blardi et al. 2002). Able to cross the blood-brain barrier, nimodipine can dilate the cerebral arterioles (Haws et al. 1983); thus, it is currently used to prevent and treat the ischemic damage caused by cerebral arterial spasm in subarachnoid hemorrhage (Allen et al. 1983). Nimodipine has also been used in other cerebrovascular disorders, such as ischemic stroke (Langley and Sorkin 1989) and multi-infarct dementia (Pantoni et al. 2000). Dihydropyridines have been presenting promising antimicrobial and antiparasitic activities. Dasgupta and coworkers (Dasgupta et al. 2007) demonstrated that lacidipine, a dihydropyridine, inhibited Gram-positive and negative bacteria in a range

A. G. Tempone (✉) · N. N. Taniwaki · J. Q. Reimão
Laboratório de Toxinologia Aplicada,
Departamento de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz,
Av. Dr. Arnaldo, 355, 8º andar,
CEP 01246-000 São Paulo, São Paulo, Brazil
e-mail: atempone@ial.sp.gov.br

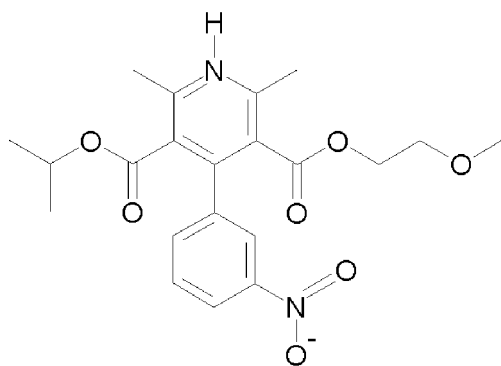


Fig. 1 Chemical structure of nimodipine

concentration of 50–200 $\mu\text{g/mL}$. Antibacterial activity was also demonstrated for amlodipine (Kumar et al. 2003). Protozoan parasites as *Trypanosoma cruzi* were also susceptible to calcium channel blockers, as demonstrated by a significant activity of isradipine and lacidipine (Núñez-Vergara et al. 1998). Despite no antileishmanial activity, Misra and coworkers (Misra et al. 1991) demonstrated the inhibition effect of nifedipine and verapamil on *Leishmania*–macrophage attachment, suggesting a role of the Ca^{2+} ion on the invasion process. Recently, amlodipine and lacidipine were demonstrated to be in vitro and in vivo effective against *L. donovani*, the Indian agent of visceral leishmaniasis (VL). In this work, we report for the first time the antileishmanial activity of nimodipine, a 1,4-dihydropyridine calcium channel blocker, against cutaneous and visceral species of *Leishmania*. We have also investigated the ultrastructural damages caused by nimodipine in *Leishmania* parasites and the possible macrophage activation by nimodipine.

Materials and methods

Materials Lipopolysaccharide (LPS), nimodipine (chemical name *O*5-(2-methoxyethyl) *O*3-propan-2-yl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), sodium dodecyl sulfate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; thiazol blue), M-199, and RPMI-PR⁻ 1640 medium (without phenol red) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentavalent antimony (Glucantime, Aventis-Pharma, Brazil) and pentamidine (Sideron, Brazil) were used as standard drugs. Other analytical reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) unless where stated otherwise.

Animals BALB/c mice and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were supplied by the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute of São Paulo and maintained in sterilized cages under a controlled environment, receiving water and food ad libitum. Animal procedures were

performed with the approval of the Research Ethics Commission (project CCD-BM 16/2004), in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences (<http://www.nas.edu>).

Parasite maintenance *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) was maintained in golden hamsters, up to approximately 60 to 70 days postinfection. Promastigotes were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24°C (Tempone et al. 2004). Isolated promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016) and *Leishmania (L.) major* (MHOM/IL/80/Fredlin) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24°C.

Peritoneal macrophage collection Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of female BALB/c mice by washing with RPMI-1640 without phenol red, supplemented with 10% calf serum. Cells were dispensed in 96- or 24-well microplate and maintained for 1 h in the same medium at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator for attachment. Nonadherent cells were removed by two step washings with medium.

Determination of the 50% inhibitory concentration Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1×10^6 cells/well in 96-well microplates using pentamidine as standard.¹⁴ Nimodipine was dissolved in methanol, diluted in M-199 medium, and incubated with parasites in different concentrations (based on dry weight) for 24 h at 24°C. Parasite viability was determined using the MTT assay at 550 nm (Tada et al. 1986). Each assay was performed in triplicate. The activity against *L. chagasi* intracellular amastigotes was determined with infected macrophages, using pentavalent antimony as standard. Briefly, peritoneal macrophages were seeded at 4×10^5 cells/well in 13 mm glass cover slips in 24-well microplates for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator. Amastigotes obtained from hamster spleen by differential centrifugation (Stauber et al. 1958) were added to macrophages at 10:1 ratio (amastigotes/macrophage) and incubated for 24 h. Noninternalized parasites were removed by washing and test compounds were then incubated for 120 h at the same conditions. Finally, glass cover slips were fixed with methanol, stained with Giemsa, and observed in a light microscope. The parasite burden was defined as the mean number infected macrophages out of 600 cells (Tempone et al. 2004).

Cytotoxicity against mammalian cells Kidney Rhesus monkey cells (LLC-MK2) were cultured using RPMI-1640 medium supplemented with 10% calf serum at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator. Cells were removed by

scrapping, seeded at 4×10^4 cells/well in 96-well microplates, and further incubated with drugs for 48 h at 37°C, using pentamidine and Glucantime® as control. The viability of the cells was determined using MTT assay at 550 nm (Tada et al. 1986).

Hemolytic activity The capacity of nimodipine to induce hemolysis at concentrations close to the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against *Leishmania* was verified using a 3% suspension of BALB/c mice erythrocytes. The drug was incubated for 2 h with cells at different concentrations in 96-well U-shape microplates at 25°C. The supernatant was removed and analyzed at 550 nm (Moreira et al. 2007) in a multiwell scanning spectrophotometer (Labsystems; Multiskan EX).

Macrophage nitric oxide production In order to detect the macrophage activation induced by nimodipine, the production of nitric oxide (NO) was evaluated using the Griess reaction (Panaro et al. 1999). Briefly, macrophages were dispensed in a 24-well microplate and incubated for 24 h with the drug at a nontoxic concentration (<IC₅₀) at 37°C. LPS (50 µg/mL) was used to induce NO upregulation. The absorbance was determined at 550 nm using a multiwell scanning spectrophotometer (Labsystems; Multiskan EX).

Transmission electron microscopy analysis The ultrastructural changes of *L. (L.) chagasi* promastigotes induced by nimodipine (21 µM) were evaluated in different periods (2, 4, 6 h). Subsequently, promastigotes were processed and observed in a JEOL transmission electron microscope (Duarte et al. 1992).

Inhibition of amastigotes invasion in macrophages The inhibitory effect of nimodipine on amastigote invasion in macrophages was evaluated using different drug concentrations and periods. Peritoneal macrophages (24-well microplates) were pretreated with nimodipine at 48, 24, and 2.4 µM for 1 to 3 h. Before infection, cells were

washed twice with RPMI-1640 medium and further incubated with previously isolated amastigotes at 10:1 (amastigotes/macrophage) ratio for 1 h. Cells were washed to remove noninternalized parasites.

Statistical analysis The data obtained represent the mean and standard deviation of triplicate samples from two independent assays. The IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose–response curves performed using GraphPad Prism version 5.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

Results

In vitro antileishmanial activity of nimodipine *Leishmania* parasites were incubated for 24 h with nimodipine using the MTT assay for viability. The drug was effective against both *L. (L.) chagasi* forms, the axenic promastigotes and intracellular amastigotes. The evaluation of the IC₅₀ demonstrated that promastigotes were less susceptible than amastigotes, with an EC₅₀ value of 82.68 and 21.62 µM, respectively (Table 1). *L. (L.) major*, an etiological agent of the Old World Cutaneous Leishmaniasis, was the most susceptible to nimodipine with an IC₅₀ value of 31 µM. Nimodipine was also effective against an etiological agent of Brazilian cutaneous leishmaniasis, *L. (L.) amazonensis*, showing an IC₅₀ value of 128.16 µM. Based in the mitochondrial oxidation of MTT and by light microscopy, nimodipine presented a leishmanicidal activity as observed by the sigmoidal dose–response curves, with 100% of *L. (L.) chagasi* death at the highest concentration of 191 µM, at 37 µM for *L. major*, and at 358 µM for *L. amazonensis* (data not shown). Pentamidine was used as internal control against promastigotes and resulted in an IC₅₀ range between 0.059 and 0.303 µM. Pentavalent antimony (Glucantime®) was used as control to the intracellular amastigote assay and resulted in an IC₅₀ of 242 µM against *L. (L.) chagasi*.

Table 1 Effect of nimodipine on *Leishmania* parasites and mammalian cytotoxicity

Drug	IC ₅₀ (µM; 95%CI)					HA	SI
	<i>L. (L.) chagasi</i> promastigotes	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotes	<i>L. (L.) major</i> promastigotes	<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	LLC-MK2		
Nimodipine	82.68 (83.33 to 197.11)	128.16 (83.33 to 197.11)	31.04 (24.68 to 39.05)	21.62 (15.05 to 30.99)	96.19 (95.87 to 96.50)	0	4.4
Pentamidine	0.16 (0.099 to 0.264)	0.050 (0.033 to 0.050)	0.269 (0.236 to 0.303)	nd	14.72 (12.21 to 17.75)	nd	nd
Glucantime	>8,213	>8,213	>8,213	80.74 (76.75 to 84.95)	>2,732,38	nd	>33

IC₅₀ 50% inhibitory concentration, 95% CI 95% confidence interval, HA hemolytic activity (%) at 179.23 µM, SI Selectivity Index, nd not determined

Nimodipine cytotoxicity The mammalian cytotoxicity of nimodipine was evaluated using Kidney Rhesus monkey cells in a close concentration to the antileishmanial IC_{50} value. The in vitro assay was performed for 48 h and resulted in an IC_{50} of 96.19 μM . The hemolytic activity was also determined as a cytotoxic parameter, but no damages to mice erythrocytes could be observed after nimodipine incubation to the highest concentration of 179 μM (Table 1).

Inhibition of macrophage infection assay The probable blockage of the amastigote penetration into the host cells was evaluated using nimodipine-treated macrophages. Peritoneal macrophages were pretreated with the drug for 1 to 3 h at three concentrations, but nimodipine could not inhibit the penetration of amastigotes even at the highest tested concentration. The number of parasites/macrophages was also unaltered in treated groups (data not shown).

Nitric oxide production As a consequence of a leishmanicidal effect of nimodipine in the intracellular amastigote assay, the possible activation of macrophages was investigated through the Griess reaction. The data showed no considerable upregulation of the nitric oxide production after 24 h incubation when compared to controls (Fig. 2). Bacterial LPS was used as internal control (100% NO production) and demonstrated a high upregulation when compared to nimodipine.

Transmission electron microscopy study The ultrastructural damages of *Leishmania* caused by nimodipine incubation were investigated using a transmission electron microscopy. Promastigotes were previously treated with the drug for different periods at its IC_{50} value. After 2 h incubation, the overall morphology of the cell was not altered, but an increase in intracytoplasmic vacuoles was clearly observed (Fig. 3b). The parasite plasma membrane was also affected

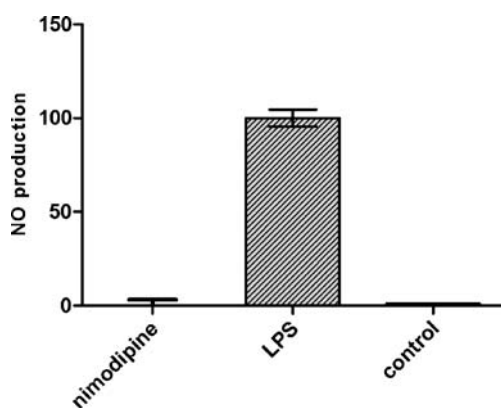


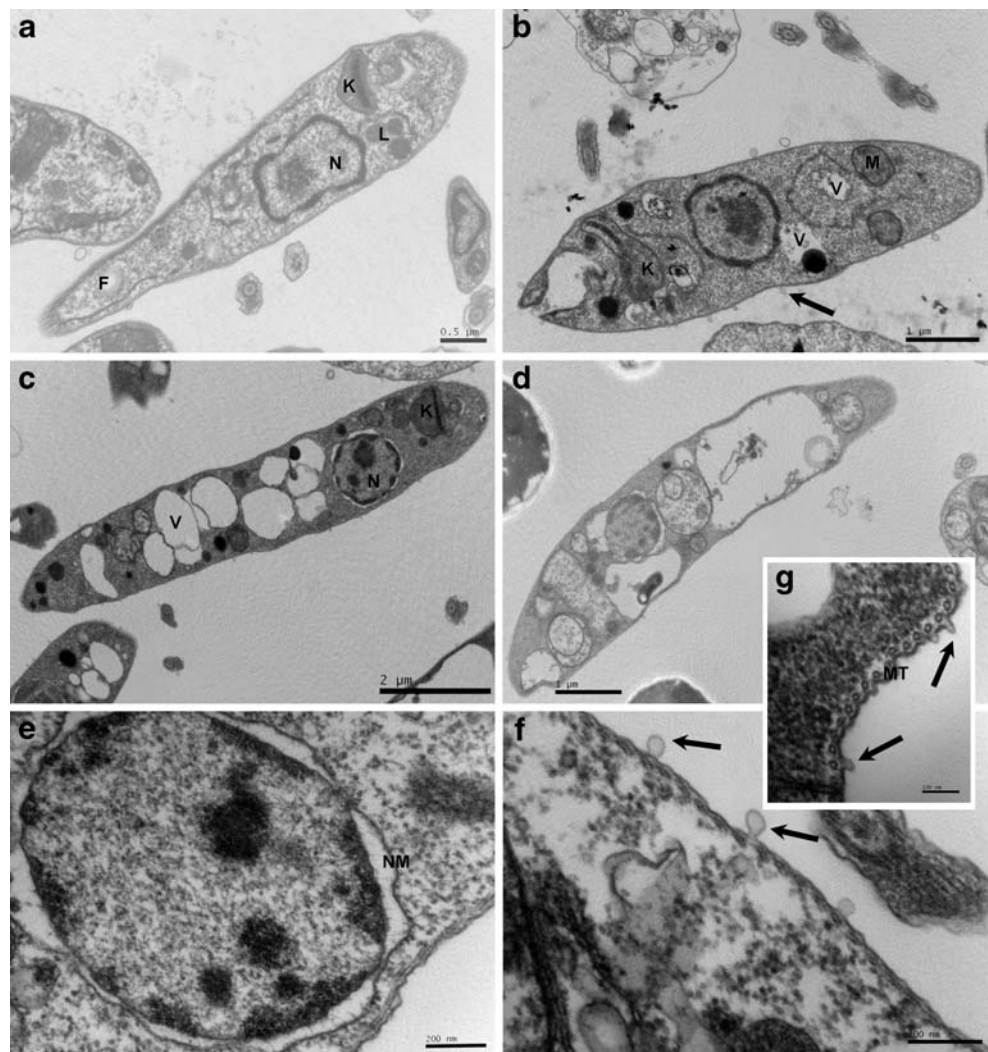
Fig. 2 Effect of nimodipine on macrophages nitric oxide (NO) production. The nitrite content was determined by the Griess reaction at 550 nm. LPS was used as control

by the drug, as shown by the membrane blebbing (arrow). No significant alterations were observed in the nucleus, but enlarged mitochondria of the kinetoplast was observed. After 4 h incubation, the nuclear membrane was clearly affected, with detachment of bilayer (Fig. 3e), despite the overall morphology of the cell was well preserved. A large number of intracytoplasmic vacuoles and enlarged mitochondria (Fig. 3c) and an intense membrane blebbing effect was observed (Fig. 3f, g, arrows). After 6 h, the fusion of intracytoplasmic vacuoles might have occurred, as large vacuoles were found inside the cells with an intense loss of intracytoplasmic organelles (Fig. 3d). A nontreated promastigote was used as control (Fig. 3a).

Discussion

Previous work using dihydropyridines demonstrated potential antimicrobial (Kumar et al. 2003) and antiparasitic activities (Misra et al. 1991). Therapeutic switching or “piggy back chemotherapy” has been a promising alternative to provide novel antileishmanial drugs, reducing the time and costs of the research against neglected parasitic diseases. In a search for novel effective antileishmanial drugs, we demonstrated for the first time in the literature that nimodipine presents a specific activity against cutaneous and visceral species of *Leishmania*. The in vitro activity against promastigotes showed that *L. major* was the most susceptible to nimodipine, with an IC_{50} value 2.6-fold smaller than for *L. (L.) chagasi*. By using the most relevant clinical form, the amastigotes, nimodipine effectively eliminated the intracellular *L. (L.) chagasi* and demonstrated to be significantly ($p < 0.001$) fourfold more active than the standard pentavalent antimony (Glucantime®). Other two dihydropyridines, amlodipine and lacidipine, have also been demonstrated antileishmanial activity. Both drugs effectively treated *L. donovani*-infected macrophages, with an in vitro IC_{50} value of 5.1 and 6.6 μM , respectively (Palit and Ali 2008). Other two calcium channel blockers, isradipine and lacidipine, have also been demonstrated antitrypanosomal activity, killing extracellular epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* in a range concentration between 20 and 31 μM . Despite the promising activity, verapamil and diltiazem lacked antitrypanosomal effect (Núñez-Vergara et al. 1998), showing that protozoan parasites have different susceptibilities for calcium channel blockers. In our assays, the relationship between the toxicity toward the kidney Rhesus monkey cells (LLC-MK2) and the antileishmanial activity, given by the Selectivity Index (SI), demonstrated a considerable value of 4.4 for nimodipine. The capacity of nimodipine to induce hemolysis at concentrations close to the IC_{50} against *Leishmania* was verified using mice erythrocytes. Nimodipine showed no hemolytic activity to the highest concentration of 180 μM ,

Fig. 3 Transmission electron microscopy of *L. (L.) chagasi* incubated with nimodipine. Promastigotes were incubated for different periods at 24 °C. **a** Control group. **b** 2 h incubation. **c** 4 h incubation. **d** 6 h incubation. **e** 4 h incubation. **f**, **g** 4 h incubation. *K* kinetoplast, *M* mitochondria, *N* nucleus, *F* flagellum, *L* lipid inclusion, *V* vacuoles, *MT* microtubules, *NM* nuclear membrane



being harmless to erythrocytes when one considers its in vitro IC_{50} value against intracellular amastigotes (21 μ M). The use of drug delivery systems could be an important alternative to nimodipine, improving its SI through the delivery of high amounts of the drug to infected macrophages. Tempone et al. (2004) demonstrated that phosphatidylserine liposomes entrapping pentavalent antimony was in vitro 16-fold more effective against infected macrophages when compared to free drug. This formulation was also 133-fold more effective in experimental *L. (L.) chagasi* models (Tempone and Andrade 2008). In vivo assays should be carried out to investigate the nimodipine antileishmanial activity. Free and liposome-loaded nimodipine is under investigation in our laboratory for the treatment of hamster models of VL.

Macrophages are the host cells in leishmaniasis and play an important role in the immunological control of intracellular parasites through the production of cytokines and oxygen metabolites (Balaraman et al. 2004). Through the upregulation of the effective mediator nitric oxide inside the

cell, macrophages trigger the amastigote killing mechanism (Mauel and Ransijn 1997). We have investigated the possible activation of macrophages induced by nimodipine using the Griess reaction (Panaro et al. 1999). Our results clearly demonstrated no upregulation of NO, suggesting that the antileishmanial effect of nimodipine might be other mechanism than NO activation by macrophages. In addition, the drug efficacy against the extracellular promastigotes supports the principle of a specific antiparasitic activity, without the need of macrophage intervention for the leishmanicidal effect. The dependency of macrophage activation for the pentavalent antimony leishmanicidal effect has been demonstrated, as an upregulation of NO and tumor necrosis factor- α contributes to the killing of intracellular amastigotes (Mookerjee Basu et al. 2006). Thus, an immunocompetent organism has been demonstrated to be important for the treatment of VL with antimonial drugs and coinfection with HIV clearly demonstrated the limitation of this therapy. Based in our in vitro data, nimodipine demonstrated a superior efficacy than pentavalent antimony against *L. (L.)*

chagasi, selectively eliminating the intracellular parasites without the requirement of macrophage activation.

The ultrastructural damages of *L. (L.) chagasi* promastigotes caused by nimodipine revealed an intense swelling of mitochondrias, plasma membrane blebbing, and strong alterations in nuclear membrane. The overall mitochondrial damages were not accompanied by alterations of the kinetoplast, suggesting that this organelle might not be the preferential target of the drug. Despite the conserved subpellicular corset of microtubules, the parasite membrane was clearly affected, with a strong blebbing effect in a short period of incubation (2 h). Despite this marked alteration, no pore-forming activity in plasma membrane could be detected and in addition, no cell edema could be observed at the highest time of incubation, suggesting other mechanism than ions leakage during the cell death progression. Despite the prompt leishmanicidal effect, confirmed by the lack of mitochondrial oxidation of MTT, the overall shape and morphology of promastigotes were well preserved by the end of the assay.

In a previous report, the calcium channel blockers nifedipine and verapamil effectively inhibited the macrophage infection by *L. (L.) donovani*, but no antiparasitic effect was observed (Misra et al. 1991). The authors also suggested an important participation of calcium ions in the invasion process. In contrast, Ganguly et al. (1991) demonstrated an increase in the percentage of *L. donovani*-infected macrophages in the presence of nifedipine. The authors suggested that the availability of intracellular calcium is a factor in the defense mechanism of macrophages. In order to elucidate this controversial data using another calcium channel blocker (nimodipine), we carried out a similar assay with macrophages. Despite the related chemical structure between nifedipine and nimodipine, our data demonstrated no decrease in percentage of *L. (L.) chagasi*-infected macrophages compared to controls and also no enhance in the number of intracellular amastigotes per macrophage. Palit and Ali (2008) demonstrated that calcium channel blockers as lacipidine, amlodipine, verapamil, and diltiazem inhibited the Ca^{2+} uptake by *Leishmania*, but only the two dihydropyridines showed antiparasitic activity. This result contradicts the correlation between the leishmanicidal activity and the Ca^{2+} channel blocking action of these drugs, as verapamil and diltiazem are also effective calcium antagonists. Many antileishmanials that inhibit the respiratory chain complexes also induce apoptosis (Mehata and Shaha 2004). Our results demonstrated that nimodipine affects mitochondrial functions, as no oxidation of MTT by dehydrogenases could be detected. Inhibition of oxygen consumption causes an increase in the intracellular reactive oxygen species, leading to a loss of mitochondrial membrane potential (Palit and Ali 2008). This could have been a possible effect of nimodipine in *Leishmania*, resulting in enlarged

mitochondria as observed in transmission electron microscopy. Further assays must be conducted in order to elucidate this mechanism and also to investigate the possibility of *Leishmania* apoptosis.

The 1,4-dihydropyridines have been considered promising antiparasitic drugs, mainly against protozoan parasites. Recently, it was demonstrated that verapamil could effectively reverses antimony resistance in *L. (L.) donovani* (Valiathan et al 2006). The 1,4-dihydropyridine nucleus belongs, in fact, to the class of “privileged structures”, a term formally introduced by Evans et al (1988). It has served as a scaffold for second and third generation drugs of calcium channel blockers and also as a scaffold or “privileged” structure for molecules active at a diverse collection of ion channels and pharmacological receptors (Triggle et al. 1989; Triggle 2003a). Approximately, ten of these agents have been used in the clinical medicine for the treatment of a number of cardiovascular disorders (Triggle 2003b). Considering the high versatility of this pharmacophore, its further exploitation as a novel lead compound may yield selective and potent drug prototypes against neglected diseases as visceral leishmaniasis.

Acknowledgments This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2008/09260-7) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq; 550376/21007-0). We also thank CNPq for the scientific research award given to AGT (303663/2008-1).

References

- Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Boone SC, Chou SN, Kelly DL, Weir BK, Crabbe RA, Lavik PJ, Rosenbloom SB, Dorsey FC, Ingram CR, Mellits DE, Bertsch LA, Boisvert DP, Hundley MB, Johnson RK, Strom JA, Transou CR (1983) Cerebral arterial spasm—a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med* 11: 619–624
- Balaraman S, Tewary P, Singh VK, Madhubala R (2004) *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem Biophys Res Commun* 30:639–647
- Blardi P, Urso R, De Lalla A, Volpi L, Perri TD, Auteri A (2002) Nimodipine: drug pharmacokinetics and plasma adenosine levels in patients affected by cerebral ischemia. *Clin Pharmacol Ther* 72:556–561
- Croft SL (2005) Public–private partnership: from there to here. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:S9–S14
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111–126
- Dasgupta A, Jeyaseeli L, Dutta NK, Mazumdar K, Karak P, Dastidar SG, Motohashi N, Shirataki Y (2007) Studies on the antimicrobial potential of the cardiovascular drug lacipidine. *In Vivo* 21:847–850
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S (2003) Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 326:377–382

- Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE (1992) A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol* 16:475–482
- Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, Lundell GF, Veber DF, Anderson PS, Chang RS (1988) Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem* 31:2235–2246
- Ganguly NK, Sodhi S, Kaul N, Kaur S, Malla N, Mahajan RC (1991) Effect of nifedipine on *Leishmania donovani* infection in-vivo and in-vitro: chemiluminescence responses of peritoneal macrophages and neutrophils. *J Pharm Pharmacol* 43:140–142
- Haws CW, Gourley JK, Heistad DD (1983) Effects of nimodipine on cerebral blood flow. *J Pharmacol Exp Ther* 225:24–28
- Kumar KA, Ganguly K, Mazumdar K, Dutta NK, Dastidar SG, Chakrabarty AN (2003) Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property. *Acta Microbiol Pol* 52:285–292
- Langley MS, Sorkin EM (1989) Nimodipine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cerebrovascular disease. *Drugs* 37:669–699
- Mauel J, Ransijn A (1997) *Leishmania* spp. mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp Parasitol* 87:98–111
- Mehata A, Shaha C (2004) Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 279:11798–11813
- Misra S, Naskar K, Sarkar D, Ghosh DK (1991) Role of Ca²⁺ ion on *Leishmania*–macrophage attachment. *Mol Cell Biochem* 102:13–18
- Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S (2006) Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1788–1797
- Moreira DR, Lima-Leite AC, Pinheiro-Ferreira PM, da Costa PM, Costa Lotufo LV, de Moraes MO, Brondani DJ, Pessoa Cdo O (2007) Synthesis and antitumour evaluation of peptidyl-like derivatives containing the 1, 3-benzodioxole system. *Eur J Med Chem* 42:351–357
- Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Bollo-Dragnic S, Marín-Catalán R, Pino L, Díaz-Araya G, Letelier ME (1998) Isradipine and lacidipine: effects in vivo and in vitro on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Gen Pharmacol* 30:85–87
- Palit P, Ali N (2008) Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1, 4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 52:374–377
- Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O (1999) Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res* 29:122–127
- Pantoni L, Bianchi C, Beneke M, Inzitari D, Wallin A, Erkinjuntti T (2000) The Scandinavian multi-infarct dementia trial: a double-blind, placebo-controlled trial on nimodipine in multi infarct dementia. *J Neurol Sci* 175:116–123
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103:1–10
- Soto J, Berman J (2006) Treatment of new world cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:34–40
- Stauber LA, Franchino EM, Grun J (1958) An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool* 5:269–273
- Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93:157–165
- Tempone AG, Andrade HF Jr (2008) Nanoformulations of pentavalent antimony entrapped in phosphatidylserine-liposomes demonstrate highest efficacy against experimental visceral leishmaniasis. *Rev Inst Adolfo Lutz* 67:64–68
- Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF Jr (2004) Targeting *Leishmania* (*L.*) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother* 54:60–68
- Triggle DJ (2003a) The 1, 4-dihydropyridine nucleus: a pharmacophoric template. *Rev Med Chem* 3:166–175
- Triggle DJ (2003b) 1, 4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures. *Cell Mol Neurobiol* 23:293–303
- Triggle DJ, Langs DA, Janis RA (1989) Ca²⁺ channel ligands: structure–function relationships of the 1, 4-dihydropyridines. *Med Res Rev* 9:123–180
- Valiathan R, Dubey ML, Mahajan RC, Malla N (2006) *Leishmania donovani*: effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp Parasitol* 114:103–108

ANEXO 4

Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study

Juliana Quero Reimão · Noemi Nosomi Taniwaki ·
André Gustavo Tempone

Received: 22 February 2010 / Accepted: 3 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The current treatment for leishmaniasis is unsatisfactory due to toxic side effects, high cost, and problems with drug resistance. Various approaches have been used to identify novel drug candidates to treat *Leishmania* sp. parasites including the use of re-purposed drugs. Furazolidone is a nitrofurantoin derivative with antiprotozoal and antibacterial activity and is used for the treatment of giardiasis. In the present work, we determined the in vitro antileishmanial activity of furazolidone and its ability to induce ultrastructural alterations of parasites. Promastigotes of *Leishmania (L.) chagasi*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) major*, and *Leishmania (L.) amazonensis* were highly susceptible to furazolidone, with IC₅₀ values ranging between 0.47 and 0.73 µg/mL. Furazolidone was also very effective against *L. chagasi* intracellular amastigotes, and despite mammalian cytotoxicity, the selectivity index was 8.0 in human monocytes. The drug also had limited toxicity in mice erythrocytes. Furazolidone demonstrated specific activity against *Leishmania*, a potential consequence of the lack of macrophage nitric oxide activation. As determined by electron transmission microscopy, drug treatment induced severe damage to the parasite mitochondria and nucleus. This older oral drug is an effective agent for the treatment of *L. (L.) chagasi* in vitro and is a novel candidate for further experimental studies.

Introduction

Leishmaniasis, a vector-borne disease caused by obligate intramacrophage protozoa, is one of the six most important diseases listed by the World Health Organization/Tropical Disease Research (WHO/TDR; Herwaldt 1999; Desjeux 2001). The disease is endemic to 88 countries in five continents with a total of 350 million people at risk and 12 million cases (Desjeux 1996).

Visceral leishmaniasis (VL) is one manifestation of leishmaniasis. It is estimated that 500,000 new cases of VL occur each year. The actual death toll from the disease may be higher than this estimate when considering the existence of unidentified VL foci. Approximately 90% of those affected by the disease live in five countries: India, Bangladesh, Nepal, Brazil, and Sudan (WHO 2008). For many decades, VL has been treated with pentavalent antimonials, and despite the high toxicity, this treatment remains the standard of care in most of the countries. Other drugs, such as pentamidine, amphotericin B, and liposomal amphotericin B (AmBisome), are available for the treatment of VL but are not optimal due to problems of toxicity, high cost, and difficult administration (Guerin et al. 2002). Thus, there is an urgent need for alternative drugs.

Older drugs have been successful at bringing new therapies to the developing world. A recent example of a re-purposed drug is miltefosine; initially developed for breast cancer, it is now effectively used to treat VL (Sundar et al. 2002). Furazolidone (FUZ) is a nitrofurantoin derivative with antiprotozoal and antibacterial activity (Fig. 1). It is used in the treatment of trichomoniasis (Giron Blanc 1959), cholera (WHO 1990), giardiasis (Khaw and Panosian 1995), and *Helicobacter pylori* infection (Guslandi 2001). In this study, we investigated the in vitro antileishmanial activity of furazolidone on *Leishmania* spp. The effects of this drug

J. Quero Reimão · N. Nosomi Taniwaki ·
A. Gustavo Tempone (✉)
Laboratory of Applied Toxinology on Antiparasitic Drugs,
Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz,
Av. Dr. Arnaldo, 355, 8° andar, Cerqueira César,
CEP 01246-000 São Paulo, São Paulo, Brazil
e-mail: atempone@ial.sp.gov.br

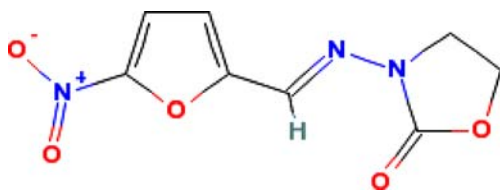


Fig. 1 Chemical structure of furazolidone (PubChem Compound 2010)

on mammalian cytotoxicity and ultrastructural changes of *Leishmania (L.) chagasi* promastigotes were determined.

Materials and methods

Materials DMSO, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, thiazol blue), lipopolysaccharide (LPS), sodium dodecyl sulfate, RPMI-PR⁻ 1640 medium, M 199 medium, and furazolidone (chemical name 3-[(*E*)-(5-nitrofuran-2-yl)methylideneamino]-1,3-oxazolidin-2-one) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentavalent antimony (Glucantime[®]) and pentamidine were obtained from Aventis and Sideron, respectively. Other analytical reagents were purchased from Sigma unless otherwise stated.

Bioassay procedures BALB/c mice and Golden hamsters were supplied by the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute of São Paulo. They were maintained in sterilized cages under a controlled environment and received water and food ad libitum. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission, in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

Parasite maintenance *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) was maintained in Golden hamsters, up to approximately 60 to 70 days post-infection. Promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *Leishmania (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *Leishmania (L.) major* (MHOM/1 L/80/Fredlin), and *Leishmania (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24°C.

Mammalian cells Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of female BALB/c mice by washing with RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum). THP-1 (human monocytes ATCC number TIB-202) cells were maintained in RPMI-1640 medium (without phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum) at 37°C in a 5% CO₂-humidified incubator.

Determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) *Leishmania* promastigotes were seeded at 1×10⁶ cells/well in 96-well microplates as described elsewhere (Sartorelli et al. 2007). Pentamidine was used as a reference drug. FUZ was dissolved in DMSO at a concentration not exceeding 20 µg/mL (based on dry weight) and incubated for 48 h at 24°C. Parasitic viability was determined by the MTT assay measured at 550 nm (Tada et al. 1986). Each assay was performed in triplicate. The activity against *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes was determined in infected macrophages (Sartorelli et al. 2007). FUZ and Glucantime[®] were incubated for 120 h at 37°C in a 5% CO₂-humidified incubator. The parasite burden was defined as the mean number of infected macrophages out of 600 cells (triplicate recordings). The data obtained represent the mean of three independent assays.

Cytotoxicity against mammalian cells Macrophages (4×10⁵ cells/well) and THP-1 cells (1×10⁴ cells/well) were seeded in 96-well microplates at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The mammalian cells were incubated with FUZ at a concentration not exceeding 300 µg/mL for 48 h at 37°C; pentamidine and Glucantime[®] were used as standard drugs. Cell viability was determined by the MTT assay measured at 550 nm (Tada et al. 1986). The data obtained represent the mean of two independent assays.

Hemolytic activity A 3% suspension of BALB/c mice erythrocytes was incubated for 2 h with FUZ at a concentration not exceeding 300 µg/mL in 96-well U-shape microplates at 25°C. The supernatant was measured at 550 nm in a Multiskan spectrometer reader (Reimão et al. 2008).

Macrophage nitric oxide quantification The production of nitric oxide by macrophages was measured using the Griess reaction (Panaro et al. 1999). Peritoneal macrophages were incubated for 24 h at 37°C with FUZ (3 µg/mL). LPS (50 µg/mL) was used to induce nitric oxide (NO) up-regulation. The absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan spectrometer reader. The data obtained represent the mean of two independent assays.

Transmission electron microscopy analysis *L. (L.) chagasi* promastigotes were incubated with FUZ at 2.0 µg/mL for various durations of time (12, 20, 26, and 40 h) at 24°C in 24-well plates. Subsequently, promastigotes were processed and observed in a JEOL transmission electron microscope (Duarte et al. 1992).

Statistical analysis The data obtained represent the mean and standard deviation of duplicate or triplicate samples from two independent assays. The IC₅₀ values were

calculated using sigmoid dose–response curves in Graph Pad Prism 5.0 software, and the 95% confidence intervals were included.

Results

Antileishmanial activity and cytotoxicity of FUZ The effects of FUZ treatment on cell viability were tested on different species of *Leishmania* using the MTT assay. Promastigotes of *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, and *L. (L.) amazonensis* were inhibited by FUZ treatment, with IC_{50} values of 0.71, 0.73, 0.61, and 0.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Fig. 2). Pentamidine was used as a standard drug and had IC_{50} values ranging between 0.03 and 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. FUZ treatment also inhibited intracellular amastigotes viability of *L. (L.) chagasi* with an IC_{50} value of 1.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 3). Glucantime® was used as standard drug and had an IC_{50} value of 27.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Using the cytotoxicity assay, it was demonstrated that a 48-h FUZ treatment was toxic to peritoneal macrophages and THP-1 cells only at higher concentrations ($IC_{50}=12.74 \mu\text{g}/\text{mL}$). As measured by the hemolytic assay, FUZ treatment was minimally toxic to mice erythrocytes at a concentration of 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with slight hemolysis (3%) observed at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (data not shown).

Ultrastructural studies of promastigotes Ultrastructural studies of *L. (L.) chagasi* promastigotes determined that FUZ treatment induced damage to parasites in a time-dependent manner (Fig. 4). Beginning at the 12-h time point, damage was observed as an increase in the number of vacuoles (Fig. 4b). After a 20-h incubation with the drug (Fig. 4c), parasites had a rotund morphology; large vacuolization with an absence of a kinetoplast was observed as well as damage to the nucleus. Loss of

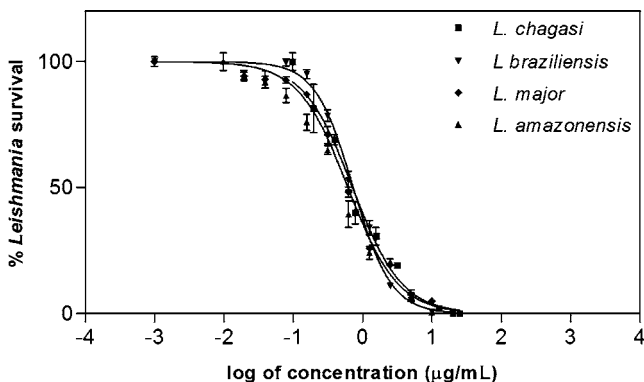


Fig. 2 Dose–response curves of furazolidone treatment on promastigotes of *Leishmania* spp. The parasitic viability was determined by the MTT assay measured at 550 nm

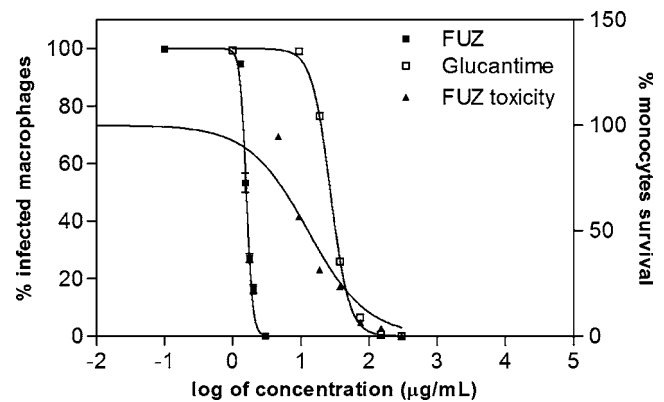


Fig. 3 Fifty percent inhibitory concentration (IC_{50}) curves of furazolidone treatment on *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes (left side) and cytotoxic effects on human monocytes (THP-1; right side)

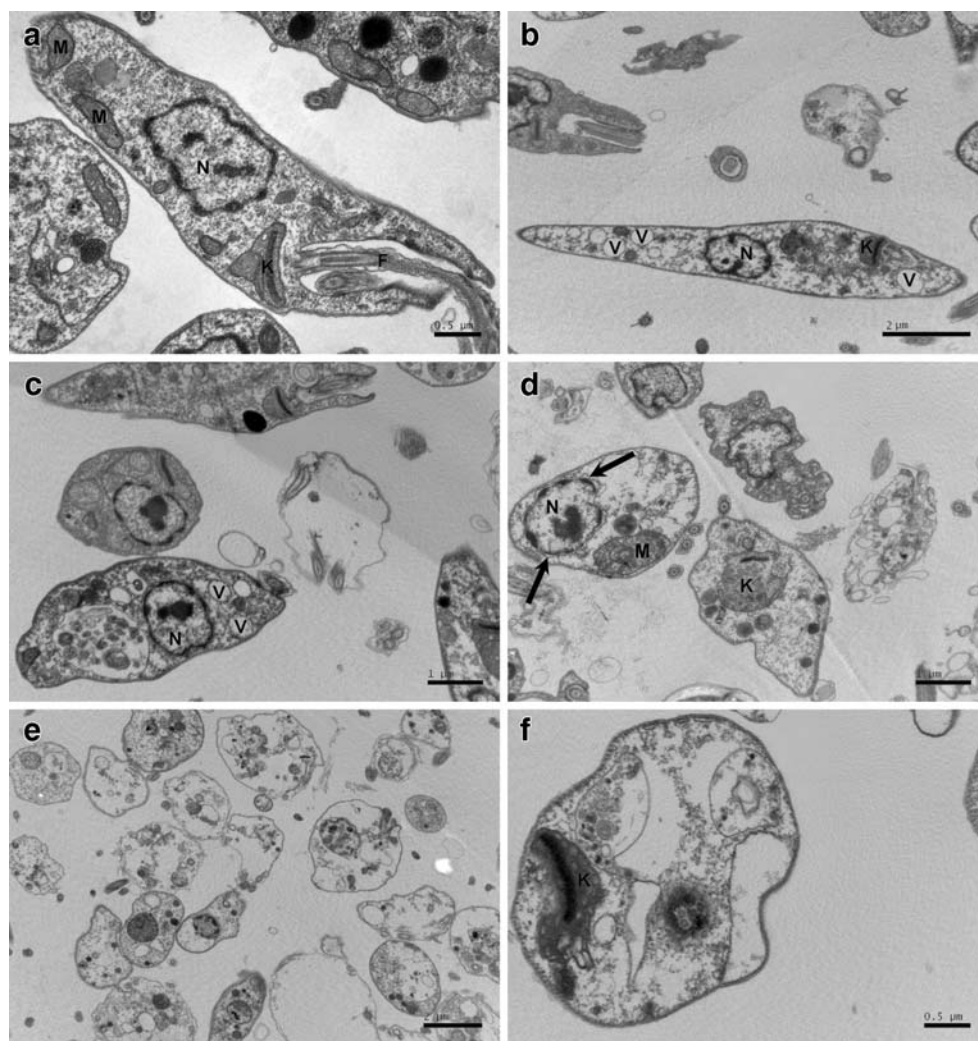
cytoplasmic organelles was only seen after a 26-h incubation with the drug (Fig. 4d, e). At this time point, a mitochondrial swelling was observed along with severe nucleus damage and detachment of the nuclear membrane (Fig. 4d, arrows). Despite the severe cellular damage, a lack of pore-forming activity at the plasma membrane was observed, which showed a conserved morphology. One hundred percent of the parasites were eradicated after a 40-h incubation with the drug (Fig. 4f).

NO production The capacity of FUZ to induce NO production was determined within peritoneal macrophages. NO up-regulation was not observed after a 24-h incubation with the drug; however, a decrease in NO production by 55% was observed in LPS-activated macrophages (Fig. 5).

Discussion

In this study, we determined the in vitro activity of FUZ on a panel of *Leishmania* spp. with an emphasis on *L. (L.) chagasi*, which is a Brazilian etiologic agent of VL. Promastigotes of *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, and *L. (L.) amazonensis* were sensitive to FUZ treatment. Additionally, FUZ had similar in vitro efficacy ($p<0.05$) compared to pentamidine on some species. A leishmanicidal effect was demonstrated by a lack of mitochondrial oxidation in the MTT assay. FUZ was 17-fold more effective than pentavalent antimony on *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes, demonstrating a potential in vitro activity against VL. FUZ proved to be slightly active on intracellular amastigotes from *Leishmania (L.) tropica* (Berman and Lee 1983), *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) enriettii*, and *L. (L.) major* (Neal et al. 1988); however, FUZ lacked parasite selectivity, resulting in a high degree of host cell toxicity. At FUZ concentrations

Fig. 4 Transmission electron microscopy of *L. (L.) chagasi* incubated with furazolidone. Promastigotes were incubated for various periods of time at 24°C. **a** Control group; **b** 12-h incubation; **c** 20-h incubation; **d** 26-h incubation; **e** 40-h incubation. *v* vacuoles, *mt* microtubules, *nm* nuclear membrane, *k* kinetoplast, *m* mitochondria, *n* nucleus, *f* flagellum, *l* lipid inclusion; **f** 40-h incubation



that eliminated 100% of amastigotes from the intracellular milieu of macrophages, no macrophage toxicity was detected as determined by mitochondrial oxidation using the MTT assay.

The ultrastructural studies of *L. (L.) chagasi* promastigotes corroborated the leishmanicidal activity of FUZ on *L.*

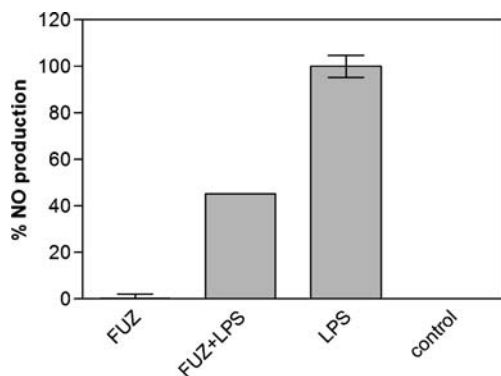


Fig. 5 Effects of nimodipine on macrophage nitric oxide (NO) production. The nitrite content was determined by the Griess reaction measured at 550 nm. LPS was used as control

(L.) chagasi, as determined by a completely altered morphology and loss of intracellular organelles. This suggests that the mitochondria and nuclear membrane of *Leishmania* are targets of FUZ, leading to parasite death. It was apparent that the antileishmanial activity of furazolidone is a time-dependent event and the initial damage to the parasite is a result of long-term incubation. Using the NO stimulation assay, a lack of NO generation was detected after a 24-h FUZ treatment, demonstrating that FUZ treatment kills intracellular parasites by a mechanism other than macrophage activation. This is promising information, suggesting a direct effect of FUZ on parasites. Macrophage activation via NO up-regulation is an important process to control intracellular pathogens (Moncada et al. 1991); drug candidates for VL should display specific activity against the parasite rather than merely activating macrophages. Clinical studies using macrophage-stimulating drugs such as interferons fail to treat VL when administered in combination with antimony (Sundar et al. 1997). In our study, FUZ treatment abolished 55% of LPS-induced macrophage activation, suggesting a possible “antiinflammatory”

mechanism. NO is normally produced by nitric oxide synthase (iNOS)-mediated oxidation of L-arginine by NADPH and O₂ and the subsequent formation of L-citrulline and NO (Moncada et al. 1991). Literature describing FUZ-mediated inhibition of iNOS activity is lacking. Despite this fact, we found no interference in the antiparasitic activity of FUZ against intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi*.

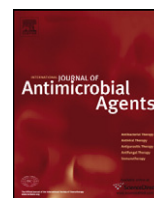
FUZ is commonly used as oral dosages for the treatment of intestinal giardiasis (Khaw and Panosian 1995). Its absorption, serum level, and metabolism are poorly studied. Because of the need for active antileishmanial agents, orally administered drugs are remarkable candidates to be tested in experimental models.

Acknowledgments This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) (550376/2007-0). We also thank the CNPq scientific research award given to AGT and the FAPESP scholarship given to JQR.

References

- Berman JD, Lee LS (1983) Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 32:947–951
- Desjeux P (1996) Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Derm* 14:417–423
- Desjeux P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:239–243
- Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF et al (1992) A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol* 16:475–482
- Giron Blanc JJ (1959) Treatment of vaginal trichomoniasis with furazolidone. *Tokoginecol Pract* 18:144–151
- Guerin PJ, Oliaro P, Sundar S et al (2002) Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis* 2:494–501
- Guslandi M (2001) Review article: alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 15:1543–1547
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199
- Khaw M, Panosian CB (1995) Human antiprotozoal therapy: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev* 8:427–439
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109–142
- Neal RA, van Bueren J, Hooper G (1988) The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 82:453–456
- Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S et al (1999) Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Lab Res* 29:122–127
- PubChem Compound (2010) Furazolidone. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>. PSJ Web. Accessed 11 Feb 2010
- Reimão JQ, Migotto AE, Kossuga MH et al (2008) Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. *Parasitol Res* 103:1445–1450
- Sartorelli P, Andrade SP, Melhem MS et al (2007) Isolation of antileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. *Phytother Res* 7:644–647
- Sundar S, Singh VP, Sharma S et al (1997) Response to interferon- γ plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 176:1117–1119
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP et al (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347:1739–1746
- Tada H, Shiho O, Kuroshima K et al (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93:157–165
- World Health Organization (1990) WHO Drug Information. WHO (Geneva) 4:184
- World Health Organization (2008) Magnitude of the problem. http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html. PSJ Web. Accessed 18 Aug 2008

ANEXO 5



Short communication

Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis

André Gustavo Tempone^{a,*}, Renato Arruda Mortara^b,
Heitor Franco de Andrade Jr^c, Juliana Quero Reimão^a

^a Laboratory of Applied Toxinology on Antiparasitic Drugs, Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo 355, 8^o andar, CEP 01246-000 São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, 6^o andar, 04039-02 São Paulo, SP, Brazil

^c Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Protozoologia, Universidade de São Paulo, Av. Dr Enéas de Carvalho Aguiar 470, 05603-000 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2010

Accepted 17 April 2010

Keywords:

Furazolidone

Leishmania

Therapy

Liposomes

Drug delivery

Biodistribution

ABSTRACT

Drug delivery systems are promising pharmaceutical formulations used to improve the therapeutic index of drugs. In this study, we developed a liposomal formulation of furazolidone that targets *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in a hamster model. Using laser scanning confocal microscopy, it was demonstrated that the liposomal drug co-localised with *L. (L.) chagasi* amastigotes within macrophages. Liposomal furazolidone administered intraperitoneally at 0.5 mg/kg for 12 consecutive days reduced spleen (74%) and liver (32%) parasite burden at a 100-fold lower dose than the free drug. Free furazolidone (50 mg/kg) also effectively reduced spleen (82.5%) and liver (85%) parasites; its in vitro activity against promastigotes and intracellular amastigotes demonstrated a high degree of parasite selectivity. Thus, furazolidone, both in the free and liposome-loaded formulation, is an effective inhibitor of *L. (L.) chagasi*, representing a possible cost-effective drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis.

© 2010 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease that afflicts 12 million people worldwide and can be fatal if individuals are infected with the visceral species. Traditional therapy is out-dated and ineffective, often resulting in intense adverse effects, relapses and the need for hospitalisation. Study of drugs that are already in clinical use for the treatment of other diseases could represent a cost-effective alternative for the treatment of neglected diseases. This is exemplified by the recent discovery of miltefosine, an oral anticancer drug with promising in vivo antileishmanial activity [1].

Furazolidone (FZ) is a synthetic nitrofurantoin derivative that is clinically used as an antibacterial and antiprotozoal agent. Its antileishmanial activity was previously reported by Berman and Lee in 1983 [2] and by Neal et al. in 1988 [3]. FZ has in vivo activity against a range of microorganisms including *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. [4] and *Giardia* [5]. Drug delivery systems such as liposomes have been developed to provide medical and pharmaceutical benefits for the treatment of diseases. These systems have improved therapy for some diseases, for example the treatment of leishmaniasis with liposomal amphotericin B [6]. Our previous in vitro work demonstrated that negatively

charged liposomes targeted to the parasitophorous vacuole, delivered antimony to amastigotes of *Leishmania (Leishmania) chagasi* inside macrophages [7]. In the present work, we studied the in vitro and in vivo efficacy of FZ against *L. (L.) chagasi* using a liposomal formulation of furazolidone (FZ-LP) to target the parasite in infected tissues.

2. Material and methods

2.1. Drugs and chemicals

Hydrogenated phospholipids were kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol, MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue] and RPMI 1640 medium without phenol red (RPMI-PR⁻ 1640) were purchased from Sigma (St Louis, MO). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) and fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). The pentavalent antimonial compound glucantime[®] was obtained from sanofi-aventis (São Paulo, Brazil) and pentamidine was from Sideron (São Paulo, Brazil).

2.2. Bioassay procedures

BALB/c mice and golden hamsters were supplied by the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil).

* Corresponding author.

E-mail address: atempone@ial.sp.gov.br (A.G. Tempone).

Animals were maintained in sterilised cages and were given water and food ad libitum. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission and in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

2.3. Parasite maintenance

Leishmania (L.) chagasi amastigotes (MHOM/BR/1972/LD) were isolated from golden hamsters no later than 60–70 days post infection [8].

2.4. Mammalian cells

Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of female BALB/c mice by washing with RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator.

2.5. Determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀)

The activity of FZ treatment on *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes was determined using previously infected macrophages [9]. Pentavalent antimony (Sb^v) was used as a standard drug. Test compounds were incubated for 120 h under the same conditions. Parasite burden was defined as the mean number of infected macrophages out of 600 cells (triplicate recordings). Data obtained represent the mean of two independent assays.

2.6. Cytotoxicity against mammalian cells

Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice in RPMI-PR-1640 medium. Cells were incubated with FZ at various concentrations (2.3–300 µg/mL) for 48 h at 37 °C. Pentamidine was used as the reference drug. Viability of the macrophages was determined using the MTT assay [10]. Data obtained represent the mean of two independent assays.

2.7. Furazolidone entrapment in liposomes

Liposomes were prepared by the lipid hydration method followed by extrusion through polycarbonate membranes [11]. For liposome preparation, saturated egg phosphatidylcholine, phosphatidylserine and cholesterol were used at a 7:2:1 molar ratio. For preparation of fluorescent liposomes, 100 µg of long-chain dialkyl-carbocyanines (DIL C18) was added to the lipid mixtures before drying. Untrapped material was separated from the liposomes by centrifugation (4000 × g for 15 min) and the final phospholipid concentration was determined by the Stewart assay [12]. The average diameter of the liposomes was determined by transmission electron microscopy. The concentration of encapsulated FZ was determined in a high-performance liquid chromatography (HPLC) binary system (Prominence LC-20; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) using an ultraviolet photodiode array detector SPD-M20A on a reverse phase ACE C18 column (4.6 mm × 250 mm, 5 µm particle size).

2.8. Biodistribution studies using laser scanning confocal microscopy

Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected with 1 × 10⁸ amastigotes of *L. (L.) chagasi* via the intraperitoneal (i.p.) route. Sixty days post infection, FZ-LP labelled with the fluorescent marker DIL C18 was injected (i.p., 300 µL/animal; n = 4) and animals were euthanised 7 h later. The spleen and liver were removed and fixed in 3.5% formaldehyde. After washing

with phosphate-buffered saline (PBS), they were permeabilised with a PGN solution (PBS, 0.2% gelatin and 0.15% NaN₃) containing 0.1% saponin and submitted to labelling. Samples were then incubated for 1 h with a polyclonal anti-*L. (L.) chagasi* (dog serum) antibody (diluted 1:50 in PGN) and washed three times with PBS. This was followed by incubation for 1 h with anti-dog immunoglobulin G (IgG) conjugated antibodies and with 10 µM DAPI to label DNA-rich structures. Finally, the samples were imaged on a Bio-Rad 1024-UV confocal system (Bio-Rad Hercules, CA) using a 100× 1.4 NA oil immersion objective with phase contrast. Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was used to analyse fluorescence intensity distributions, to adjust contrast or brightness of acquired images and to combine images. Sequential optical sections (z-series) were rendered using Voxx software (<http://www.nephrology.iupui.edu/imaging/voxx/>) or the surface-rendering module of Huygens Essential (<http://www.svi.nl>).

2.9. Experimental studies

The efficacy of FZ and FZ-LP treatment was determined using young male golden hamsters (ca. 140 g) previously infected (i.p. route) with *L. (L.) chagasi* amastigotes (1 × 10⁸/animal). Forty-five days after infection, the hamsters were treated intraperitoneally for 12 consecutive days with FZ, FZ-LP and Sb^v administered at 50 mg/kg, 0.5 mg/kg and 50 mg/kg, respectively (n = 6/group). The control group was treated with empty liposomes (without drug). FZ was diluted in Cremophor® EL containing 5% ethanol (no interference with the treatment could be detected in previous experimental assays). Animals were euthanised (58 days post infection) and spleen/liver infections were analysed by light microscopy using Giemsa-stained smears. The removed organs were weighed and compared with the untreated group. The number of amastigotes per 500 cell nuclei (liver and spleen) was determined and multiplied by the organ weight (mg) to obtain Leishman–Donovan units [13]. Two independent assays were performed to confirm the in vivo efficacy of FZ.

2.10. Statistical analysis

Data obtained represent the mean and standard deviation of duplicate or triplicate samples from two independent assays. IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose–response curves in GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and the 95% confidence intervals were included in parentheses. The Mann–Whitney test (unpaired two-tailed) was used for significance testing (P < 0.05) of parasitic burden and treatment.

3. Results

3.1. Antileishmanial activity and cytotoxicity assay of furazolidone

FZ treatment inhibited intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi* with an IC₅₀ value of 1.58 µg/mL. Glucantime was used as a reference drug and resulted in an IC₅₀ of 27.28 µg/mL. The cytotoxicity assay demonstrated that high concentrations of FZ were toxic to peritoneal macrophages after a 48 h period of incubation, resulting in an IC₅₀ value of 13.45 µg/mL (Table 1).

3.2. Biodistribution of liposomal furazolidone in infected hamsters

FZ was loaded into phosphatidylserine liposomes and labelled with the fluorescent marker DIL C18. FZ-LP was found in the spleen (Fig. 1A) and liver (Fig. 1C) of *L. (L.) chagasi*-infected hamsters 7 h post infection. The in vivo co-localisation of FZ-LP and *L. (L.)*

Table 1
In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of furazolidone (FZ)^a.

Drug	IC ₅₀ (95% CI) (μg/mL)	
	<i>L. (L.) chagasi</i>	THP-1 toxicity
FZ	1.58 (1.51–1.66)	13.45 (11.49–15.75)
Pentamidine	N/D	8.72 (7.24–10.52)
Sb ^v	27.28 (25.7–28.8)	>500

IC₅₀, 50% inhibitory concentration; CI, confidence interval; N/D, not determined; Sb^v, pentavalent antimony.

^a Viability of cells was determined by the colorimetric MTT assay measured at 550 nm.

chagasi amastigotes inside macrophages of the spleen (Fig. 1B, arrow) and liver (Fig. 1D, arrow) was also observed (Supplementary Fig. 1); the blue fluorescence corresponds to spleen or liver cell nuclei.

3.3. Experimental in vivo treatment

Free FZ was effective against *L. (L.) chagasi* (Table 2), reducing the parasite burden by 82.5% in the spleen ($P < 0.05$) and 85% in the liver ($P < 0.05$) at a dose of 50 mg/kg. The reference drug Sb^v was also tested in a treated control group, which resulted in a reduction in parasite burden by 95% ($P < 0.05$) and 92% ($P < 0.05$) in the spleen and liver, respectively. FZ-LP eliminated 74% of spleen ($P < 0.05$) and 32% of liver ($P > 0.05$) parasite burden at 0.5 mg/kg.

3.4. Encapsulation efficiency, size and lipid quantification

Physicochemical parameters of liposomes were evaluated following drug entrapment. FZ was entrapped in liposomes and resulted in a considerable encapsulation efficiency of 84.9%. As determined by HPLC analysis, the maximum FZ concentration in liposomes was 250 μg/mL. The lipid content was determined by the colorimetric Stewart assay; the formulation had a mean of 15.5 mg/mL phospholipids. Finally, FZ-LP was negatively stained and the mean diameter was analysed by transmission electron microscopy. It was determined that FZ-LP had an internal mean diameter of 149 nm with a multilamellar aspect (data not shown).

4. Discussion

In this study, we demonstrated that a novel liposomal formulation of furazolidone (FZ-LP) targets the intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi*. Preliminary data demonstrated that FZ has in vitro activity against intracellular amastigotes and is 17-fold more effective than treatment with Sb^v, suggesting a potential use for this drug against *L. (L.) chagasi*. The first description of the anti-*Leishmania tropica* activity of FZ (IC₅₀ = 0.53 μg/mL) was reported in 1983 by Berman and Lee [2]. Neal et al. [3] reported that FZ was not selective against the intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) enriettii* and *Leishmania (L.) major*, as the potential antiparasitic effect was observed at a concentration that was highly toxic to host cells. In our assay, the in vitro

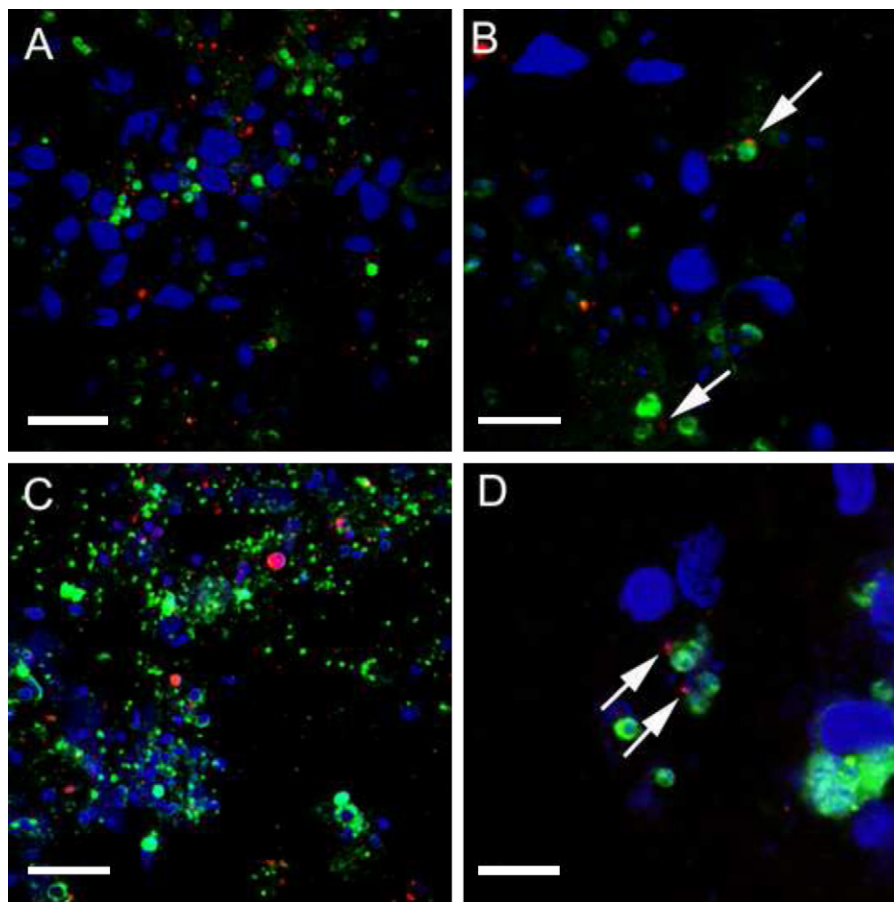


Fig. 1. Single optical section image acquired using a confocal microscope. Distribution of long-chain dialkylcarbocyanine (DILC18)-labelled liposomes containing furazolidone in spleen smears of *Leishmania (Leishmania) chagasi*-infected hamsters. Sixty days post infection, the spleen and liver were removed and were submitted to immunofluorescence analysis. (A) Spleen: view of a typical field. Parasites labelled with a polyclonal anti-*L. (L.) chagasi* (dog serum) antibody (green) and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (nuclei and kinetoplasts; blue). DIL-labelled liposomes appear in red. (B) Higher magnification of the field shown in (A). (C) Liver. (D) Higher magnification of the field shown in (C). Arrows in (B) and (D) indicate liposomes next to amastigotes. Bars: A, 20 μm; B, 10 μm; C, 50 μm; and D, 10 μm.

Table 2
Experimental in vivo treatment of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* for 12 consecutive days.

Drug	Dose	Spleen		Liver	
		Parasite burden (LDU) [mean (S.E.M.)]	% reduction in parasite burden ^a	Parasite burden (LDU) [mean (S.E.M.)]	% reduction in parasite burden ^a
FZ	50 mg/kg i.p.	84.94 (11.48)	82.5	379.85 (202.99)	85.0
FZ-LP	0.5 mg/kg i.p.	126.09 (58.72)	74.1	1710.67 (711.44)	32.3
Glucantime (Sb ^v)	50 mg/kg i.p.	24.46 (26.63)	95.0	191.73 (179.70)	92.4
Control (drug-free liposomes)	–	486.05 (98.08)	0	2526.16 (830.47)	0

FZ, furazolidone; FZ-LP, liposomal furazolidone; Sb^v, pentavalent antimony; i.p., intraperitoneal; LDU, Leishman–Donovan units; S.E.M., standard error of the mean.

^a Compared with control hamsters.

correlation between antileishmanial activity and mammalian toxicity [Selectivity Index (SI)] was 8.5 for FZ based on the activity against *L. (L.) chagasi* amastigotes. These differences in drug effectiveness may be explained by the variability in drug susceptibility among *Leishmania* species, which would alter the SI of a particular drug.

Owing to the promising in vitro activity against *L. (L.) chagasi*, FZ was entrapped in liposomes containing phosphatidylserine and was labelled with the hydrophobic fluorescent marker DIL C18, a high-affinity probe for liposome membranes. When administered to *L. (L.) chagasi*-infected hamsters, FZ-LP was distributed to primary target tissues such as the liver and spleen. Using laser scanning confocal microscopy, co-localisation of FZ-LP with *L. (L.) chagasi* amastigotes within macrophages was demonstrated, suggesting that this formulation of liposomes could be a promising drug delivery system. This is the first description of a liposomal formulation of FZ and its in vivo delivery to intracellular amastigotes of *Leishmania* in mammalian tissues. The small size of the liposomes and the inclusion of the negatively charged phosphatidylserine might influence the targetability of FZ-LP, possibly resulting from the ligand-binding properties of macrophage scavenger receptors (SRs). Our previous in vitro work demonstrated that phosphatidylserine-based liposomes targeted intracellular *L. (L.) chagasi* amastigotes via SRs in macrophages to deliver high amounts of Sb^v [7]. SRs are abundantly expressed in macrophages and liver endothelial cells and represent attractive candidates for mediating the binding and intracellular uptake of liposomes containing negatively charged phospholipids owing to their broad ligand specificity for polyanionic compounds [14]. It has been shown that *Leishmania*-infected macrophages upregulate the SRs CD36, SRB-1 and MARCO and, consequently, could represent a promising target for phosphatidylserine liposomes [7]. It has also been reported that the reticuloendothelial system, similar to the liver, may act as a macrophage depot system for nanoparticles and may slowly release nanoparticle-incorporated drugs into the systemic circulation [15]. Owing to the nanoscale diameter of FZ-LP, this may be advantageous for treatment.

Based on the biodistribution of FZ-LP and the potential in vitro activity of the free drug, an experimental study using a hamster model was performed. The in vivo data demonstrated for the first time that free FZ was effective against *L. (L.) chagasi* at treatment levels comparable with Sb^v. Furthermore, treatment with FZ-LP resulted in a considerable reduction of the spleen parasite burden and, to a lesser extent, the liver burden when administered at a 100-fold lower dose than free FZ. The efficacy is comparable with the effects of free FZ on the spleen; no significant difference between the two treatments was observed ($P > 0.05$). This result corroborates the observed targetability of the liposomal formulation, which improves the efficacy of FZ. The inability of FZ-LP to eliminate parasites in the liver may be a result of insufficient drug accumulation in this organ, which was confirmed by confocal microscopy. Despite the considerable FZ entrapment in liposomes, a limit of 250 µg/mL was achieved for each batch using the lipid hydration method, thus

limiting the amount of drug administered to animals (maximum of 300 µL/animal). Future experimental assays should test higher doses of FZ-LP (>0.5 mg/kg), other dose regimens (>12 days) and different administration routes (intramuscular, intravenous, subcutaneous).

In conclusion, these data suggest that FZ-LP may be an effective drug candidate for inhibition of *L. (L.) chagasi*. Despite the extensive clinical use of FZ to treat other pathologies, toxicological studies are mandatory to assess the safety of this novel formulation of liposomes. Additionally, FZ may represent a cost-effective alternative for the chemotherapy of visceral leishmaniasis.

Acknowledgments

The authors thank Dr Roberto M. Hiramoto for the kind donation of dog sera, and Ms Matilia A. Nascimento and Mr Vicente Duarte for technical assistance. They also thank the CNPq fellowships given to AGT and to RAM.

Funding: This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) (550376/2007-0) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (2008/09260-7).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: All animal experiments were conducted under the license of and in accordance with the Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brazil).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.04.006.

References

- Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:1041–7.
- Berman JD, Lee LS. Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:947–51.
- Neal RA, van Bueren J, Hooper G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 1988;82:453–6.
- Llovet T, Sánchez F, Mirelis B, Prats G. Sensitivity of enteropathogenic bacteria to furazolidone. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990;8:449–52.
- Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2:529–41.
- Nicoletti S, Seifert K, Gilbert IH. *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide–amphotericin B (HPMA-AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:441–8.
- Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, Andrade HFJ. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:60–8.
- Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool* 1958;5:269–73.
- Sartorelli P, Andrade SP, Melhem MS, Prado FO, Tempone AG. Isolation of antileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. *Phytother Res* 2007;7:644–7.

- [10] Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986;93:157–65.
- [11] Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;75:4194–8.
- [12] Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem* 1980;104:10–4.
- [13] Bradley DJ, Kirkley J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin Exp Immunol* 1977;30:119–29.
- [14] Helming L, Winter J, Gordon S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J Cell Sci* 2009;122:453–9.
- [15] Zolnik BS, Sadrieh N. Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:422–7.

ANEXO 6



Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure–activity relationship study

Juliana Q. Reimão^a, Marcus T. Scotti^b, André G. Tempone^{a,*}

^aLaboratory of Applied Toxinology on Antiparasitic Drugs, Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 351, 8° andar, Cerqueira Cesar, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil

^bCenter of Applied Sciences and Education, Federal University of Paraíba, Campus IV, Rio Tinto, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2010

Revised 2 September 2010

Accepted 7 September 2010

Available online 15 September 2010

Keywords:

Leishmania

Trypanosoma cruzi

1,4-Dihydropyridines

QSAR

ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas' disease constitute a relevant health and socio-economic problem in Latin America, Africa, and Asia. The therapeutic interventions rely on inefficient and highly toxic drugs with systemic side effects in patients. Considering the multiple biological activities of the calcium channel blockers and the high versatility of 1,4-dihydropyridines, eight clinically used 1,4-dihydropyridines (azelnidipine, amlodipine, cilnidipine, lercanidipine, nicardipine, nifedipine, nimodipine and nitrendipine) were in vitro tested against *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* parasites, and their cytotoxicity was tested against mammalian cells. In addition, a QSAR study was performed in order to delineate further structural requirements for the anti-protozoan activity and to predict the biological potency of 1,4-dihydropyridines. The tested compounds were effective against *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) chagasi*, and *Leishmania (L.) major* promastigotes, *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes with 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values in the range of 2.6–181 μM. The QSAR provided useful information about the structural features of the anti-protozoan activities, including diphenylpropyl and diphenylmethylazetidid groups at position 4 of the 1,4-dihydropyridine ring, allowing the prediction of two novel potential anti-protozoan analogs.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

American Trypanosomiasis (Chagas' disease) and Leishmaniasis (Kala-azar) are widespread protozoan diseases that affect mostly poor and marginal populations in Latin America, Africa, and Asia. Neglected by big pharmaceutical companies, the chemotherapy of both diseases involves highly toxic drugs, and in the case of Chagas' disease, an inefficient therapy. Therefore, there is still an urgent need for novel drug candidates in the interest of public health.

Calcium channel blockers are a class of drugs with a selective inhibition of calcium influx through cell membranes, releasing and binding calcium in intracellular pools. These have been widely used in the therapy of hypertension, cerebrovascular spasms, and other pathogenesises.¹ Calcium channel blockers have been considered promising anti-parasitic candidates, and can partially reverse multidrug resistance, presumably by increasing cellular drug accumulation.^{2,3} This effect was observed with drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*,⁴ *Leishmania donovani*, and *Trypanosoma cruzi*.^{5,6} Additionally, the 1,4-dihydropyridines amlodipine and lacidipine have been shown to successfully inhibit *L. donovani*

in vitro infection and in BALB/c mice.⁷ Furthermore, nimodipine was in vitro effective against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) chagasi*, resulting in strong ultrastructural damage to the mitochondria and plasma membrane.⁸

The physicochemical properties and biological activity of organic compounds depend on their molecular structures. With the purpose of obtaining relationships between chemical structures and biological activities by using computational approaches, it is necessary to find appropriate representations of the molecular structure of the compounds.⁹ The encoded information of a molecular descriptor depends on the kind of molecular representation that is used and the defined algorithm for its calculation. Simple molecular descriptors derived from the counting of atom types or structural fragments in the molecule, and others derived from algorithms applied to a topological representations (molecular graphs), are usually called topological or 2D-descriptors. Others molecular descriptors derived from a geometrical representation are called geometrical or 3D-descriptors.⁹ Graph-theoretical methods have been very useful in quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies in order to perform rational analysis of biological activities.¹⁰ This method allows structural information to be codified and expressed in numbers. Thus, graph-based molecular descriptors have proven to be very efficient in drug design.¹¹ Many works using graph-theoretical approaches have

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3068 2991.

E-mail address: atempone@ial.sp.gov.br (A.G. Tempone).

been reported for the design of new drugs, to control toxicity parameters and to find common structural patterns of known drugs. The successful design of drugs like analgesics,¹² anti-virals,¹³ anti-bacterials,¹⁴ and anti-mycobacterials¹⁵ have been reported using this method.

In the present study, eight clinically used 1,4-dihydropyridines were in vitro tested against *Leishmania* and *T. cruzi* parasites, and their cytotoxicity was tested against mammalian cells. In addition, a QSAR study was performed in order to delineate further structural requirements for the anti-protozoan activity and to predict the biological activity of 1,4-dihydropyridines.

2. Results and discussion

2.1. Anti-parasitic activity and mammalian cytotoxicity

The serial dilution of the 1,4-dihydropyridines (Fig. 1 compounds 1–8) and standard drugs allowed determination of the IC₅₀ values after cellular viability detection using the oxidative mitochondrial system, as shown in Table 1. The 1,4-dihydropyridines were active against the promastigotes and amastigotes of *L. (L.) chagasi*, the Visceral Leishmaniasis agent in Latin America. Based on the sigmoidal dose–response curves, we obtained IC₅₀ values in the range of 2.61–146.41 μM after 24 h of incubation with *L. (L.) chagasi* promastigotes. The activity of the tested compounds against intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi* resulted in IC₅₀ values close to promastigotes, in the range of 5.35–

176.24 μM, confirming the anti-leishmanial activity of these compounds. Pentavalent antimony was used as a reference drug and gave an IC₅₀ value of 82.32 μM against intracellular amastigotes. In addition, this is the first description of amlodipine activity against *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* and *Leishmania (L.) major*. In a previous work, amlodipine demonstrated in vitro and in vivo activity against *L. (L.) donovani*, the Indian agent of kala-azar, with a promising oral effect at 10 mg/kg in a hamster model.⁷ Despite the use of amlodipine in the treatment of hypertension and angina, the in vitro inhibition of cancer cells^{16,17} and a strong antimicrobial activity¹⁸ have also been reported, showing the versatility of this compound.

In our model, it was not possible to evaluate the IC₅₀ value of azelnidipine on intracellular amastigotes due to the low selectivity (the IC₅₀ against amastigotes is very close to the IC₅₀ against mammalian cells). The tested compounds were also effective against *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*, the most important Cutaneous Leishmaniasis agents in Brazil, with IC₅₀ values in the range of 2.93–128.16 μM against promastigotes. Likewise, the tested compounds were effective against *L. (L.) major*, an agent of Cutaneous Leishmaniasis in the Old World, with IC₅₀ values in the range of 3.35–181.09 μM. Pentamidine was used as a standard drug in the promastigotes assay and gave IC₅₀ values in the range of 0.15–1.11 μM.

In order to study the effectiveness of calcium channel blockers against *T. cruzi*, trypomastigote forms were incubated with the test compounds for 24 h, resulting in promising IC₅₀ values, as shown

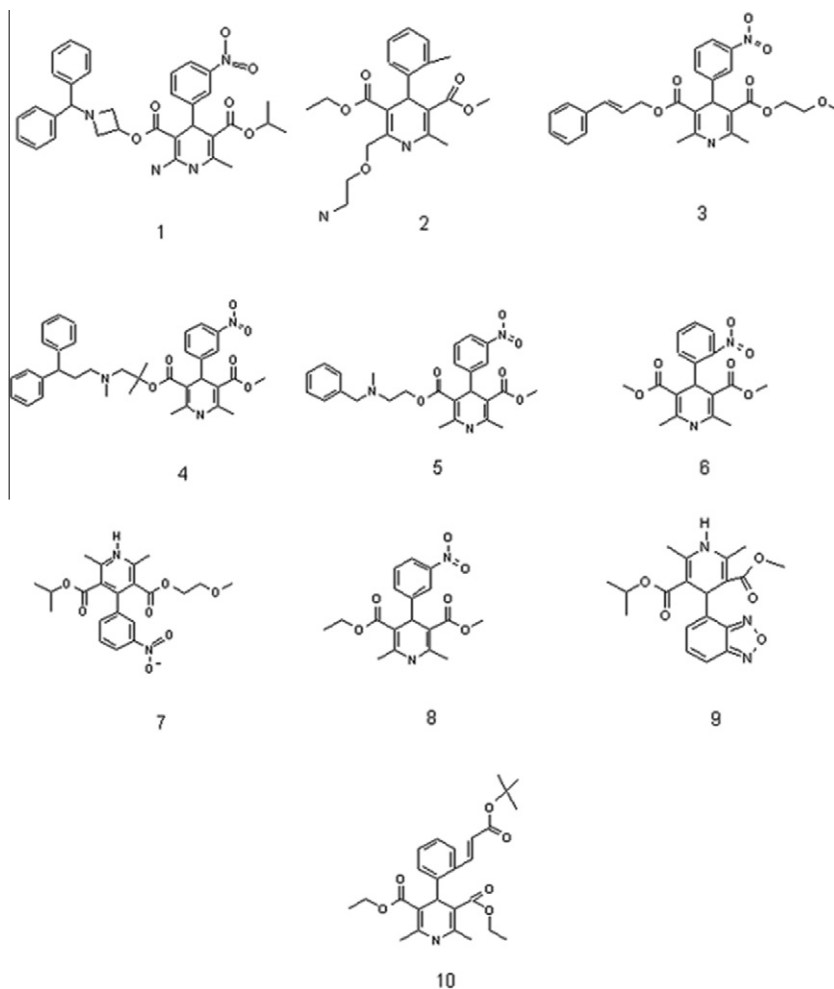


Figure 1. 1,4-Dihydropyridine chemical structures. Compound 1: azelnidipine; 2: amlodipine; 3: cilnidipine; 4: lercanidipine; 5: nicardipine; 6: nifendipine; 7: nimodipine; 8: nitrendipine; 9: isradipine; 10: lacidipine.

Table 1
Effect of 1,4-dihydropyridines on parasites and mammalian cytotoxicity

Drug	IC ₅₀ (μM)						
	<i>L. (L.) chagasi</i> promastigotes	<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotes	<i>L. (L.) major</i> promastigotes	<i>L. (V.) braziliensis</i> promastigotes	<i>T. cruzi</i> trypomastigotes	LLC-MK2 cytotoxicity
Azelnidipine	33.39 ± 7.91	nd	20.54 ± 5.76	17.06 ± 2.28	13.67 ± 1.15	2.90 ± 0.13	33.48 ± 0.15
Amlodipine	2.61 ± 0.22	5.35 ± 1.03	2.93 ± 0.39	3.35 ± 1.17	3.13 ± 0.3	8.07 ± 0.66	70.82 ± 30.62
Cilnidipine	33.01 ± 7.13	28.42 ± 1.99	110.67 ± 19.47	21.44 ± 1.34	15.26 ± 0.49	5.62 ± 1.28	221.51 ± 34.54
Lercanidipine	19.17 ± 2.42	10.36 ± 0.25	16.95 ± 2.44	11.55 ± 1.12	10.33 ± 1.12	8.43 ± 3.05	434.99 ± 29.67
Nicardipine	35.66 ± 1.06	22.00 ± 1.04	26.50 ± 2.73	21.83 ± 2.39	19.08 ± 3.2	10.59 ± 0.44	71.59 ± 10.44
Nifedipine	146.41 ± 28.04	176.24 ± 6.68	117.89 ± 11.16	181.09 ± 53.78	95.74 ± 10.59	101.75 ± 17.7	588.73 ± 255.64
Nimodipine	82.68 [*] ± 30.43	21.62 [*] ± 7.97	128.16 [*] ± 56.89	31.04 [*] ± 7.18	42.80 ± 1.05	32.31 ± 4.92	96.19 [*] ± 0.32
Nitrendipine	64.13 ± 17.71	43.84 ± 0.92	38.32 ± 6.66	33.27 ± 2.94	39.04 ± 5.76	26.88 ± 3.57	137.72 ± 10.75
Pentamidine	1.11 ± 1.03	nd	0.49 ± 0.05	0.47 ± 0.11	0.15 ± 0.17	nd	25.61 ± 3.99
Glucantime	nd	82.32 ± 3.22	nd	nd	nd	nd	>1366
Benznidazole	nd	nd	nd	nd	nd	172.37 ± 99.13	>1366

IC₅₀: inhibitory concentration 50%; ±: standard error; nd: not determined.

^{*} Data from Tempone et al.⁸

in Table 1. The IC₅₀ values ranged from 2.9 to 101.75 μM, suggesting that *T. cruzi* parasites are more susceptible to calcium channel blockers than *Leishmania* parasites. In a previous work, the activity of the 1,4-dihydropyridines lacidipine (IC₅₀ value of 33.5 μM) and isradipine (IC₅₀ value of 20.8 μM) were demonstrated against *T. cruzi* epimastigotes, resulting in inhibition of the respiratory

Table 2
Selectivity Index (SI) of 1,4-dihydropyridines, given by the ratio between the cytotoxicity toward LLC-MK2 cells and the anti-parasitic activity

Drug	SI	
	<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	<i>T. cruzi</i> trypomastigotes
Azelnidipine	nd	11.54
Amlodipine	13.24	8.77
Cilnidipine	7.79	39.41
Lercanidipine	41.99	51.6
Nicardipine	3.25	6.76
Nifedipine	4.21	5.78
Nimodipine	4.45 [*]	2.98
Nitrendipine	3.14	5.12

nd: not determined.

^{*} Data from Tempone et al.⁸

chain.¹⁹ All tested compounds were considerably more effective against *T. cruzi* than the standard drug benznidazole, which showed an IC₅₀ value of 172.37 μM. Our assays demonstrated that 1,4-dihydropyridines presented significant activity against *T. cruzi* trypomastigotes, suggesting the potential activity of these calcium antagonists as anti-parasitic candidates.

In order to study the selectivity of 1,4-dihydropyridines against the tested parasites, an in vitro cytotoxicity assay using mammalian cells was carried out for 48 h. It showed IC₅₀ values in the range of 33.48–588.73 μM against *Rhesus* monkey kidney cells (LLC-MK2). Pentamidine presented an IC₅₀ value of 25.61 μM and was considerably more toxic than the tested 1,4-dihydropyridines. Selectivity is a relevant characteristic for defining lead molecules.²⁰ Therefore, the Selectivity Index (SI) was used to compare the toxicity for LLC-MK2 cells and the activity against the parasites (Table 2). The 1,4-dihydropyridines demonstrated SI values ranging from 3.12 to 41.99 for *L. (L.) chagasi* amastigotes and from 2.98 to 39.41 for *T. cruzi* trypomastigotes. For both parasites, the highest SI was found for lercanidipine, which is a promising lead molecule for future drug design studies. As a complementary cytotoxicity parameter, the hemolytic activity was also determined using mice erythrocytes, and the 1,4-dihydropyridines showed a lack of hemolytic activity at the highest concentration of 50 μM.

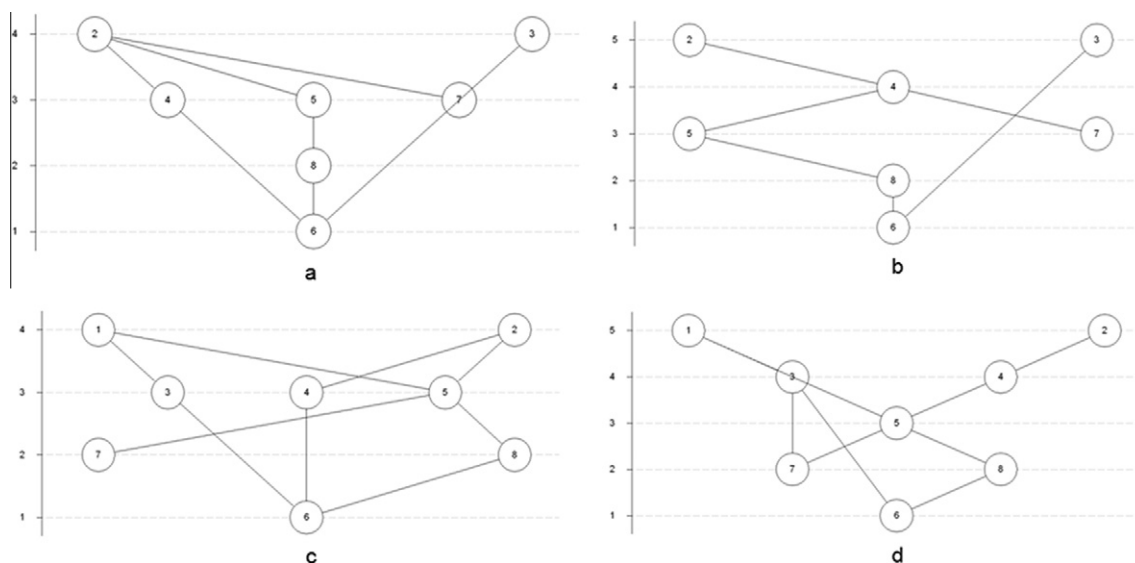


Figure 2. Hasse diagrams: (a) for mammalian cytotoxicity and anti-parasitic activities excluding the compound azelnidipine (1); (b) for only anti-parasitic activities excluding the compound azelnidipine (1); (c) for mammalian cytotoxicity and anti-parasitic activities excluding the activity against *L. (L.) chagasi* amastigotes; (d) for only anti-parasitic activities excluding the activity against *L. (L.) chagasi* amastigotes.

Nimodipine is clinically used to treat ischemic damage caused by cerebral arterial spasm in subarachnoid hemorrhage.²¹ In previous work, nimodipine showed a selective effectiveness against promastigotes, intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi* and promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major*.⁸ In the present work, nimodipine demonstrated a promising anti-parasitic effect against *T. cruzi* and *L. (V.) braziliensis*, confirming the in vitro potential of this compound.

2.2. Analysis of 1,4-dihydropyridine activities (QSAR)

The Hasse diagrams and PCA analyses made it possible to separate the compounds into sets. The first Hasse diagram (Fig. 2a—for all activities, without compound 1) showed that 2 and 3 were the most active compounds; 4, 5, and 7 were on the second level, and 8 and 6 were the least active compounds. Therefore, the chain was $2 \geq 5 \geq 8 \geq 6$, $2 \geq 4 \geq 6$, $2 \geq 7$, and finally, $3 \geq 6$. Compounds

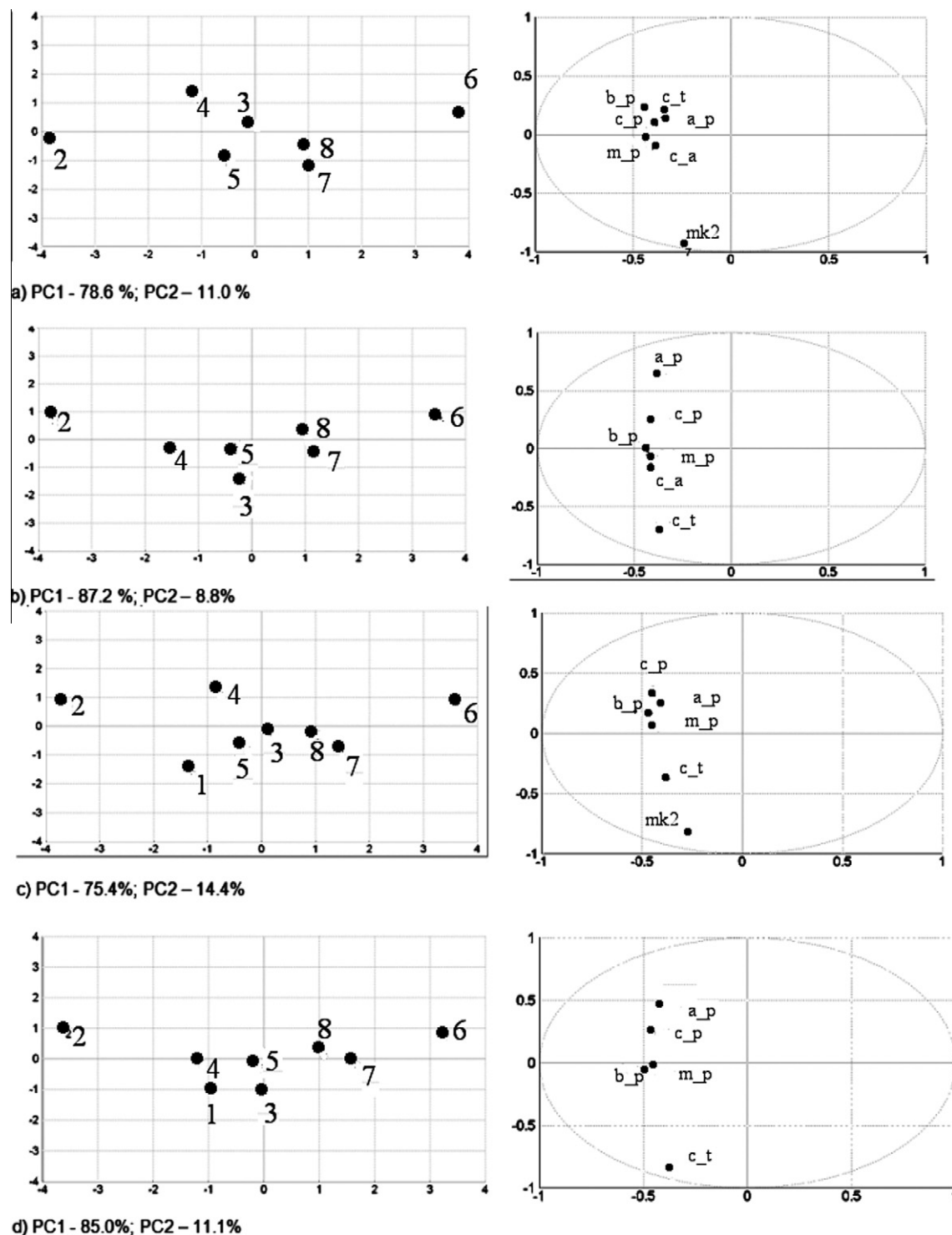


Figure 3. Scores plot (left side) and respective loadings (right side) and values of explained variance by principal components: (a) for all activities excluding azelmidipine (1); (b) for anti-parasitic activities excluding azelmidipine (1); (c) for all compounds without *L. (L.) chagasi* amastigotes; (d) for anti-parasitic activity for all compounds without *L. (L.) chagasi* amastigotes. Biological activity labels: c_p = *L. (L.) chagasi* promastigotes; c_a = *L. (L.) chagasi* amastigotes; a_p = *L. (L.) amazonensis* promastigotes; m_p = *L. (L.) major* promastigotes; b_p = *L. (V.) braziliensis* promastigotes; c_t = *T. cruzi* trypomastigotes; mk2 = LLC-MK2 cytotoxicity.

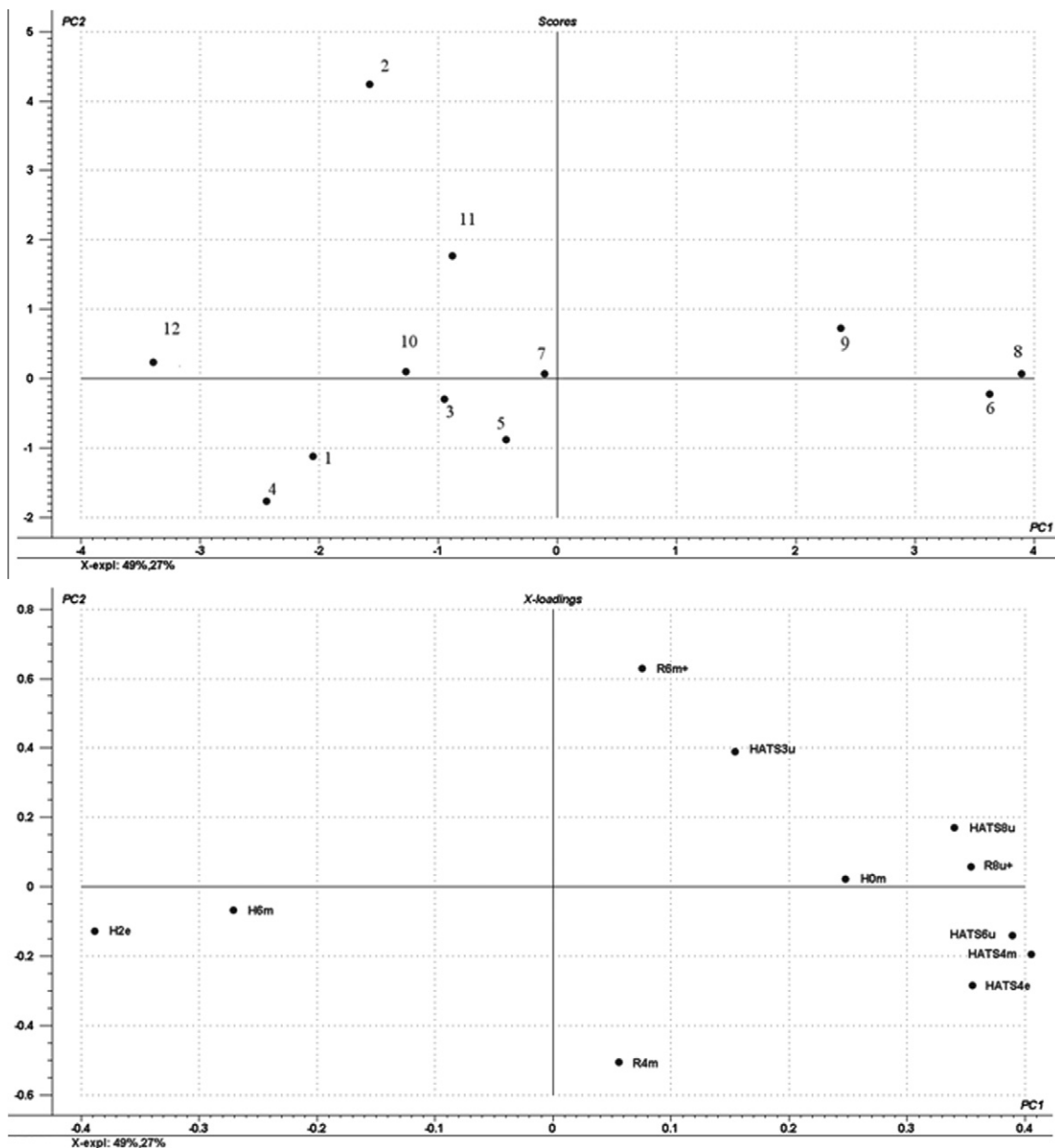


Figure 4. Scores plot (left side) and respective loadings (right side) and values of explained variance by principal components for the compound training set (compounds 1–8), isradipine and lacidipine (compounds 9 and 10) and new designed 1,4-dihydropyridine analogues (compounds 11 and 12) using the selected GETAWAY descriptors with equations 1–7.

Table 4). Amlodipine (2), which was the most active molecule among the tested 1,4-dihydropyridines, showed the lowest value of HATS4m, while nifedipine (6) and nitrendipine (8) presented the highest values.

Equation 4 was generated using pIC_{50} values against *L. (L.) major* promastigotes. This equation showed H0m (positive contribution) and was discussed in equation 3. It was an H index autocorrelation of lag 0 weighted by atomic mass. As explained before, it provided information on autocorrelation over the single atoms. Nifedipine (6) showed the smallest value of H0m, was the least active compound and was the only one with a nitro group on the benzene ring at the ortho position. HATS4m (negative contribution) was a leverage-autocorrelation of lag 4 weighted by the atomic masses and was highly correlated ($r = 0.96$ —Table 4) with HATS4e. Nifedipine (6) and nitrendipine (8) showed the largest values of HATS4m. Amlodipine (2), the most active compound, showed the smallest value of this descriptor. This higher value of R6m⁺ for amlodipine

was overstated due to the chlorine atom, which had a topological distance of 6 relative to the carboxyl oxygen.

Equation 5 was obtained using pIC_{50} values against *L. (V.) braziliensis* promastigotes. HATS8u (negative contribution) was a leverage-unweighted autocorrelation of lag 8 and was correlated with H2e ($r = -0.89$; see Table 4). Nifedipine (6) and nitrendipine (8) showed the largest values of this descriptor, and amlodipine (2) presented a value of R6m⁺ (positive contribution). This higher value of R6m⁺ for amlodipine was overstated due to the chlorine atom, which had a topological distance of 6 relative to the carboxyl oxygen.

R8u⁺ (negative contribution) was the only selected descriptor from equation 6, which was generated using pIC_{50} values against *T. cruzi* trypomastigotes and was the maximal contribution to the autocorrelation at lag 8 that was unweighted with respect to the influence/distance matrix R. This descriptor was highly correlated with HATS8u ($r = 0.92$). Azelnidipine (1) showed lower values of

this descriptor and nifedipine (**6**) showed the largest value, as observed in equation 3.

The model generated from the cytotoxicity pIC_{50} values against LLC-MK2 cells showed only positive contributions of descriptors HATS3u, H2e. HATS3u was uncorrelated with all other descriptors selected by the seven generated equations ($r < 0.7$ —Table 4). Lercanidipine (**4**), which was the least cytotoxic compound, presented the smallest value of HATS3u. Amlodipine (**2**), azelnidipine (**1**), nicardipine (**5**), and nimodipine (**7**) showed higher values of HATS3u and H2e. H2e was an electronic descriptor, but was highly correlated with others steric indexes as HATS6u, HATS8u, and HATS4m ($r > 0.88$; Table 4).

The variables selected in all equations were used to perform a PCA to analyze the distributions in two dimensions and verify relationships according to the physicochemical features encoded by selected descriptors and their activities. In this step, two other 1,4-dihydropyridines, isradipine (3-*O*-methyl-5-*O*-propan-2-yl-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) and lacidipine (diethyl-2,6-dimethyl-4-[2-[(*E*)-3-[(2-methylpropan-2-yl)oxy]-3-oxoprop-1-enyl]phenyl]-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), were selected from the literature. In vivo activity of lacidipine (**10**) against *L. (L.) donovani*⁷ and in vitro activity of isradipine (**9**) against *T. cruzi* epimastigotes¹⁹ has been reported.

The first two principal components, generated using the 11 descriptors selected by the seven equations, explained 76% of the total variance (PC1—49% and PC2—27%). Analyzing both plots, scores and loadings, it was possible to visualize the similarity among the compounds and their activities. Azelnidipine (**1**) and lercanidipine (**4**) were positioned close to the left side on the horizontal axis (first component). Both compounds showed almost the same similarity when comparing the Hasse diagrams in Figure 2 and the PCA scores plots in Figure 3. Regarding their activities, the substantial differences between these molecules was that azelnidipine (**1**) was the most cytotoxic against mammalian cells and the most active against *T. cruzi*. The scores plot in Figure 4 could not differentiate between the compounds when one considered their cytotoxicity, but it was clear that the first component discriminated the 1,4-dihydropyridines with respect to their anti-leishmanial activity.

Cilnidipine (**3**) and nicardipine (**5**) presented the same behavior, but it is important to highlight that cilnidipine (**3**) demonstrated a higher anti-trypanosomal activity but lower cytotoxicity than nicardipine (**5**). Thus, amlodipine (**2**) was the most active against *Leishmania* and azelnidipine (**1**) was the most cytotoxic compound. Both compounds could be considered more active than nimodipine

(**7**), which was positioned next to the center of the plot. Nifedipine (**6**) and nitrendipine (**8**) were located in the second and first quadrants, which could be considered to contain less active compounds.

Amlodipine (**2**) was positioned on the left-up side of the third quadrant, away from the active and inactive compounds. Therefore, amlodipine was an outlier, probably because this was the only compound with chloride atom on the phenyl group at the para position and a 2-aminoethoxymethyl at position 6 of the dihydropyridine fragment. In our analysis, isradipine (**9**) was located in the first quadrant close to the inactive compounds nifedipine (**6**) and nitrendipine (**8**) against *Leishmania*. Lacidipine (**10**) was close to nimodipine (**7**), a more active compound than nifedipine (**6**); consequently, this compound might be more active than isradipine (**9**).

We designed two new 1,4-dihydropyridines analogues (Fig. 5) using the analysis obtained by QSAR equation and PCA with the selected descriptors. The compounds (*S*)-3-ethyl 5-methyl 2-((2-aminoethoxy)methyl)-1,4-dihydro-4-(3-nitrophenyl)pyridine-3,5-dicarboxylate (**11**) and (*S*)-3-[2,2-dimethyl-3-(methyl-phenyl-amino)-propyl]-5-methyl-2-((2-amino-ethoxymethyl)-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3,5-dicarboxylate (**12**) were inserted in PCA analysis (Fig. 4) and were located in the second quadrant. The compound **12** was in an opposite position of nifedipine (**6**) and nitrendipine (**8**), which were inactive molecules on the first component. The pIC_{50} anti-protozoan values generated using equations 1–6 were promising for both compounds and were shown in Table 5. The cytotoxicity against LLC-MK2 cells was generated using equation 7 and was listed in the same table.

The Hasse diagrams and the PCAs generated using the anti-protozoan and cytotoxicity values of the seven different bioassays supported the comparison and classification of these compounds, and allowed grouping of the 1,4-dihydropyridines. The selected GETAWAY descriptors using the multiple linear regressions and genetic algorithm were able to differentiate the most active compounds. The equations and PCA helped to discriminate some physicochemical (mainly steric) characteristics that were related to structural features that influenced activity. Regarding these characteristics, the diphenylpropyl group at position 4 of the 1,4-dihydropyridine and chloride atom at the ortho position of phenyl group were important; but it was also clear that these features resulted in increased cytotoxicity.

The methodology used in this study could be used as a tool for the development of new potential anti-protozoan agents based on 1,4-dihydropyridines, or even as filters for virtual screenings. However, pharmacokinetic studies using calculated molecular properties from 3D molecular fields of interaction energies is an essential strategy to the rational modification of physicochemical properties to achieve a desired ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) profile. Furthermore, computational approaches for the correlation of molecular structures with

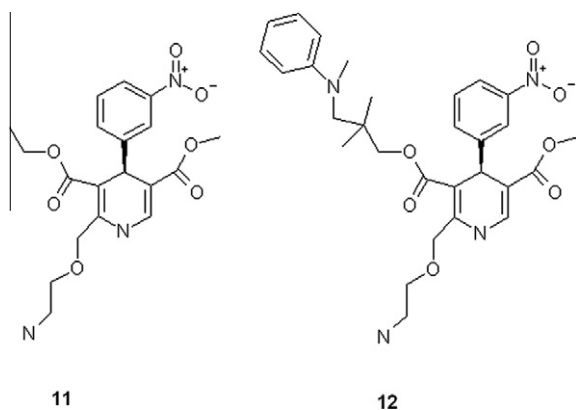


Figure 5. Chemical structures of designed analogues of 1,4-dihydropyridines. Compound **11**: 3-ethyl 5-methyl 2-((2-aminoethoxy)methyl)-1,4-dihydro-4-(3-nitrophenyl)pyridine-3,5-dicarboxylate; **12**: 3-[2,2-dimethyl-3-(methyl-phenyl-amino)-propyl]-5-methyl-2-((2-aminoethoxy)methyl)-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3,5-dicarboxylate.

Table 5
 pIC_{50} and IC_{50} (μM) predicted values by multiple linear equations 1–7 of new designed 1,4-dihydropyridines analogues (compounds **11** and **12**)

Activity	pIC_{50} values		IC_{50} values (μM)	
	Compound 11	Compound 12	Compound 11	Compound 12
<i>L. (L.) chagasi</i> promastigotes	4.83	5.35	14.79	4.47
<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	5.11	5.19	7.76	6.46
<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotes	5.08	4.97	8.32	10.72
<i>L. (L.) major</i> promastigotes	5.05	5.21	8.91	6.17
<i>L. (V.) braziliensis</i> promastigotes	4.61	5.22	24.55	6.03
<i>T. cruzi</i> trypomastigotes	4.82	5.52	15.14	3.02
LLC-MK2 cytotoxicity	4.35	4.20	44.67	63.10

pharmacokinetic properties using the Volsurf²⁴ could also be a suitable strategy for detailed analysis.

3. Conclusion

The 1,4-dihydropyridines showed promising activity against *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites. The QSAR provided useful information about the structural features required for the anti-protozoan activity, including the diphenylpropyl and diphenylmethylazetidid groups at position 4 of the 1,4-dihydropyridine ring. The position 2 of the 1,4-dihydropyridine ring was determinant for IC₅₀ values. The predicted molecules could be used as new leads for the development of more selective compounds. The 1,4-dihydropyridines represent an important class of compounds, and further investigations into their mode of action could be useful in the development of new agents against Leishmaniasis and Chagas' disease.

4. Experimental

4.1. Materials

Lipopolysaccharide (LPS), sodium dodecyl sulfate (SDS), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazol blue; MTT), M-199, RPMI-PR⁻ 1640 medium (without phenol red), azelnidipine (3-O-(1-benzhydrylazetidid-3-yl) 5-O-propan-2-yl 2-amino-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), amlodipine (3-O-ethyl 5-O-methyl 2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), cilnidipine (3-O-(2-methoxyethyl) 5-O-[(E)-3-phenylprop-2-enyl] 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), lercanidipine (3-O-[1-[3,3-diphenylpropyl(methyl)amino]-2-methylpropan-2-yl] 5-O-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), nicardipine (3-O-[2-[benzyl(methyl)amino]ethyl] 5-O-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), nifedipine (chemical name dimethyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate), nimodipine (5-O-(2-methoxyethyl) 3-O-propan-2-yl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) and nitrendipine (3-O-ethyl 5-O-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) were purchased from Sigma–Aldrich. Pentavalent antimony (Glucantime[®]) was obtained from Aventis-Pharma-Brazil, pentamidine was from Sideron (Brazil) and other analytical reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2. Bioassays procedures

BALB/c mice and Golden hamsters were supplied by the animal breeding facility at the Instituto Adolfo Lutz of São Paulo and maintained in sterilized cages under a controlled environment, receiving water and food *ad libitum*. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission and in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences (<http://www.nas.edu>).

4.3. Parasite maintenance

Isolated promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903), *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) and *L. (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24 °C. *L. (L.) chagasi* was maintained in Golden

hamsters up to approximately 60–70 days post-infection. *L. (L.) chagasi* amastigotes were obtained from the spleen by differential centrifugation at 60–70th day post-infection. *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain) were maintained in LLC-MK2 (ATCC CCL 7) cells using RPMI-1640 medium supplemented with 2% calf serum at 37 °C.

4.4. Determination of the anti-leishmanial activity

To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀ value) against *Leishmania* promastigotes, drugs were dissolved previously in dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted with M-199 medium in 96-well microplates to the highest concentration of 100 µg/mL. Each drug was tested twice at eight concentrations prepared at twofold dilution steps. Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1 × 10⁶/well with a final volume of 150 µL. Controls with DMSO and without drugs were performed. Pentamidine was used as a standard drug. The plate was incubated for 24 h at 24 °C and the viability of promastigotes was verified by morphology in the light microscopy and the diphenyltetrazolium assay—MTT.²⁶ Briefly, MTT (5 mg/mL) was dissolved in PBS, sterilized through 0.22 mm membranes and added, 20 µL/well, for 4 h at 24 °C. Promastigotes were incubated without compounds and used as viability control. Formazan extraction was performed using 10% SDS for 18 h (80 µL/well) at 24 °C and the optical density (OD) was determined in a Multiskan MS (UNISCIENCE) at 550 nm. The data analysis was done in Graph Pad Prism 5.0 software. 100% viability was expressed based on the OD of control promastigotes, after normalization. Those extracts presenting anti-leishmanial activity were tested against intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi*. Briefly, peritoneal macrophages were obtained as described previously and seeded for 24 h at 4 × 10⁵/well in 24-wells plates before infection with *L. (L.) chagasi* amastigotes, which was made at a ratio 1:10 (macrophage/amastigotes) for 18 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Infected macrophages were incubated at 37 °C with the test drugs for 120 h at the same conditions described above. Macrophages incubated without drugs were used for control (100% infected). Glucantime was used as a standard drug. At the end of the assay macrophages were fixed with methanol and stained with Giemsa. The parasite burden was determined by the number of infected macrophages (out of 400 cells in duplicate). The data were analyzed using Graph Pad Prism 5.0, which considered the mean of two performed assays in duplicate.

4.5. Determination of the anti-trypanosomal activity

In order to determine the anti-trypanosomal effect of the test drugs against culture trypomastigotes of *T. cruzi*, the drugs were dissolved in DMSO and diluted in RPMI-1640 medium to determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀ value) as described above for the anti-leishmanial assay. Free trypomastigotes obtained from LLC-MK2 cultures were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1 × 10⁶/well in 96-well microplates. Test drugs were incubated to the highest concentration of 100 µg/mL for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Benznidazole was used as standard drug at different concentrations (twofold dilutions). The viability of the trypomastigotes was based in the cellular conversion of the soluble tetrazolium salt MTT (20 µL/well) into the insoluble formazan by mitochondrial enzymes. The formazan extraction was carried out with 10% SDS for 18 h (80 µL/well) at 24 °C as described previously. The number of living trypomastigotes was determined indirectly by the OD at 550 nm. The data analysis was performed using Graph Pad Prism 5.0 software, which considered the mean of two performed assays in duplicate.

4.6. Determination of the cytotoxicity against mammalian cells

Kidney *Rhesus* monkey cells (LLC-MK2) were seeded at 4×10^4 cells/well in 96-well microplates and incubated with drugs to the highest concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h at 37 °C in a 5% CO_2 humidified incubator. The viability of cells was determined by the MTT assay as described above and was confirmed by comparing the morphology of the control group via light microscopy. Glucantime, pentamidine, and benznidazole were used as standard drugs. Control cells were incubated in the presence of DMSO and without drugs. The sigmoid dose–response analysis was made using Graph Pad Prism 5.0 software, which considered the mean of two performed assays in duplicate.

4.7. Determination of the hemolytic activity

The capacity of the tested drugs to induce hemolysis at concentrations close to the IC_{50} against *Leishmania* was verified using erythrocytes.²⁵ BALB/c mice erythrocytes were collected in 0.15 M citrate buffer, pH 7.4, and washed by centrifugation with 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.4. To determine the hemolytic activity, the drugs were incubated for 3 h at 25 °C with a 3% suspension of erythrocytes in 96-well U-shape microplates. Hemolysis was determined by reading the supernatant absorbance with a plate spectrophotometer (Labsystems; Multiskan EX) at 550 nm. A suspension of erythrocytes incubated with water was used as a positive control (100% hemolysis).

4.8. Statistical analysis

Data represent the mean and standard deviation of duplicate samples from two or three independent assays. The IC_{50} values were calculated using sigmoidal dose–response curves in Graph Pad Prism 5.0 software and the standard error are indicated. In order to compare the activities among the 1,4-dihydropyridines, Principal Component Analysis (PCA) and Hasse diagrams were used.

4.9. Molecular modeling

Molecular modeling computations were performed on SPARTAN for Windows v. 4.0 software (Wavefunction, Inc., Irvine, CA). The compounds (Figs. 1 and 5) were subjected to geometrical optimization and conformational analysis (systematic analysis with dihedral angle rotated at each 30°). The AM1 semi-empirical quantum chemical method was used (Austin Model 1)²⁷ and the root mean square (RMS) gradient value of 0.001 kcal/mol was the termination condition. Energy minimized molecules were saved as MDL MolFiles for computing various molecular descriptors using DRAGON Professional Version 5.4.²⁸

4.10. Molecular descriptors

The DRAGON program generated different groups of descriptors: 2D autocorrelations,^{29–31} geometrical descriptors,^{32–34} RDF descriptors,³⁵ 3D-MoRSE descriptors^{36,37} and Weighted Holistic Invariant Molecular (WHIM)³⁸ and GETAWAY descriptors (Geometry Topology, and Atom-Weights Assembly),^{22,23} among others.

4.11. Variable selection

Constant variables were excluded, as well as those that presented only a different value of the series (near constant variable). For the remaining descriptors, pair wise correlation ($r < 0.99$) analysis was performed to exclude those that were highly correlated.³⁹

Thus, the number of GETAWAY descriptors used in our calculations was reduced to 89 descriptors.

The MobyDigs program was used for the calculation of regression models, which were based on pIC_{50} ($-\log\text{IC}_{50}$) values using genetic algorithms.⁴⁰ The search for the best models (highest value of coefficient of internal prediction Q_{cv}^2 —leave one out) was performed using ordinary least squares regression (OLS) under the Genetic Algorithm (GA) approach, that is, by the Variable Subset Selection-Genetic Algorithm (VSSGA) method. In the GA terminology, a population was characterized by a set of candidate variables (the genetic heritage of the population) and was constituted by individuals and models made of one or more population variables.⁴¹

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 08/09260-7). We also acknowledge the CNPq scientific research award given to A.G.T. and the FAPESP scholarship given to J.Q.R. (08/11434-3).

References and notes

- Abernethy, D. R.; Schwartz, J. B. *N. Eng. J. Med.* **1999**, *341*, 1447. Additional information: PubChem. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=mesh&term=Calcium%20Channel%20Blockers>[mh. 2009].
- Bitonti, A. J.; Sjoersdama, A.; McCann, P. P.; Kyle, D. E.; Oduola, A. M. J.; Rossan, R. N.; Milhous, W. K.; Davidson, D. E. *Science* **1988**, *242*, 1301.
- Safa, A. R. C.; Glover, J. L.; Sewell, M. B.; Meyers, M. B.; Biedler, J. L.; Felsted, R. L. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7884.
- Martin, S. K.; Oduola, A. M.; Milhous, W. K. *Science* **1987**, *235*, 899.
- Neal, R. A.; van Bueren, J.; McCoy, N. G.; Iwobi, M. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1989**, *83*, 197.
- Valiathan, R.; Dubey, M. L.; Mahajan, R. C.; Malla, N. *Exp. Parasitol.* **2006**, *114*, 103.
- Palit, P.; Ali, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 374.
- Tempone, A. G.; Taniwaki, N. N.; Reimão, J. Q. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 499.
- Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000.
- Kubinyi, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*; VCH: New York, 1993.
- Kier, L. B.; Hall, L. H. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 784.
- García-Domenech, R.; García, F. J.; Soler, R. M.; Gálvez, J.; Anton-Fos, G. M.; de Julián-Ortiz, J. V. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1996**, *15*, 1.
- Julián-Ortiz, J. V.; Gálvez, J.; Muñoz-Collado, C.; García-Domenech, R.; Gimeno-Cardona, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3308.
- Gregorio Alapont, C.; García-Domenech, R.; Gálvez, J.; Ros, M. J.; Wolski, S.; García, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2033.
- Gozalbes, R.; Brun-Pascaud, M.; García-Domenech, R.; Gálvez, J.; Girard, P. M.; Doucet, J. P.; Derouin, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2764.
- Li, X.; Ruan, G. R.; Lu, W. L.; Hong, H. Y.; Liang, G. W.; Zhang, Y. T.; Liu, Y.; Long, C.; Ma, X.; Yuan, L.; Wang, J. C.; Zhang, X.; Zhang, Q. *J. Controlled Release* **2006**, *112*, 186.
- Taylor, J. M.; Simpson, R. U. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2413.
- Kumar, K. A.; Ganguly, K.; Mazumdar, K.; Dutta, N. K.; Dastidar, S. G.; Chakrabarty, A. N. *Acta Microbiol. Pol.* **2003**, *52*, 285.
- Nuñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Bollo-Dragnic, S.; Marín-Catalán, R.; Pino, L.; Díaz-Araya, G.; Letelier, M. E. *Gen. Pharmacol.* **1998**, *30*, 85.
- Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.; Tosun, F.; Ruedi, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1352.
- Allen, G. S.; Ahn, H. S.; Preziosi, T. J.; Battye, R.; Boone, S. C.; Boone, S. C.; Chou, S. N.; Kelly, D. L.; Weir, B. K.; Crabbe, R. A.; Lavik, P. J.; Rosenbloom, S. B.; Dorsey, F. C.; Ingram, C. R.; Mellits, D. E.; Bertsch, L. A.; Boisvert, D. P.; Hundley, M. B.; Johnson, R. K.; Strom, J. A.; Transou, C. R. *N. Eng. J. Med.* **1993**, *11*, 619.
- Consonni, V.; Todeschini, R.; Pavan, M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 682.
- Consonni, V.; Todeschini, R.; Pavan, M.; Gramatica, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 693.
- Crivori, P.; Cruciani, G.; Carrupt, P. A.; Testa, B. *Med. Chem.* **2000**, *43*, 2204.
- Conceição, K.; Konno, K.; Richardson, M.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C.; Daffre, S.; Camargo, A. C.; Pimenta, D. C. *Peptides* **2006**, *27*, 3092.
- Tada, H.; Shiho, O.; Kuroshima, K.; Koyama, M.; Tsukamoto, K. *J. Immunol. Methods* **1986**, *93*, 157.
- Dewar, M. J. S.; Healy, E. F.; Holder, A. J.; Yuan, Y. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 541.
- Taleta, S. R. L. Mobydigs Academic version. Version 1.1–2009—<http://www.taleta.mi.it>.
- Moran, P. A. P. *Biometrika* **1950**, *37*.
- Geary, R. C. *The Incorporated Statistician* **1954**, *5*, 115.

31. Moreau, G.; Broto, P. *Nouveau J. de Chim.—New J. Chem.* **1980**, *4*, 359.
32. Diudea, M. V.; Horvath, D.; Graovac, A. J. *Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 129.
33. Balaban, A. T. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 645.
34. Randic, M.; Kleiner, A. F.; Dealba, L. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 277.
35. Hemmer, M. C.; Steinhauer, V.; Gasteiger, J. *Vibrat. Spectrosc.* **1999**, *19*, 151.
36. Gasteiger, J.; Sadowski, J.; Schuur, J.; Selzer, P.; Steinhauer, L.; Steinhauer, V. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 1030.
37. Schuur, J. H.; Selzer, P.; Gasteiger, J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 334.
38. Todeschini, R.; Gramatica, P. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1997**, *16*, 113.
39. Livingstone, D. *Data Analysis for Chemists*; Oxford Science Publications: New York, 1995.
40. Talete, S. R. L. DRAGON for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations). Version 5.4—2006—<http://www.talete.mi.it>.
41. Leardi, R.; Boggia, R.; Terrile, M. *J. Chemom.* **1992**, *6*, 267.

ANEXO 7



In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR

Juliana Q. Reimão^a, Fábio A. Colombo^b, Vera L. Pereira-Chioccola^b, André G. Tempone^{a,*}

^a Laboratory of Applied Toxinology on Anti-Parasitic Drugs, Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz Avenida Dr. Arnaldo, 351, 8 andar. Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratory of Molecular Biology, Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 351, 8 andar. Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2010
Received in revised form 13 December 2010
Accepted 21 February 2011
Available online 24 February 2011

Keywords:

Leishmaniasis
Chagas disease
Therapy
Calcium channel blocker
Bepridil
Real-time PCR

ABSTRACT

The need for novel and efficacious drugs against neglected parasitic diseases, such as Leishmaniasis and American Trypanosomiasis, is certainly apparent. In this work, we evaluated the *in vitro* potential of the calcium channel blocker bepridil against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* parasites and exploited an experimental assay using a hamster model with *Leishmania (L.) chagasi*, with a real-time PCR method for therapeutic evaluation. Bepridil was *in vitro* effective against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. (L.) chagasi*, with 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values of 3.81 and 21.55 μM, respectively. *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* and *L. (V.) braziliensis* promastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes were also susceptible to bepridil, with *in vitro* selectivity toward parasites and IC₅₀ values in the range of 3 to 7 μM. The mammalian cytotoxicity using LLC-MK2 cells resulted in an IC₅₀ value of 62.67 μM. However, bepridil showed lack of activity at 12 mg/kg in the experimental hamster model infected with *L. (L.) chagasi* parasites. However, the real-time PCR was a promising tool for the accurate and fast quantification of RNA of living parasites in the liver and spleen of infected hamsters after treatment, eliminating time-consuming light microscopy evaluations.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Protozoan parasitic diseases are a public health problem, resulting in high morbidity and mortality worldwide. Among them, trypanosomatid infections are responsible for more than 20 million cases, primarily in tropical and subtropical areas. It is estimated that half a billion people are at risk of contracting these diseases (Stuart et al., 2008). In particular, *Leishmania* is responsible for an important cutaneous and a fatal visceral disease, which is endemic in 88 countries (Bern et al., 2008). *Trypanosoma cruzi*, on the other hand, is responsible for a fatal systemic infection known as Chagas disease in South America, affecting 16 million people (Fevre et al., 2008).

Many of the anti-trypanosomatid drugs in use today offer non-efficacious treatment with significant side effects because of their high toxicity (Cavalli et al., 2010). Therefore, the need for the development of effective and selective drugs against these neglected diseases is eminent. The study of drugs in clinical use for other pathologies, known as chemotherapeutic switching, is one of the most important methods for the introduction of novel treatments against parasitic diseases and has the advantage of decreasing the costs and the time of this process (Croft et al., 2006).

Calcium channel blockers are a class of drugs used in the therapy of hypertension and cerebrovascular spasms (Singh, 1986), with promising anti-parasitic activities. Among them, nifedipine and verapamil presented inhibition effects on *Leishmania*-macrophage attachment, suggesting a role of the Ca²⁺ ion on the invasion process (Misra et al., 1991). The 1,4-dihydropyridines (Núñez-Vergara et al., 1998; Palit and Ali, 2008; Tempone et al., 2009; Reimão et al., 2010) have presented activity against cutaneous and visceral species of *Leishmania* and were also effective against *T. cruzi* parasites. Bepridil, a long-acting calcium-blocking agent with significant anti-anginal activity, belongs to the pyrrolidine class, which are distinct molecules from 1,4-dihydropyridines. Bepridil has demonstrated other anti-protozoan activities, such as anti-*Toxoplasma gondii* activity (Song et al., 2004) and activity against *Plasmodium falciparum* (Mahmoudi et al., 2006).

Simple, reliable and rapid tests allowing the screening of large compound libraries in experimental studies are still the ambition of drug discovery groups concentrating on Leishmaniasis. As a general rule, for a successful study of a drug candidate, an animal assay is obligatory. However, most *in vivo* assays are time consuming, demanding a long period of investigations mainly using light microscopy techniques (Bretagne et al., 2001). In contrast, the polymerase chain reaction (PCR) has been shown to overcome problems such as the low sensitivity found in microscopic examination of tissue smears (Bretagne et al., 2001). Some papers report

* Corresponding author.

E-mail address: atempone@ial.sp.gov.br (A.G. Tempone).

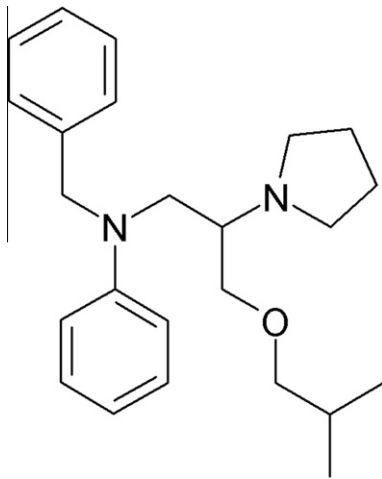


Fig. 1. Chemical structure of bepridil hydrochloride.

the development of sensitive real-time PCR and validate their use to quantify *Leishmania* in different tissues (Bretagne et al., 2001; Nicholas et al., 2002; Bossolasco et al., 2003; Svobodova et al., 2003; Rolão et al., 2004). A quantitative approach represents a robust method for the evaluation of parasite load in organs after experimental treatment (Prina et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* activity of bepridil (Fig. 1), a calcium channel blocker used as an anti-hypertensive agent (Singh, 1986), against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* parasites and its cytotoxicity against mammalian cells. To evaluate the potential of this drug candidate, we have also performed an *in vivo* assay using the hamster model. A sensitive and quantitative real-time PCR method was performed using RNA for an accurate detection of *L. (L.) chagasi* amastigotes in hamsters, allowing the quantification of living parasites in the spleen and liver after drug treatment.

2. Materials and methods

2.1. Materials

DMSO, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, thiazol blue), lipopolysaccharide (LPS), sodium dodecyl sulfate, RPMI-PR-1640 medium, M199 medium, and bepridil hydrochloride (chemical name N-benzyl-N-[3-(2-methylpropoxy)-2-pyrrolidin-1-ylpropyl]aniline) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentavalent antimony (Glucantime®) and pentamidine were obtained from Aventis and Sideron, respectively. Other analytical reagents were purchased from Sigma unless otherwise stated.

2.2. Bioassay procedures

BALB/c mice and Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were supplied by the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute of São Paulo. They were maintained in sterilized cages under a controlled environment and received water and food *ad libitum*. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission, in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

2.3. Parasite maintenance and mammalian cells

L. (L.) chagasi (MHOM/BR/1972/LD) was maintained in Golden hamsters, up to approximately 60–70 days post-infection.

Promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *Leishmania (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *Leishmania (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin), and *Leishmania (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24 °C. *T. cruzi* trypomastigotes (Y strain) were maintained in Kidney Rhesus monkey cells (LLC-MK2) using RPMI-1640 medium supplemented with 2% calf serum at 37 °C. Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of female BALB/c mice by washing with RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum). Rhesus monkey cells (LLC-MK2 -ATCC CCL 7) were maintained in RPMI-1640 medium (without phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum) at 37 °C in a 5% CO₂-humidified incubator.

2.4. Determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀)

Leishmania promastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes were seeded at 1×10^6 cells/well in 96-well microplates as described elsewhere (Tempone et al., 2009). Bepridil was dissolved in DMSO (not exceeding 0.5% of the well volume), and the respective controls were added in the plate at the same concentration. Pentamidine and benznidazole were used as a reference drugs. Parasitic viability was determined by the MTT assay and the optical density (OD) was determined in a Multiskan MS (UNISCIENCE) at 550 nm (Tada et al., 1986). Peritoneal macrophages were seeded at 4×10^5 cells/well in 24-well plates containing glass coverslips, infected with *L. (L.) chagasi* amastigotes at a ratio 1:10 (macrophage/amastigotes) and treated with drugs (bepridil and Glucantime) for 120 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. At the end of the assay, macrophages were fixed with methanol and stained with Giemsa. Parasite burden was verified by the number of infected macrophages out of 500 cells. Each assay was performed in triplicate.

2.5. Cytotoxicity against mammalian cells

LLC-MK2 cells (4×10^4 cells/well) were seeded in 96-well microplates at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. The cells were incubated with bepridil at a concentration not exceeding 200 µg/mL for 48 h at 37 °C; pentamidine, Glucantime® and benznidazole were used as standard drugs. Cell viability was determined by the MTT assay and the optical density (OD) was determined in a Multiskan MS (UNISCIENCE) at 550 nm (Tada et al., 1986). The data obtained represent the mean of two independent assays.

2.6. Experimental studies with *L. (L.) chagasi*-infected hamsters

The efficacy of bepridil treatment was determined using young male golden hamsters (140 g) previously infected (intraperitoneal route) with *L. (L.) chagasi* amastigotes (1×10^8 /animal). Forty-five days after infection, the hamsters were intraperitoneally treated for 10 consecutive days with bepridil at 12 mg/kg ($n = 5$ /group), and pentavalent antimony (Sb^v) was used as standard drug at 50 mg/kg ($n = 5$ /group). The control group ($n = 5$ /group) received vehicle (Cremophor® EL containing 5% ethanol) without drugs. Bepridil was diluted in Cremophor® EL containing 5% ethanol (no interference with the treatment could be detected in previous experimental assays). Animals were euthanized 57 days postinfection. A tissue sample of the spleen and liver (media of 250 mg per sample) was used for RNA extraction.

2.7. DNA and RNA extractions and cDNA synthesis

The number of *L. (L.) chagasi* promastigotes was estimated using a hemocytometer and was used to prepare a standard curve. In the

final log phase of growth, 10^8 promastigotes were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.2) and centrifuged at 1000g for 10 min. Different concentrations of *L. (L.) chagasi* promastigotes were used to obtain the points of the standard curve ranging from 10^8 to 10^2 forms. The parasite pellets were dissolved in 10 mM Tris–HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurilsarcoyl, 100 µg/mL proteinase K, vortex mixed and incubated at 56 °C until complete cell lyses. DNA was extracted using Pure-Link Genomic DNA Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were obtained from spleen and liver fragments collected from studied hamsters, and one sample was collected from a healthy animal and used as a negative control. RNA molecules were extracted and purified using the Spin Tissue RNA Mini Kit (Invisorb) according to the manufacturer's instructions. After RNA extraction, the samples were immediately processed for cDNA synthesis. Each reaction was performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The RNA samples (11 µL) were mixed with 1 mM dNTP; 3 µg random primers; 10 mM DTT; 1 µL M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) in a buffer (Tris–HCl, 250 mM, pH 8.3; KCl, 375 mM; MgCl₂ 15 mM) with a final volume of 20 µL. cDNA samples were stored at –20 °C until use. DNA and RNA purities were determined at 260 and 280 nm in a NanoDrop ND100 (Thermo Scientific).

2.8. Primer selection, polymerase chain reaction and real-time PCR

Each DNA (controls) and cDNA (samples) were tested by quantitative real-time PCR using a primer set (LINJ31), which amplified a *L. (L.) infantum* hypothetical protein (LinJ31.1310)-partial mRNA (Kinetoplast minicircle sequence database). The following were used in the study: (i) forward primer: 5' CCGCGTGCCTGTCC 3'; (ii): reverse primer 5' CCCACACAAGCGGGAAGT 3'; (iii): TaqMan probe FAM dye-labeled: 5' CCTCCTTGACITTTGC 3' and NFQ as quencher. The reactions were performed with Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System in a final volume of 20 µL. The samples or controls (3 µL) were added to a reaction mixture containing 10 µL of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) and 1 µL of the "Assay Mix" that included 18 µM of each primer and 5 µM of TaqMan probe FAM dye-labeled. Amplification runs contained two negative controls (pure water and a negative DNA sample collect from a hamster without leishmaniasis or treatment) and one positive control (DNA sample extracted from culture of promastigotes – standard strain of *L. (L.) chagasi*). The thermal profile was performed at 50 °C for two minutes for optimal AmpliErase UNG activity then ramped up to 95 °C for 10 min. Subsequently, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min were performed. Reactions were previously standardized using serial promastigote DNA dilutions as a template. The real-time PCR system automatically checked the fluorescent signal every second and

calculated the background signal of the reaction. The unit detected the signal generated by the fluorescence as a result of the accumulation of amplified DNA. The results were shown as cycle threshold value (C_T) that informed the quantity of the target gene at which the fluorescence exceeded a preset threshold and were automatically determined by the equipment (Colombo et al., 2011).

2.9. Statistical analysis

The data obtained represented the mean and standard deviation of duplicate samples from two independent assays. The IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose–response curves in Graph Pad Prism 5.0 software, and the 95% confidence intervals were included. The Mann–Whitney test (unpaired two-tailed) was used for significance testing ($p < 0.05$) of parasitic burden and treatment.

3. Results and discussion

Bepridil, an anti-anginal pyrrolidine drug, demonstrated *in vitro* effectiveness against a panel of visceral and cutaneous species of *Leishmania*; promastigotes of *L. (L.) major* were the most resistant species. Promastigotes of *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, and *L. (L.) amazonensis* were *in vitro* inhibited by bepridil, with IC₅₀ values ranging from 3 to 7 µM (Table 1). Pentamidine was used as standard drug against promastigotes of *Leishmania* spp. and resulted in IC₅₀ values ranging from 0.13 to 0.8 µM. To test bepridil activity against the clinically relevant form of *L. (L.) chagasi*, an intracellular assay was performed using peritoneal macrophages as host cells. Bepridil was effective in eliminating 100% of amastigotes at 7.9 µg/mL (95% confidence interval = 7.78–8.03 µg/mL) without affecting macrophages, demonstrating an IC₅₀ value about 3-fold smaller than the standard drug Glucantime® (IC₅₀ = 30.13 µg/mL – 95% confidence interval = 28.97–31.33 µg/mL).

Calcium channel blockers were introduced in 1983 as a class of drugs for the therapy of hypertension and cerebrovascular spasms, as myocardial protective agents, and in the relaxation of uterine spasms (Singh, 1986). Recently, calcium channel blockers have shown promising anti-parasitic activities (Misra et al., 1991; Núñez-Vergara et al., 1998; Tempone et al., 2009). Bepridil has also demonstrated other anti-protozoan activities. Song and co-workers have demonstrated an anti-*Toxoplasma gondii* activity using the tachyzoite forms (Song et al., 2004) and activity against *P. falciparum* (IC₅₀ = 2.63 µM) (Mahmoudi et al., 2006). In addition, the *in vitro* growth inhibition and encystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* has been demonstrated (Makioka et al., 2001).

In our assays, bepridil showed promising *in vitro* activity against the etiologic agent of Chagas' disease, the protozoan *T. cruzi*.

Table 1
Effect of bepridil and standard drugs on parasites and LLC-MK2 cells.

	IC ₅₀ (µM) (CI 95%)			
	Bepridil	Pentamidine	Glucantime	Benznidazole
<i>L. (L.) chagasi</i> promastigotes	3.81 (3.43–4.25)	0.80 (0.05–1.56)	Nd	Nd
<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	21.55 (21.22–21.90)	Nd	76.59 (71.03–82.16)	Nd
<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotes	4.71 (3.30–6.76)	0.51 (0.35–0.67)	Nd	Nd
<i>L. (L.) major</i> promastigotes	7.33 (6.92–7.74)	0.37 (0.16–0.59)	Nd	Nd
<i>L. (V.) braziliensis</i> promastigotes	3.54 (3.13–3.98)	0.13 (0.01–0.26)	Nd	Nd
<i>T. cruzi</i> trypomastigotes	4.31 (3.84–4.85)	Nd	Nd	187.87 (83.74–292.01)
Cytotoxicity against MK2	67.27 (56.03–80.78)	23.48 (19.95–27.01)	>1400	>1400
<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes SI	3.12	Nd	Nd	Nd
<i>T. cruzi</i> trypomastigotes SI	15.61	Nd	Nd	Nd

IC₅₀: Inhibitory concentration 50%; 95% CI: 95% confidence interval; Nd: not determined; SI: Selectivity index.

Trypomastigotes were highly susceptible to bepridil, which was approximately 43-fold more effective than the standard drug benznidazole (Table 1). In previous work, the activity of the calcium channel blocker lacidipine (IC_{50} value of $33.5 \mu M$) and isradipine (IC_{50} value of $20.8 \mu M$) was demonstrated against *T. cruzi* epimastigotes (Núñez-Vergara et al., 1998). Although a different parasite stage was used by these authors, our results corroborate the potential anti-trypanosomal activity of calcium channel blockers and also demonstrate that bepridil was approximately 5-fold more active against *T. cruzi* than the 1,4-dihydropyridines lacidipine and isradipine.

The chemical differences among calcium channel blockers could result in completely different anti-parasitic activities. Other calcium channel blockers, such as verapamil (a phenethylamine) and diltiazem (a benzazepine), showed lack of *in vitro* activity against *T. cruzi* epimastigotes (Núñez-Vergara et al., 1998). However, considering the valuable *in vitro* efficacy of bepridil, future *in vivo* experiments would be an important tool to study the potential of other calcium channel blockers against Chagas disease.

Considering the fact that selectivity is a relevant characteristic for defining lead molecules (Tasdemir et al., 2006), the selectivity index (SI) was used to compare the toxicity for LLC-MK2 cells and the activity against the parasites. Bepridil demonstrated a moderate selectivity for *L. (L.) chagasi* amastigotes (SI = 3.2) and a higher selectivity for *T. cruzi* trypomastigotes (SI = 15.61). Despite the structural differences between the calcium channel blockers, bepridil (pyrrolidine) and nimodipine (1,4-dihydropyridine) both presented similar IC_{50} values against *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes ($IC_{50} = 21.55$ and $21.62 \mu M$, respectively) (Tempone et al., 2009) and a close parasite selectivity.

In our previous work, eight clinically used 1,4-dihydropyridines (azelnidipine, amlodipine, cilnidipine, lercanidipine, nicardipine, nifedipine, nimodipine and nitrendipine) demonstrated *in vitro* anti-leishmanial and anti-trypanosomal activity, with IC_{50} values in the range of 2.6–181 μM (Reimão et al., 2010). Based on this study, bepridil could be among the most active tested drugs against *L. (L.) chagasi* amastigotes, with similar IC_{50} values to amlodipine ($IC_{50} = 5.35 \mu M$) and lercanidipine ($IC_{50} = 10.36 \mu M$) (Reimão et al., 2010).

These promising *in vitro* findings prompted the evaluation of bepridil against *L. (L.) chagasi* in an experimental hamster model. To improve our drug evaluations by allowing the screening of larger amounts of potential candidates for leishmaniasis, a quantitative real-time PCR was performed to detect living amastigotes in affected organs after drug treatment. The development and validation of sensitive real-time PCR to quantify *Leishmania* in different samples has been reported elsewhere, validating PCR as an extremely sensitive method to detect *Leishmania* DNA and RNA (Noyes et al., 1998; Lambson et al., 2000; Nicholas et al., 2002; Colombo et al., 2011). The quantification of *Leishmania* parasite burdens from dermal scrapings (Nicholas et al., 2002; Garnier et al., 2007) and from the spleen (Rolão et al., 2004) and liver (Bretagne et al.,

2001) of infected mice by real-time PCR has also been described. Bossolasco et al. (2003) and Svobodova et al. (2003) developed a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania* spp. parasites in clinical samples.

Leishmania DNA molecules have been shown to rapidly degrade after parasite death, using an α -leucine ester that induces rapid parasite death (Prina et al., 2007). Indeed, commercially available drugs are known to act progressively over a long period of time, resulting in a mixed population of living and dead organisms (Prina et al., 2007). Because the chemical differences among anti-leishmanial drugs result in distinct action mechanisms on parasites, it is reasonable that *Leishmania* DNA could not be rapidly degraded using α -leucine ester (Prina et al., 2007). Furthermore, successful amplification of *Leishmania (L.) donovani* DNA in ancient Egyptian mummies dating back 4000 years (Kupfer et al., 2006) shows that DNA could remain intact over a long period. Thus, the use of RNA would be a suitable alternative for quantification of living parasites, especially for the evaluation of experimental treatment. Because of the high sensitivity of real-time PCR, this methodology would be an appropriate tool for experimental situations in which parasites cannot be visualized in stained organs as a result of low parasite burdens.

The hamster model has been the most reliable alternative for the study of drug candidates in visceral leishmaniasis (Kaur et al., 2010) as a result of a human-resembling infection. The assessment of parasitic burdens is usually based on microscopic counting techniques, through a time-consuming preparation of smears (Stauber et al., 1958). Quantification of parasites by microscopy has poor sensitivity, is time consuming, and is not reliable when the parasites are not equally dispersed (Bretagne et al., 2001). Culture microtitrations have been widely used as a complementary technique in drug studies (Buffet et al., 1995), but the assays remain laborious and can be limited by microbial contamination (Bretagne et al., 2001).

In our assay, a standard curve using promastigotes was used to determine the absolute number of parasites (Rolão et al., 2004). The data was obtained with DNA samples extracted from *L. (L.) chagasi* cultured promastigotes after serial dilutions. The C_T (cycle threshold value) was plotted against different amounts of parasites, resulting in a standard curve of promastigotes (Fig. 2a). Subsequently, the parasite burden of the *in vivo* experiment was estimated from the spleen and liver. The number of parasites was calculated through the C_T , using the linear regression data from promastigotes, with the equation: $y = a + bx$ ($y = C_T$; $a = y$ intercept; $b =$ slope; $x =$ number of parasites). Thus, it was possible to estimate the number of parasites present in each animal sample (spleen and liver).

In our assays, the *in vivo* efficacy of bepridil was evaluated after 10 consecutive days of treatment using a dose of 12 mg/kg. Based on the *in vivo* efficacy of amlodipine and lacidipine against *L. (L.) donovani* at 10 mg/kg (Palit and Ali, 2008), the dose of 12 mg/kg was chosen for the *in vivo* assay to test the bepridil effectiveness.

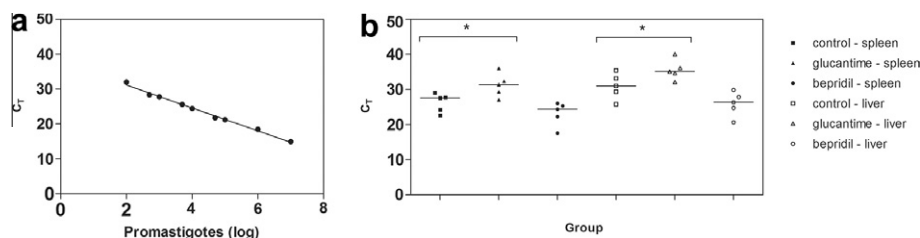


Fig. 2. (a) Standard curve of promastigotes obtained by plotting the Cycle threshold value (C_T) against the number of *Leishmania*, with the latter plotted on a log scale. Each point was tested in duplicate. Slope = 3.28; $R^2 = 0.993$; y intercept = 37.74. (b) Cycle threshold value (C_T) indicative of the quantity of *Leishmania* target gene present in spleen and liver of *L. (L.) chagasi*-infected hamsters, as determined by real-time PCR. *RNA extracted from 250 mg of each organ. The number of parasites was correlated with 3 μL of cDNA (around 500 ng).

The treatment was initiated 45 days after inoculation, allowing the establishment of the infection. At the end of the treatment, bepridil showed a lack of anti-leishmanial activity, as no significant differences could be observed between the test drug and control group. A significant ($p < 0.05$) decrease in the spleen and liver parasite burden was detected in hamsters treated with the standard drug Glucantime when compared to the control group. Fig. 2b shows the C_T in spleen and liver of *L. (L.) chagasi*-infected hamsters. Although few studies have been performed with calcium channel blockers and *Leishmania*, amlodipine and lacidipine have shown *in vivo* anti-leishmanial efficacy (Palit and Ali, 2008). The differences in the efficacy of amlodipine/lacidipine and bepridil could be attributed to many issues. Despite both studies being conducted with calcium channel blockers, bepridil is a pyrrolidine, whereas amlodipine and lacidipine are 1,4-dihydropyridines, demonstrating the chemical diversity of compounds. Data from literature show that even small structural modifications of drugs belonging to the same pharmacological/chemical class could strongly reduce or improve (Reimão et al., 2010) an anti-parasitic activity. Another important aspect is that the susceptibility of *Leishmania* species to a specific drug could be marked differently. Finally, other major differences could also be attributed to the experiments with bepridil and amlodipine/lacidipine: (i) the chosen animal model (hamster and mouse, respectively); (ii) the route of administration (intraperitoneal and oral, respectively) and (iii) the different treatment regimen (daily administration for 10 days and weekly administration, respectively). Furthermore, the lack of *in vivo* activity of bepridil could be related to a poor biodistribution to infected macrophages in spleen and liver. Other pharmaceutical formulations, such as drug delivery systems, could be a future alternative to circumvent this poor distribution.

4. Conclusions

Although bepridil promising *in vitro* activity against *Leishmania* and *T. cruzi* parasites, it failed to treat *L. (L.) chagasi*-infected hamsters. Real-time PCR proved to be a sensitive and fast molecular probe for the detection of living amastigotes in hamster model.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 08/09260-7; 08/00520-6). We also acknowledge the CNPq Scientific Research Award given to AGT and the FAPESP scholarship given to JQR (08/11434-3) and to FAC (08/57245-7).

References

Bern, C., Maguire, J.H., Alvar, J., 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Disease* 2, e313.

Bossolasco, S., Gaijera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, A., Ubertifoppa, C., Cinque, P., 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5080–5084.

Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Garin, J.F., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M., 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 828–831.

Buffet, P.A., Sulahian, A., Garin, Y.J., Nassar, N., Derouin, F., 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 2167–2168.

Cavalli, A., Lizzi, F., Bongarzone, S., Belluti, F., Piazza, L., Bolognesi, M.L., 2010. Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 58, 51–60.

Colombo, F.A., Odorizzi, R.M., Laurenti, M.D., Galati, E.A., Canavez, F., Pereira-Chioccola, V.L., 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* 24, doi:10.1007/s00436-010-2247-6.

Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research* 123, 399–410.

Fevre, E.M., Wissmann, B.V., Welburn, S.C., Lutumba, P., 2008. The burden of human African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2, e333.

Garnier, T., Mantyla, A., Jarvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., Croft, S., 2007. *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 802–810.

Kaur, J., Singh, N., Singh, B.K., Dube, A., Tripathi, R.P., Singh, P., Singh, N., 2010. *Leishmania donovani*: oral therapy with glycosyl 1,4-dihydropyridine analogue showing apoptosis like phenotypes targeting pteridine reductase 1 in intracellular amastigotes. *Experimental Parasitology* 125, 310–314.

Kinetoplast minicircle sequence database [On line]. Available at: <<http://455www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm>>.

Kupfer, B., Vehreschild, J., Cornely, O., Kaiser, R., Plum, G., Viarov, S., Franzen, C., Tillmann, R.L., Simon, A., Müller, A., Schildgen, O., 2006. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerging Infectious Diseases* 12, 116–117.

Lambson, B., Smyth, A., Barker, D.C., 2000. *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Experimental Parasitology* 94, 15–22.

Mahmoudi, N., de Julián-Ortiz, J.V., Ciceron, L., Gálvez, J., Mazier, D., Danis, M., Derouin, F., García-Domenech, R., 2006. Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 489–497.

Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T., 2001. Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. Invadens*. *Parasitology Research* 87, 833–837.

Misra, S., Naskar, K., Sarkar, D., Ghosh, D.K., 1991. Role of Ca^{2+} ion on *Leishmania*-macrophage attachment. *Molecular and Cellular Biochemistry* 102, 13–18.

Nicholas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1666–1669.

Noyes, H.A., Reburn, H., Bailey, J.W., Smith, D., 1998. A nested-PCR based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2877–2881.

Núñez-Vergara, L.J., Squella, J.A., Bollo-Dragnic, S., Marín-Catalán, R., Pino, L., Díaz-Araya, G., Letelier, M.E., 1998. Isradipine and lacidipine: effects *in vivo* and *in vitro* on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *General Pharmacology* 30, 85–87.

Palit, P., Ali, N., 2008. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1,4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 52, 374–377.

Prina, E., Roux, E., Mattei, D., Milon, G., 2007. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection* 9, 1307–1315.

Reimão, J.Q., Scotti, M.T., Tempone, A.G., 2010. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: *in vitro* evaluation and structure-activity relationship study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18, 8044–8053.

Rolão, N., Cortes, Rodrigues, O.R., Campino, L., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Parasitology* 90, 1150–1154.

Singh, B.N., 1986. The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications. *British Journal of Clinical Pharmacology* 21, 1095–1215.

Song, H.O., Ahn, M.H., Ryu, J.S., Min, D.Y., Joo, K.H., Lee, Y.H., 2004. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. *The Korean Journal of Parasitology* 42, 185–193.

Staubert, L.A., Franchino, E.M., Grun, J., 1958. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. *The Journal of Protozoology* 5, 269–273.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 1301–1310.

Svobodova, M., Votycka, J., Nicolas, L., Volf, P., 2003. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and Infection* 5, 361–364.

Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, M., 1986. Na improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods* 93, 157–165.

Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T., Tosun, F., Rüedi, P., 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50, 1352–1364.

Tempone, A.G., Taniwaki, N.N., Reimão, J.Q., 2009. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitology Research* 105, 499–505.

ANEXO 8

Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs

Juliana Quero Reimão, André Gustavo Tempone^{/*}

Departamento de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 351, 01246-000 São Paulo, SP, Brasil

The need for drug combinations to treat visceral leishmaniasis (VL) arose because of resistance to antimonials, the toxicity of current treatments and the length of the course of therapy. Calcium channel blockers (CCBs) have shown anti-leishmanial activity; therefore their use in combination with standard drugs could provide new alternatives for the treatment of VL. In this work, in vitro isobolograms of Leishmania (Leishmania) chagasi using promastigotes or intracellular amastigotes were utilised to identify the interactions between five CCBs and the standard drugs pentamidine, amphotericin B and glucantime. The drug interactions were assessed with a fixed ratio isobologram method and the fractional inhibitory concentrations (FICs), sum of FICs (Σ FICs) and the overall mean Σ FIC were calculated for each combination. Graphical isobologram analysis showed that the combination of nifedipine and glucantime was the most promising in amastigotes with an overall mean Σ FIC value of 0.79. Interactions between CCBs and the anti-leishmanial drugs were classified as indifferent according to the overall mean Σ FIC and the isobologram graphic analysis.

Key words: leishmaniasis - *Leishmania* therapy - calcium channel blockers - drug combinations - isobologram

Visceral leishmaniasis (VL) is a disseminated protozoan infection caused by the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex (Chappuis et al. 2007). The zoonotic form, in which dogs are the main reservoir in urban areas, is widely distributed in the Mediterranean basin, China, the Middle East and South America and is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum/Leishmania (Leishmania) chagasi* (Herwaldt 1999, Chappuis et al. 2007). Although the disease is endemic in more than 60 countries with 200 million people at risk, 90% of the 500,000 cases are found in five countries: India, Bangladesh, Nepal, Sudan and Brazil (van Griensven et al. 2010).

In the past 70 years, the therapeutic arsenal for the treatment of VL has been extremely limited, consisting of the pentavalent antimonials (sodium stibogluconate and meglumine antimoniate), amphotericin B (and its lipid formulations) and miltefosine (Alvar et al. 2006). These drugs have crucial disadvantages, such as the length of treatment required, painful injection, toxicity, the emergence of resistance, dose-limiting nephrotoxicity, heat instability, high cost and poor patient compliance (van Griensven et al. 2010).

Calcium channel blockers (CCBs) are drugs used to treat heart diseases. This class of drugs inhibits the action of the calcium channels in cell membranes and potential indications are not limited to cardiovascular diseases. The class consists of three chemically distinct

structural families: phenylalkylamines (e.g., verapamil), dihydropyridines (e.g., amlodipine, nimodipine) and benzothiazepines (e.g., diltiazem) (Motro et al. 2001). Considering that drug repurposing, also referred to as drug repositioning, is a promising approach to discover novel drug candidates to treat neglected diseases, the anti-parasitic activity of CCBs has been studied. It was demonstrated that nifedipine blocks the binding of *Leishmania* amastigotes to macrophages previously treated with the drug, suggesting that calcium has a role during the infection of macrophages by new parasites (Misra et al. 1991). There are also reports of the in vitro and in vivo activity of amlodipine and lacidipine against *L. (L.) donovani* (Palit & Ali 2008).

Based on their cardiac and peripheral activity, CCBs have been divided into the following classes (Singh 1986): (i) type I agents, exemplified by verapamil and related drugs (e.g., tiapamil, galopamil) and diltiazem (antiarrhythmics), (ii) type II agents, including nifedipine and other dihydropyridines, which are potent peripheral vasodilators with selective action on sympathetic reflexes, (iii) type III agents, including flunarizine and cinnarizine (piperazine derivatives), which are potent dilators of peripheral vessels, and (iv) type IV agents show broad pharmacological action (e.g., perhexiline, lidoflazine and bepridil), which includes blocking the calcium flow in the heart and peripheral vessels and other electrophysiological actions.

The goals of the drug combinations are to prevent or delay the onset of resistance and relapses and also to increase the efficiency or reduce the course of treatment. These combinations have been the standard therapy of various viral, bacterial and parasitic diseases (White 1999, Olliaro & Taylor 2003). The need to investigate drug combinations for the therapy of leishmaniasis has been noted by several authors (Bryceson 2001, Sundar 2001, van Griensven et al. 2010). Drug combinations

Financial support: FAPES (08/09260-7), CNPq (to AGT) and FAPESP (08/11434-3 to JQR)

+ Corresponding author: atempone@ial.sp.gov.br

Received 4 July 2011

Accepted 25 October 2011

have been highlighted for VL in response to the need to overcome antimonial resistance, prolong the therapeutic lifespan of the drugs, shorten the length of treatment, improve patient compliance and increase cost-effectiveness (Olliario 2010).

Based on previous reports that demonstrate the anti-leishmanial activity of several CCBs (Tempone et al. 2009, Reimão et al. 2010), their *in vitro* activity when used in combination with standard drugs was explored with the goal of finding new alternatives for the treatment of leishmaniasis.

MATERIALS AND METHODS

Material - Sodium dodecyl sulphate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Thiazol blue), M-199 and Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-PR-1640 medium (without phenol red) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentavalent antimony (glucantime, Aventis-Pharma-Brazil) and pentamidine (Sideron, Brazil) were used as standard drugs. Other analytical reagents were purchased from Sigma unless stated otherwise.

Animals - Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and BALB/c mice were obtained from the Adolfo Lutz Institute of São Paulo and kept in sterile boxes with absorbent material while receiving food and water *ad libitum*. Golden hamsters were infected each month with amastigotes from the spleen to maintain the strain. BALB/c mice were used for obtaining peritoneal macrophages.

Parasites and macrophages - *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) promastigotes were grown in M-199 medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 0.25% haemin at 24°C without addition of antibiotics. *L. (L.) chagasi* amastigotes were obtained by differential centrifugation from spleens of previously infected golden hamsters. The number of parasites was determined (Stauber 1958) 60-70 days after infection. Macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice by washing with RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and were maintained in a 5% CO₂-humidified incubator at 37°C (Tempone et al. 2008).

Determination of drug interactions - The interactions between drugs were evaluated *in vitro* by a modified isobologram method (Fivelman et al. 2004). The predetermined 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were used to determine the maximum concentrations of individual drugs, assuring that the IC₅₀ was in the fourth point of the serial dilution. Drugs were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted with medium. The highest concentrations of the solutions were prepared in proportions of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 of CCB and standard drug, respectively, which were serially diluted (base 2) to the seventh well of the microplate in duplicate. Two separate experiments were performed for each drug combination and susceptibility assay.

Promastigotes assay - Promastigotes were counted in a Neubauer haemocytometer and seeded at 1 x 10⁶/well with a final volume of 200 µL. The initial concentrations used were 12 µg/mL for amlodipine, 12 µg/mL

for bepridil, 100 µg/mL for lercanidipine, 100 µg/mL for nifedipine, 280 µg/mL for nimodipine, 1.5 µg/mL for pentamidine and 0.4 µg/mL for amphotericin B. Controls with DMSO and without drugs were performed. The plates were incubated for 24 h at 24°C and the viability of promastigotes was verified by the MTT assay (Tada 1986). The data analysis was performed with Graph Pad Prism 5.0 software. One hundred per cent viability was expressed based on the optical density of control promastigotes after normalisation.

Intracellular amastigotes assay - Macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c as described above and added to 16 well plates (NUNC®) at 5 x 10⁴/well. Plates were incubated at 5% CO₂ for 24 h at 37°C. *L. (L.) chagasi* amastigotes extracted from the spleens and separated by differential centrifugation were added to macrophages at a ratio of 10:1 (amastigotes:macrophage). After 24 h, extracellular parasites were removed by washing and fresh medium containing the different fixed-ratio solutions was added and incubated at 37°C for a period of 120 h. Further medium changes with fresh drug were carried out after 72 h. The initial concentrations used were 21 µg/mL for amlodipine, 72 µg/mL for nimodipine, 240 µg/mL for glucantime and 0.2 µg/mL for amphotericin B. At the end of the assay, the slides were stained with Giemsa and observed under an optical microscope. The IC₅₀ was determined by counting 200 macrophages per well and assessing the number of infected macrophages (Yardley & Croft 2000).

Determination of fractional inhibitory concentrations (FICs) index, isobologram construction and classification of the nature of interaction - FICs and the sum of FICs (ΣFICs) were calculated as follows: FIC of drug A = IC₅₀ of drug A in combination/IC₅₀ of drug A alone. The same equation was applied to the partner drug (drug B). ΣFICs = FIC drug A + FIC drug B. An overall mean ΣFIC was calculated for each combination and used to classify the nature of interaction as follows: synergy defined the mean ΣFIC ≤ 0.5, indifference the mean ΣFIC between > 0.5 and ≤ 4 and antagonism the mean ΣFIC > 4 (Odds 2003). Isobolograms were constructed plotting the standard error of the mean (SEM) for each component of the dosage combination (Gessner 1995).

Statistical analysis - The data obtained represented the mean and standard deviation of duplicate samples from two independent assays. The IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose-response curves with Graph Pad Prism 5.0 software and the 95% confidence intervals were included.

Ethics - All procedures performed on animals were approved by the Ethical Committee on Research of the Adolfo Lutz Institute/Pasteur Institute and were in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

RESULTS

Evaluation of the anti-leishmanial activity of single drugs - *L. (L.) chagasi* was susceptible to all tested CCBs with IC₅₀ values that ranged from 0.8-30 µg/mL. As dem-

onstrated by the mitochondrial oxidative metabolism of parasites (MTT method), the tested drugs showed a leishmanicidal effect by killing 100% of parasites at the highest tested concentrations. These IC₅₀ values were obtained for the single drugs against promastigotes and are shown in Table I. Amlodipine was the most active CCB against both promastigotes and amastigotes.

Combination studies - The combination of amlodipine, bepridil, lercanidipine, nicardipine and nimodipine with the anti-leishmanial drugs amphotericin B and pentamidine in *L. (L.) chagasi* promastigotes indicated an indifferent interaction. This was demonstrated by analysis of the overall mean ΣFICs, which ranged from 1.13-1.7 (Table II). According to the graphic analysis of the isobolograms using promastigotes (Fig. 1), indifference was observed within all combinations because all points (P₂-P₄, corresponding to the proportions of 4:1, 3:2, 2:3 and 1:4 of CCB and standard anti-leishmanial drug, respectively) are located above the additivity line. The combination of amlodipine and nimodipine with glucantime and amphotericin B in *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes was classified as indifferent according the overall mean ΣFICs, which ranged from 0.79-1.43 (Table II). The graphic analysis of the isobologram (Fig. 2) showed that, in spite of some points being located below the additivity line (point P₂ of amlodipine:amphotericin B; point P₅ of amlodipine:glucantime and points P₃ and P₅ of nimodipine:glucantime), the SEM should also be considered in the analysis. The combination of nimodipine and glucantime (Fig. 2D) showed synergy in three of the points in the isobologram, with the most synergic effect seen in the point P₄ (ratio 2:3 of nimodipine:glucantime). However, according to the adopted classification, this drug combination was not considered synergic because the overall mean ΣFIC of this combination was 0.79 (Table II).

DISCUSSION

Infectious diseases such as tuberculosis, leprosy, malaria and acquired immune deficiency syndrome were only considered to be under therapeutic control after the introduction of drug combinations. Combinatorial treatments can not only boost the action of the different therapeutic compounds, but they may also help to avoid the development of parasitic resistance (Coura 2009). This is the first report that investigates the *in vitro* activity of combinations of calcium antagonists and standard drugs for leishmaniasis. Despite the previously observed anti-leishmanial activity of the CCBs used in the study (Reimão et al. 2010), the overall mean ΣFIC and the isobolograms obtained show no physicochemical or biological interactions between the CCBs and the standard drugs.

The isobologram is a graphical representation of the effective dose, or FIC value, of two drugs when administered together. In this graph, the intercepts are the points that define the line of additivity (junction of points P₁ and P₆) (Figs 1, 2) and all points in this line are the coordinates that theoretically represent the doses of drug pairs (P₂-P₄) (Figs 1, 2). This graphical representation provides an overview of the isobologram of theoretical additive doses, but ΣFIC values are preferred for statistical analysis (Tallarida et al. 1997).

TABLE I

Activity of individual drugs against *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes and intracellular amastigotes

Drug	IC ₅₀ µg/mL (95% CI)	<i>L. (L.) chagasi</i> form
Amlodipine	0.85 (0.74-0.97)	Promastigotes
Bepridil	1.73 (1.59-1.88)	
Lercanidipine	7.80 (6.704-9.075)	
Nicardipine	10.59 (9.82-11.43)	
Nimodipine	30.30 (28.32-32.42)	
Amphotericin B	0.04 (0.03-0.05)	
Pentamidine	0.22 (0.19-0.26)	
Amlodipine	2.93 (2.08-4.12)	Amastigotes
Nimodipine	26.53 (24.87-28.30)	
Amphotericin B	0.14 (0.13-0.16)	
Glucantime	7.25 (6.13-8.57)	

95% CI: 95% confidence interval; IC₅₀: 50% inhibitory concentration (µg/mL).

TABLE II

Overall mean sum of fractional inhibitory concentrations (ΣFIC) of calcium channel blockers and partner drugs against *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes and amastigotes

Combination	Overall mean ΣFIC	<i>L. (L.) chagasi</i> form
Amlodipine + pentamidine	1.47	Promastigotes
Amlodipine + amphotericin B	1.40	
Bepridil + pentamidine	1.19	
Bepridil + amphotericin B	1.15	
Lercanidipine + pentamidine	1.49	
Lercanidipine + amphotericin B	1.70	
Nicardipine + pentamidine	1.26	
Nicardipine + amphotericin B	1.32	
Nimodipine + pentamidine	1.27	
Nimodipine + amphotericin B	1.13	
Amlodipine + glucantime	1.19	Amastigotes
Amlodipine + amphotericin B	1.43	
Nimodipine + glucantime	0.79	
Nimodipine + amphotericin B	1.28	

The terminology used to interpret the results of the isobologram is often a subject of debate and confusion (Odds 2003). The terms used to describe results that are neither synergistic nor antagonistic are somewhat complicated. Unfortunately, the term "additive" often holds an inaccurate meaning and can be interpreted as referring to a positive interaction (Odds 2003). For this reason, the terms "synergistic", "indifferent" and "antagonistic" were used for the interpretation of interactions

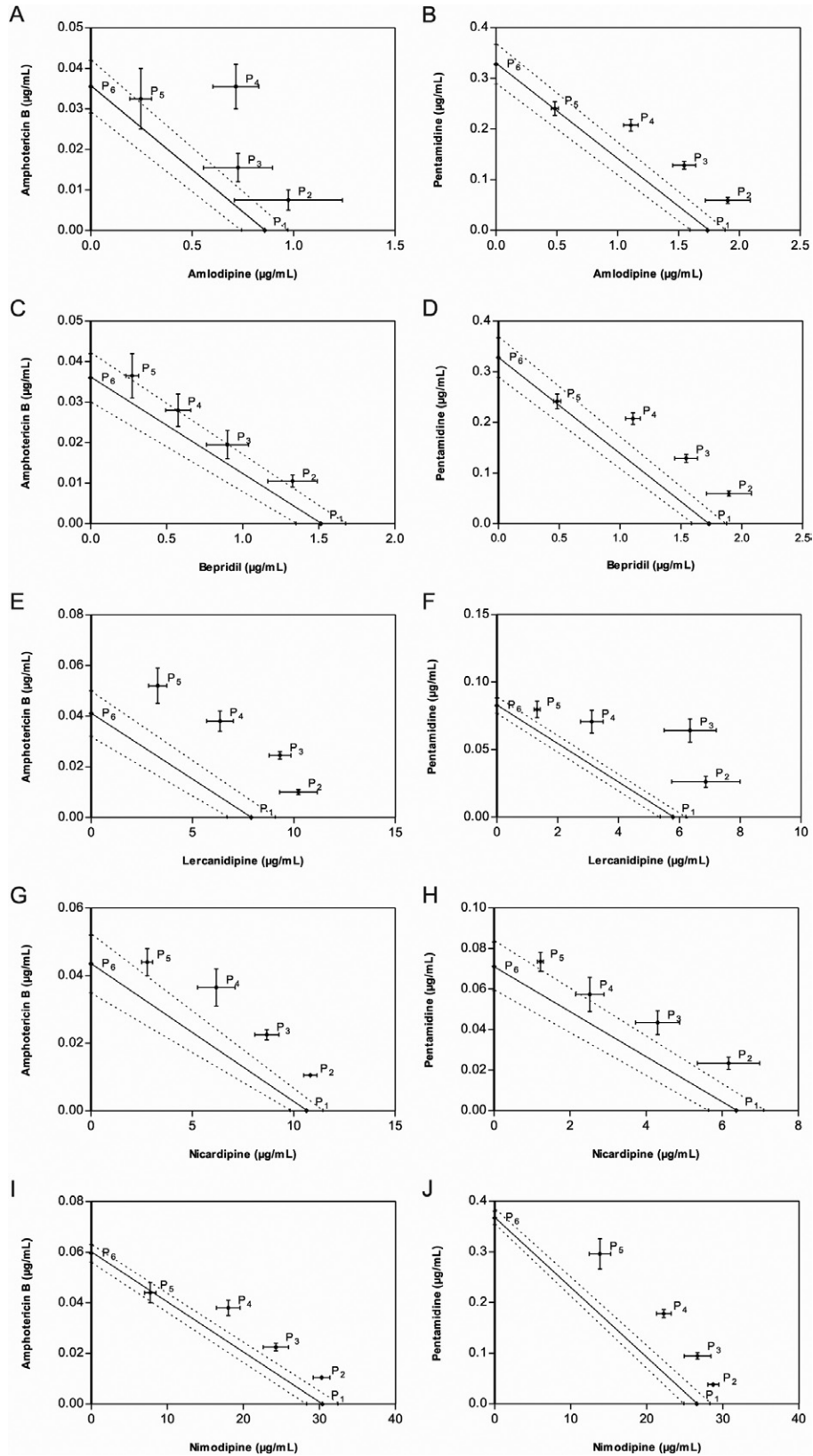


Fig. 1: representative isobolograms of in vitro interactions of calcium channel blockers (CCBs) and the partner drug against *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of amlodipine, bepridil, lercanidipine, nicardipine and nimodipine was plotted in the abscissa and the IC_{50} of amphotericin B and pentamidine was plotted in the ordinate. The plotted points are IC_{50} s of each fixed ratio combination serially diluted. Bars around points correspond to calculated standard errors of the mean. Points P₁-P₆ correspond to the proportion of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 of CCB and standard anti-leishmanial drug, respectively. The bold line corresponds to the predicted positions of the experimental points for a simple additive effect. The dotted line corresponds to the additivity line range of confidence.

in this report. The isobologram graph made from FIC values has been widely used to represent the interaction between two drugs (Fivelman et al. 2004). However, it is also possible to use the IC_{50} values and their respective confidence intervals (Gessner 1995). Thus, the graph with standard error bars can be more informative and was used in the present work.

The FIC values demonstrate that paired combinations of agents can exert inhibitory effects higher than the sum of their effects alone (synergy; $FIC < 1.0$) or smaller than the sum of their effects alone (antagonism; $FIC > 1.0$) (Berembaum 1978). However, Odds (2003) proposed the interpretation of FIC data as “synergy” when $FIC \leq 0.5$, “antagonism” when $FIC \geq 4.0$ and “no interaction” when $FIC > 0.5 < 4.0$.

Most relevant information for drug combinations is obtained with the intracellular amastigote assay. However, the use of axenic promastigotes can also provide useful data. It is important to consider that the presence of the host cell (macrophages) could interfere within the synergism/antagonism of the drug combinations during studies against *Leishmania*. Thus, susceptibility studies using the two parasite stages (promastigotes and intracellular amastigotes) can provide additional information about the distinct action of the drug combinations in addition to that obtained from ordinary macrophage activation.

Calcium antagonists have shown anti-parasitic properties (Misra et al. 1991, Núñez-Vergara et al. 1998, Tempone et al. 2009, Reimão et al. 2010, 2011). Other studies have reported that amlodipine reverses the in vitro chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* (Basco & Le Bras

1991) and can also increase chloroquine accumulation inside the infected erythrocytes. Therefore, combination therapy of amlodipine and chloroquine might be a useful therapeutic strategy against chloroquine-resistant malaria (Deloron et al. 1991). In addition, the 1,4-dihydropyridine nifedipine showed in vitro activity against *P. falciparum* ($IC_{50} = 4.3 \mu M$) (Tanabe et al. 1989).

Bepridil, an anti-anginal pyrrolidine drug, demonstrated effectiveness in vitro against a panel of visceral and cutaneous species of *Leishmania*, with IC_{50} values ranging from 3-7 μM (Tempone et al. 2009, Reimão et al. 2011). It has also demonstrated activity against other protozoans, such as *Toxoplasma gondii* (Song et al. 2004), *P. falciparum* ($IC_{50} = 2.63 \mu M$) (Mahmoudi et al. 2006), *Trypanosoma cruzi* (Reimão et al. 2011) and *Entamoeba* species (Makioka et al. 2001). However, it lacks activity in an experimental *L. (L.) chagasi* model (Reimão et al. 2011).

In a previous report, eight clinically used 1,4-dihydropyridines demonstrated in vitro anti-leishmanial activity with IC_{50} values ranging from 5.35-176.24 μM (Reimão et al. 2010). Amlodipine, lercanidipine, nifedipine and nimodipine were among the most active CCBs against *L. (L.) chagasi* amastigotes. Based on previous studies, CCBs were selected for drug combination assays, but none of the tested CCBs increased pentamidine, amphotericin B or glucantime in vitro activity.

Other promising pharmacological activities of CCBs have been reported in *Leishmania* sp., including the reversal of antimony resistance in clinical isolates of *L. (L.) donovani* (Valiathan et al. 2006). According to Misra et al. (1991), nifedipine and verapamil could effectively

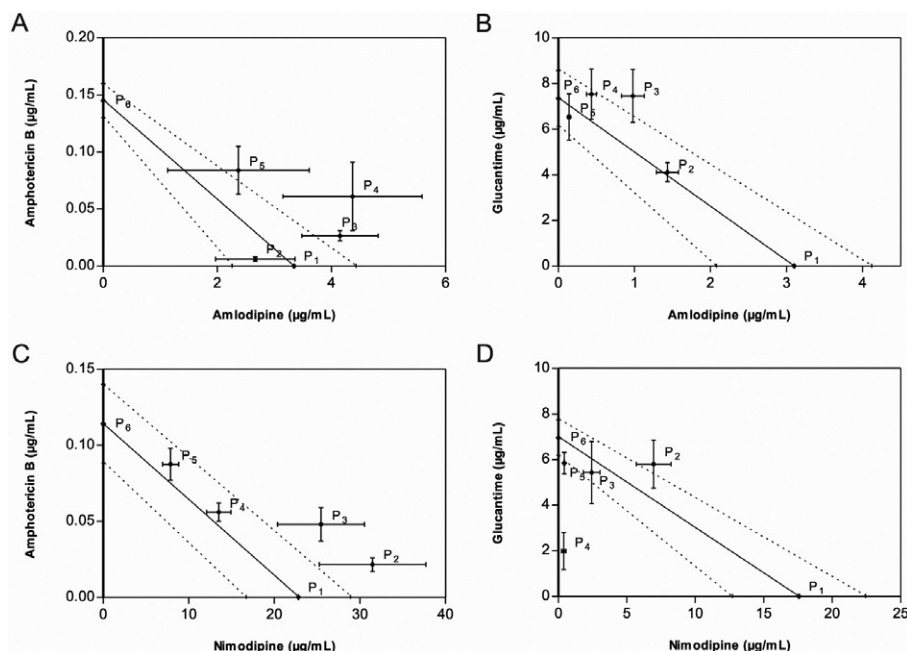


Fig. 2: representative isobolograms of in vitro interactions of calcium channel blockers (CCBs) and the partner drug against *Leishmania (Leishmania) chagasi* intracellular amastigotes. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of amlodipine and nimodipine was plotted in the abscissa and the IC_{50} of amphotericin B and glucantime was plotted in the ordinate. The plotted points are IC_{50} s of each fixed ratio combination serially diluted. Bars around points correspond to calculated standard errors of the mean. Points P_1 - P_6 correspond to the proportion of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 of CCB and standard anti-leishmanial drug, respectively. The bold line corresponds to the predicted positions of the experimental points for a simple additive effect. The dotted line corresponds to the additivity line range of confidence.

inhibit the infection of macrophages by *L. (L.) donovani*, although no anti-parasitic effect could be observed. Palit and Ali (2008) also showed that lacidipine, amlodipine, verapamil and diltiazem inhibited Ca^{2+} uptake by *Leishmania*, but only lacidipine and amlodipine showed *in vivo* anti-leishmanial activity. Therefore, studying the action mechanisms of CCBs could prove useful for developing drug design studies and novel strategies for reversing the resistance of *Leishmania* spp.

In vitro combination assays are an advantageous and rational methodology for the screening of synergic drug combinations. However, they do not provide other important information, such as pharmacokinetic (Seifert et al. 2011) and pharmacodynamic interactions (Seifert & Croft 2006). This can only be measured by animal assays. Considering the *in vitro* anti-leishmanial activity of the studied CCBs, further *in vivo* studies may be considered to evaluate possible drug interactions in VL.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Karin Seifert (London School of Hygiene and Tropical Medicine), for suggestions during paper preparation.

REFERENCES

- Alvar J, Croft S, Olliaro P 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61: 223-274.
- Basco LK, Le Bras J 1991. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* drug interaction between chloroquine and enantiomers of amlodipine. *Exp Parasitol* 72: 262-270.
- Berembaum MC 1978. A method for testing for synergism with any number of agents. *J Infect Dis* 137: 122-113.
- Bryceson A 2001. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* 6: 928-934.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5: 873-882.
- Coura JR 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 549-554.
- Deloron P, Basco LK, Dubois B, Gaudin C, Clavier F, Le Bras J, Verdier F 1991. *In vitro* and *in vivo* potentiation of chloroquine against malaria parasites by an enantiomer of amlodipine. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1338-1342.
- Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4097-4102.
- Gessner PK 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* 105: 161-179.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Mahmoudi N, de Julián-Ortiz JV, Ciceron L, Gálvez J, Mazier D, Danis M, Derouin F, García-Domenech R 2006. Identification of new antimalarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. *J Antimicrob Chemother* 57: 489-497.
- Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T 2001. Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Parasitol Res* 87: 833-837.
- Misra S, Naskar K, Sarkar D, Ghosh DK 1991. Role of Ca^{2+} ion on *Leishmania*-macrophage attachment. *Mol Cell Biochem* 102: 13-18.
- Motro M, Shemesh J, Grossman E 2001. Coronary benefits of calcium antagonist therapy for patients with hypertension. *Curr Opin Cardiol* 16: 349-355.
- Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Bollo-Dragnic S, Marín-Catalán R, Pino L, Díaz-Araya G, Letelier ME 1998. Isradipine and lacidipine: effects *in vivo* and *in vitro* on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Gen Pharmacol* 30: 85-87.
- Odds FC 2003. Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52: 1.
- Olliaro PL 2010. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 23: 595-602.
- Olliaro PL, Taylor RW 2003. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *J Exp Biol* 206: 3753-3759.
- Palit P, Ali N 2008. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1,4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 374-377.
- Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Tempone AG 2011. *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Exp Parasitol* 128: 111-115.
- Reimão JQ, Scotti MT, Tempone AG 2010. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: *in vitro* evaluation and structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem* 18: 8044-8053.
- Seifert K, Croft SL 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 73-79.
- Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL 2011. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 66: 850-854.
- Singh BN 1986. The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications. *Br J Clin Pharmacol* 21: 109S-21S.
- Song HO, Ahn MH, Ryu JS, Min DY, Joo KH, Lee YH 2004. Influence of calcium ion on host cell invasion and intracellular replication by *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 42: 185-193.
- Stauber LA, Franchino EM, Grun J 1958. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamster. *J Protozool* 5: 269-273.
- Sundar S 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 849-854.
- Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93: 157-165.
- Tallarida RJ, Kimmel HL, Holtzman SG 1997. Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology* 133: 378-382.
- Tanabe K, Izumo A, Kato M, Miki A, Doi S 1989. Stage-dependent inhibition of *Plasmodium falciparum* by potent Ca^{2+} and calmodulin modulators. *J Protozool* 36: 139-143.
- Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, de Andrade HF Jr, Antoniazzi MM, Jared C 2008. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* 52: 13-21.
- Tempone AG, Taniwaki NN, Reimão JQ 2009. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res* 105: 499-505.
- Valiathan R, Dubey ML, Mahajan RC, Malla N 2006. *Leishmania donovani*: effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of pro-

- mastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp Parasitol* 114: 103-108.
- van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M 2010. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10: 184-194.
- White NJ 1999. Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parasitologia* 41: 301-308.
- Yardley V, Croft SL 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* 4: 243-248.

ANEXO 9



Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*

Juliana Q. Reimão, Fábio A. Colombo, Vera L. Pereira-Chioccola, André G. Tempone*

Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 351, 8º Andar. Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2011
Received in revised form 10 January 2012
Accepted 11 January 2012
Available online 20 January 2012

Keywords:

Leishmaniasis
Buparvaquone
Leishmania (L.) *infantum chagasi*
Liposomes
Therapy

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a novel liposomal formulation, containing phosphatidylserine (PS), of buparvaquone (BPQ) and to evaluate its *in vivo* effectiveness in *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*-infected hamsters. The activity of BPQ was evaluated against both the promastigote forms of different *Leishmania* species and the intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum chagasi*. Buparvaquone was entrapped in PS-liposomes (BPQ-PS-LP), and the drug was quantified by ultra-high-performance liquid chromatography. The treatment was quantified by detecting the RNA of the living amastigotes in the spleen and the liver by real-time PCR. *In vitro* assays with *L. (L.) infantum chagasi* intracellular amastigotes were performed in peritoneal macrophages for the evaluation of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀). BPQ-PS-LP at 0.33 mg/kg/day for eight consecutive days reduced the number of amastigotes by 89.4% ($P < 0.05$) in the spleen and by 67.2% ($P > 0.05$) in the liver, compared to 84.3% ($P < 0.05$) and 99.7% ($P < 0.05$), respectively, following Glucantime® treatment at 50 mg/kg/day. Free BPQ at 20 mg/kg/day failed to treat the hamsters when compared to the untreated group. BPQ was significantly ($P < 0.05$) selective against *L. (L.) infantum chagasi* intracellular amastigotes, with an IC₅₀ value of 1.5 μM; no *in vitro* mammalian cytotoxicity could be detected. Other cutaneous species were also susceptible to BPQ, with IC₅₀ values in the range 1–4 μM. BPQ-PS-LP caused a significant reduction in the parasite burden at a 60-fold lower dose than did the free BPQ. These results show the potential of PS-liposome formulations for the successful targeted delivery of BPQ in visceral leishmaniasis.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis remains among the most important parasitic diseases in the developing world. Visceral leishmaniasis (VL) has an estimated incidence of 500,000 new cases per year and is the life-threatening form of leishmaniasis; it is the consequence of severe hepatosplenomegaly, which leads to death in untreated patients (Maltezos, 2008). Epidemiologic studies indicate that leishmaniasis is abundant in the Americas and is a great public health concern. In the New World, the disease is caused by a number of different parasite species that are capable of producing a wide variety of clinical manifestations: VL is usually caused by *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, and cutaneous leishmaniasis (CL) is usually caused by *L. (V.) braziliensis* or *L. (L.) mexicana* species (Grimaldi and Tesh, 1993).

There is a shortage of safe therapeutic options to treat VL, resulting in poor patient adherence and relapses due to the unfinished treatments and the severe adverse effects (den Boer et al., 2009; Murray, 2001). Outside of India, the main therapy remains the class of pentavalent antimonials, a highly toxic option for both

CL and VL. In India, where there is resistance to antimonials, the oral drug miltefosine and the liposomal amphotericin B have provided a significant improvement in leishmaniasis therapy (Maltezos, 2008; Murray, 2001). In Brazil, antimonials are still effective for most infections despite their high toxicity, but limited data about the resistance to these drugs is available. All current treatments with these drugs have limitations; therefore, novel, safe and low-cost treatments are still required (Torres et al., 2010).

Buparvaquone (BPQ) (Fig. 1), a veterinary drug used to treat theileriosis, has shown promising activities against protozoan parasites, including *Leishmania* spp. (Croft et al., 1992), *Plasmodium falciparum* (Gokhale et al., 2006), and *Cryptosporidium parvum* (Müller and Jacobs, 2002). Despite its anti-leishmanial activity at nanomolar concentrations (Croft et al., 1992), *in vivo* experiments with *L. (L.) donovani* showed only a weak suppression of the parasite burden in BALB/c mice at 100 mg/kg/day. The poor distribution and low bioavailability of BPQ contributed to the limited *in vivo* efficacy in models of VL (Croft et al., 1992) and CL (Garnier et al., 2007). BPQ was also tested at 5 mg/kg/day for 12 days in dogs infected with *L. (L.) infantum chagasi* and with VL symptoms, but no effect was seen (Vexenat et al., 1998).

The water solubility of BPQ is very low (<1 mg/L); consequently, it is poorly soluble in biological media, such as gastric fluids

* Corresponding author.

E-mail addresses: atempone@usp.br, atempone@ial.sp.gov.br (A.G. Tempone).

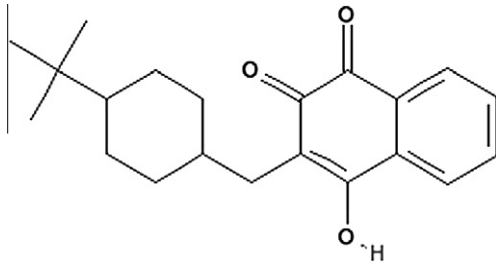


Fig. 1. The chemical structure of buparvaquone.

(Müller and Jacobs, 2002). Thus, there is limited oral bioavailability, which contributes to the low *in vivo* efficacy of BPQ. Liposomes have been widely used as safe and effective vehicles for drug delivery systems (Frézard and Demicheli, 2010), and liposomal amphotericin B has been used to treat leishmaniasis with fewer toxic effects (Bern et al., 2006; Sundar et al., 2011). The presence of phosphatidylserine (PS) in the membrane of liposomes has been shown to support the targeting delivery of drugs to intracellular amastigotes as a result of the interaction with macrophage scavenger receptors (Tempone et al., 2004, 2010). The aim of this work was to study the efficacy of BPQ entrapped in a PS-liposomal formulation designed to deliver the drug to the infected organs, thus providing a greater amount of the drug to the infected macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazol blue; MTT), sodium dodecyl sulfate (SDS), M-199 medium, RPMI-PR-1640 medium (without phenol red) and cholesterol were purchased from Sigma–Aldrich. Pentavalent antimony (Glucantime®) was obtained from Aventis–Pharma–Brazil, pentamidine was obtained from Sideron (Brazil), 2-((4-tert-Butylcyclohexyl)methyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (buparvaquone) was obtained from GlaxoSmithKline (UK), and hydrogenated phospholipids were kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). The other analytical reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Experimental animals

Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) and BALB/c mice were obtained from the Instituto Adolfo Lutz of São Paulo, kept in sterile boxes with absorbent material, and received food and water *ad libitum*. Golden hamsters were infected each month with amastigotes from the spleen to maintain the *Leishmania* strains. BALB/c mice were used to obtain peritoneal macrophages.

2.3. Parasites and macrophages

The promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903), *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), and *L. (L.) major* (MHOM/1 L/80/Fredlin) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 0.25% hemin at 24 °C. *L. (L.) infantum chagasi* was maintained in Golden hamsters up to approximately 60–70 days post-infection. The *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes were obtained from the spleens of previously infected hamsters by differential centrifugation. The macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice by washing with RPMI-1640 medium

supplemented with 10% fetal calf serum and were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

2.4. Determination of the *in vitro* anti-leishmanial activity

To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against *Leishmania* promastigotes, the drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with M-199 medium in 96-well microplates. The initial concentrations used were 3.06 μM buparvaquone and 3.21 μM pentamidine. Each drug was tested twice at eight range concentrations prepared at two-fold dilution steps in triplicate. The promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1 × 10⁶/well at a final volume of 150 μL. Controls with DMSO and without drugs were performed. Pentamidine was used as a standard drug. The plate was incubated for 24 h at 24 °C, and the viability of the promastigotes was verified by the diphenyltetrazolium assay (MTT) (Tada et al., 1986). Briefly, MTT (5 mg/mL) was dissolved in PBS and sterilized through 0.22 μm membranes; 20 μL/well was added and incubated for 4 h at 24 °C. Promastigotes incubated without compounds were used as the viability control. The formazan extraction was performed using 10% SDS for 18 h (80 μL/well) at 24 °C, and the optical density (OD) was determined using a plate reader (Multiskan MS – UNISCIENCE) at 550 nm. The data analysis was performed using Graph Pad Prism 5.0 software. A viability of 100% was defined based on the optical density of the control promastigotes after normalization. To determine the IC₅₀ value for BPQ against *L. (L.) infantum chagasi* intracellular amastigotes, peritoneal macrophages (5 × 10⁴ per well) were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice as described above, added to 16-well chamber slides (NUNC®), and incubated for 24 h at 5% CO₂ and 37 °C. *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes were isolated from the spleens of previously infected hamsters, separated by differential centrifugation and added to macrophages at a ratio of 10:1 (amastigotes:macrophage). The plate was further incubated for 24 h prior to drug incubation. Glucantime was used as the standard drug, and the test was performed for 120 h at 37 °C. The initial concentrations used were 3.06 μM buparvaquone and 100 μg/mL Glucantime (shown in μg/mL because the molecular weight of Glucantime is unknown). Each drug was tested twice at eight concentrations prepared as two-fold dilution steps in duplicate. At the end of the assay, the slides were fixed with methanol and stained with Giemsa prior to counting under a light microscope. The IC₅₀ was determined by counting 500 macrophages per well and assessing the number of infected macrophages (Reimão et al., 2010).

2.5. Cytotoxicity against mammalian cells

Peritoneal macrophages, kidney cells from Rhesus monkeys (LLC-MK-2) and tumor-human monocyte cells (THP-1) were incubated with BPQ up to a concentration of 229.75 μM for 48 h at 37 °C. Pentamidine was used as the reference drug. The viability of the mammalian cells was determined using the MTT assay (Tada et al., 1986).

2.6. BPQ entrapment in liposomes

For the liposome preparation, BPQ (6 mg) was diluted in methanol (1575 μL) and sonicated in a bath sonicator for 10 minutes at 25 °C (solution A). Solution B consisted of saturated egg phosphatidylcholine, saturated egg phosphatidylserine and cholesterol (7:2:1 molar ratio) dissolved in chloroform (3150 μL). The mixture of solutions A and B was further sonicated for 10 minutes. The mixture was evaporated in a rotary evaporator at 55 °C at 60 rpm for 40 minutes in a vacuum and protected from light. A pre-heated (55 °C) solution of 2.25% glycerol (9 mL) was added to the lipid film

Table 1

The effect of buparvaquone (BPQ) on parasites and its cytotoxicity in mammalian cells.

	<i>L. (L.) infantum chagasi</i> promastigotes	<i>L. (L.) infantum chagasi</i> amastigotes	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotes	<i>L. (L.) major</i> promastigotes	<i>L. (V.) braziliensis</i> promastigotes	MK2	THP-1	Peritoneal macrophages
BPQ IC ₅₀ μM (95% CI)	2.24 (2.05–2.45)	1.50 (1.41–1.62)	4.19 (3.61–4.87)	3.28 (2.85–3.77)	1.50 (1.16–1.90)	>229.75	>229.75	>229.75

Abbreviations: BPQ: buparvaquone; IC₅₀: inhibitory concentration 50%; 95% CI: 95% confidence interval.

using glass beads. The swelling process of the pre-formed liposomes was performed in a rotary evaporator at 55 °C at 80 rpm for 60 minutes without a vacuum. To reduce the size of the vesicles, the liposomes were sonicated in a bath sonicator under heating (55 °C) for 30 minutes. A freeze-thaw process was performed using three consecutive cycles of freezing with liquid nitrogen followed by thawing at room temperature. The untrapped BPQ was separated from the liposomes by centrifugation (4000g for 15 minutes). The average diameter of the liposomes was determined by transmission electron microscopy using phosphotungstic acid staining (New, 1992).

2.7. Size determination of the liposomes and the quantification of BPQ

The concentration of the encapsulated BPQ was determined using ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) with a binary AT system (Prominence LC-20; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) and an ultraviolet photodiode detector array (PDA) SPD-M20A on a reverse phase ACE C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm particle size). The wavelength was set at 251 nm. The flow rate was 1 mL/minute using an isocratic method with acetonitrile:methanol (7:3 v/v) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The BPQ was diluted in methanol (1 mg/mL) to obtain standard solutions in a range of 1.56–100 μg/mL, and 20 μL samples were injected into the column. The standard curve showed a linear coefficient (*r*) of 0.9988 with the equation $Y = (1.3867 \times 10^{-5})X + (1.22705)$. The mean doses of the different liposome batches resulted in a formulation of 72.63 μg/mL (SEM = 17.27) BPQ. The mean diameter of the vesicles, as determined by transmission electron microscopy, was approximately 561 nm (SEM = 21). Considering the initial and final masses of BPQ, the drug encapsulation efficiency was approximately 11%.

2.8. Experimental studies with *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters

Young male Golden hamsters (110 g) were infected intraperitoneally (i.p.) with *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes (1×10^8 /animal). Forty-three days after the infection, the hamsters were treated for eight consecutive days as follows: BPQ at 20 mg/kg/day, administered i.p. in two doses of 10 mg/kg at an interval of 8 h (*n* = 5/group); BPQ entrapped in PS-liposomes (BPQ-PS-LP) at 0.33 mg/kg/day (*n* = 5/group) and the pentavalent antimonial (Glucantime®) at 50 mg/kg/day (*n* = 5/group). The control group (*n* = 5/group) received the BPQ vehicle (10% ethanol, 15% oil-based Cremophor® EL solution, and 75% PBS). The animals were euthanized 51 days post-infection. A tissue sample of the spleen and liver (approximately 200 mg) was removed, weighed and used for RNA extraction (Reimão et al., 2011).

2.9. Real-time PCR analysis

RNA samples were obtained from the spleen and liver fragments collected from the studied hamsters, and one sample was collected from a healthy animal and used as a negative control. The RNA extraction from the spleen and liver samples and from parasite cultures was carried out as previously described (Reimão

et al., 2011). All TaqMan primers and probes were selected as previously reported (Reimão et al., 2011) and supplied by Applied Biosystems. The amplification runs contained two negative controls (pure water and a negative DNA sample collected from a healthy hamster) and one positive control (DNA sample extracted from a culture of promastigotes of a standard strain of *L. (L.) infantum chagasi*) (Reimão et al., 2011).

2.10. Statistical analysis

The data obtained were reported as the mean and standard deviation of duplicate samples from two independent assays. The IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose-response curves generated by Graph Pad Prism 5.0 software, and the 95% confidence intervals were included. The Mann–Whitney test (unpaired two-tailed) was used for significance testing.

3. Results

3.1. In vitro anti-leishmanial activity and mammalian cytotoxicity

Different concentrations of BPQ were incubated with *Leishmania* spp. promastigotes, and the parasite viability was determined by the colorimetric MTT method. All *Leishmania* species were susceptible to BPQ in the rank order (from low to high IC₅₀ values) of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis*, with IC₅₀ values in the range of 1–4 μM (Table 1). The IC₅₀ of pentamidine was determined for each species and was as follows: *L. (L.) infantum chagasi* (IC₅₀ = 0.32 μM; 95% C.I = 0.23–0.44 μM); *L. (L.) amazonensis* (IC₅₀ = 0.47 μM; 95% C.I = 0.38–0.58 μM); *L. (L.) major* (IC₅₀ = 0.56 μM; 95% C.I = 0.35–0.85 μM); and *L. (V.) braziliensis* (IC₅₀ = 0.09 μM; 95% C.I = 0.03–0.15 μM). BPQ was also active against the intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum chagasi* with an IC₅₀ value of 1.5 μM after 120 h incubation. No toxicity to peritoneal macrophages was observed by light microscopy. Glucantime was used as the standard drug and had an IC₅₀ of 13.06 μg/mL (95% C.I = 5.15–32.73 μg/mL).

BPQ was also incubated with mammalian cells for toxicity studies. LLC-MK2 cells, THP-1 monocytes and BALB/c peritoneal macrophages did not show cytotoxicity at the highest concentration after 48 h (Table 1). Pentamidine was used as a reference and had an IC₅₀ of 11.69 μM (95% C.I = 3.02–42.95 μM) against LLC-MK2; an IC₅₀ of 8.22 μM (95% C.I = 4.55–14.92 μM) against THP-1 cells; and an IC₅₀ of 11.43 μM (95% C.I = 3.02–14.95 μM) against peritoneal macrophages.

3.2. In vivo evaluation of free and liposomal BPQ in *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters

L. (L.) infantum chagasi-infected hamsters were treated i.p. for eight consecutive days with free BPQ and BPQ entrapped in PS-liposomes (BPQ-PS-LP). The parasite burden was further evaluated and quantified by real-time PCR. The untreated group was used as a control and resulted in an average of 1141 (standard error of the mean, SEM = 259) amastigotes per gram in the spleen and 7234 (SEM = 4089) in the liver (Fig. 2). Free BPQ at 20 mg/kg/day did not result in therapeutic improvement, with a mean number

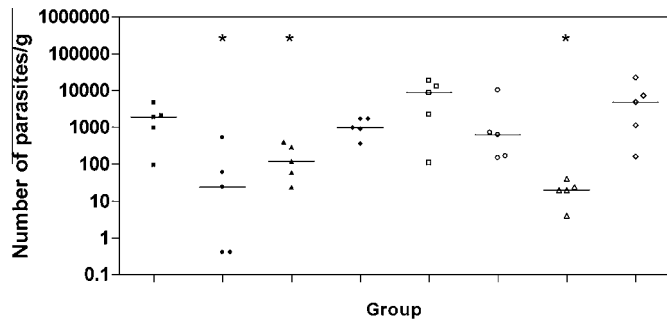


Fig. 2. Real-time PCR quantification (amastigotes per gram in spleen and liver) of the *in vivo* efficacy of free buparvaquone (BPQ) and liposomal BPQ (BPQ-PS-LP). The RNA was extracted from each organ and the samples were weighed. The squares represent free BPQ; the circles represent BPQ-PS-LP; the triangle represents Glucantime and the lozenges represent the untreated control. * $P < 0.05$ compared to untreated group.

of amastigotes per gram in the spleen and liver of 1944 (SEM = 770) and 8532 (SEM = 3424), respectively. BPQ-PS-LP reduced the number of amastigotes by 89.4% ($P < 0.05$) in the spleen and by 67.2% ($P > 0.05$) in the liver, with an average of 120 (SEM = 100) amastigotes per gram in the spleen and 2372 (SEM = 1963) in liver. Glucantime at 50 mg/kg/day reduced the number of amastigotes by 84.3% ($P < 0.05$) and 99.7% ($P < 0.05$), with an average of 179 (SEM = 71) and 21.6 (SEM = 5.7) amastigotes/gram in the spleen and liver, respectively. The BPQ vehicle (control group) and free liposomes (without drugs) did not affect the parasite load (data not shown).

4. Discussion

BPQ has been found to be a promising lead hydroxynaphthoquinone compound against *Leishmania* spp. Despite its high *in vitro* efficacy, with IC_{50} values between 0.005 and 0.12 μ M (Venkatesh et al., 2008), it showed limited efficacy in *L. (L.) donovani*-infected mice when tested at 100 mg/kg/day (Croft et al., 1992). Since its discovery as an anti-leishmanial agent (Croft et al., 1992), several BPQ derivatives have been proposed to overcome the elevated lipophilicity (log $P = 5.3$). As an alternative, water-soluble phosphate prodrugs have been synthesized and were tested in *L. (L.) donovani*-infected mice. Buparvaquone-3-phosphate was shown to be the best oral formulation, but only a slight reduction in the liver parasite burden (34%) could be observed at 50 mg/kg/day (Garnier et al., 2007).

In the present work, BPQ exhibited *in vitro* activity against *Leishmania* spp. when tested against the promastigote forms. The Brazilian cutaneous species were susceptible to BPQ, which had the lowest IC_{50} value in *L. (V.) braziliensis*. BPQ was also effective against other species, such as *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* and *L. (L.) infantum chagasi*, with a similar IC_{50} value to the standard drug pentamidine. *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes were also incubated with BPQ for 72 h, but no change in the IC_{50} values was detected (data not shown). BPQ could also eliminate *L. (L.) infantum chagasi* intracellular amastigotes with a remarkable IC_{50} value approximately 27-fold lower than the standard drug Glucantime®. Furthermore, no *in vitro* toxicity to mammalian cells was detected, resulting in a selectivity index higher than 150 using the *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes. This is the first report of the *in vitro* anti-leishmanial activity of BPQ against *L. (L.) infantum chagasi* and *L. (V.) braziliensis*. Considering the different susceptibilities of the *Leishmania* species to BPQ, the observed IC_{50} value against the intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum chagasi* was consistent with that reported for *L. (L.) donovani* HU3 amastigotes ($IC_{50} = 0.48 \mu$ M) (Mäntylä et al., 2004).

We also report the activity of the BPQ entrapped in PS-liposomes against *L. (L.) infantum chagasi*, the etiologic agent of VL in

Brazil. In this study, BPQ-PS-LP was injected i.p. for eight consecutive days, resulting in a significant ($P < 0.05$) reduction of the number of amastigotes in the spleen (89.4%) when compared to the untreated group. A slight increase in efficacy (approximately 6%) was observed for the BPQ-PS-LP when compared to the standard drug Glucantime ($P > 0.05$). It should also be noted that all hamsters were shown to be highly infected, as confirmed by real-time PCR, therefore preventing the possibility of any false-positive results of the drug efficacy.

Despite the lack of a significant ($P > 0.05$) reduction of the liver parasite burden, the liposomal drug (BPQ-PS-LP) decreased the number of amastigotes by 67% when compared to the untreated group. It should also be noted that when the absolute number of parasites is considered, 80% of animals had fewer than 1000 amastigotes per gram. The treatment differences found in the spleen and liver of the BPQ-PS-LP-treated group could be attributed to the huge differences in the parasite burden of both organs. To achieve similar levels of spleen treatment, a higher amount of a drug must be delivered in a prolonged treatment, as a consequence of the 6-fold higher number of amastigotes in the liver when compared to the spleen. Furthermore, the higher accumulation of PS-liposomes in the spleen (Tempone et al., 2010) might have contributed to the differences found in our assays using the BPQ-PS-LP.

Considering that BPQ-PS-LP was administered at a 60-fold smaller dose than the free drug, these data demonstrate a considerable improvement in the activity of BPQ. This could be a result of the specific targeting delivery of BPQ to the *Leishmania* amastigotes in the infected organs through the interaction of the PS-liposomes with the macrophage scavenger receptors (Tempone et al., 2004). In a previous work (Tempone et al., 2010), furazolidone, a synthetic nitrofurans, when entrapped in a similar formulation of PS-liposomes, showed an enhanced activity when compared to the free drug against *L. (L.) infantum chagasi* experimental model. Furthermore, targeting to spleen and liver was observed, with an *in vivo* co-localization of liposomes within the parasites inside the macrophages (Tempone et al., 2010).

Free BPQ failed to reduce the liver and spleen parasite burden in *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters. Despite the slight increase in the number of amastigotes in both organs, the free BPQ-treated group was not significantly ($P > 0.05$) different than the untreated group (control). The present data support the results obtained from the *L. (L.) infantum chagasi* in naturally infected dogs because no *in vivo* efficacy could be detected after 12 days of treatment at 5 mg/kg (Vexenat et al., 1998). In contrast, free BPQ reduced the parasite burden of mice liver (Croft et al., 1992) infected with *L. (L.) donovani* by approximately 60% but at an oral daily dose of 100 mg/kg. These differences in efficacy could be explained by the different doses, route of administration, the *Leishmania* species and the different animal models used.

The use of real-time PCR has been a promising tool for the rapid evaluation of drug efficacy in animal models (Manna et al., 2008; Reimão et al., 2011) and of parasite kinetics in human blood (Sudarshan et al., 2011). Furthermore, the specific use of RNA allowed the detection of living amastigotes instead of dead parasites or residual DNA (Colombo et al., 2011), which could be found when DNA is analyzed. Thus, the efficacy of BPQ in the hamster model could be precisely quantified in the present work.

5. Conclusions

BPQ was effective *in vitro* against *Leishmania* spp., with an elevated selectivity index. Free BPQ failed to treat *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters, but its inclusion into PS-liposomes is a promising anti-leishmanial formulation with activity at very low dose. Further studies, including understanding the different routes

of administration and determining the 50% effective dose in single-dose and multiple dose regimes, are now planned.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 08/09260-7). The authors thank the CNPq scientific research award given to AGT and the FAPESP scholarship given to JQR (08/11434-3) and to FAC (08/57245-7). We also thank Prof. Dr. Simon L. Croft (London School of Hygiene and Tropical Medicine) for criticism during the preparation of the manuscript and to provide the BPQ.

References

- Bern, C., Adler-Moore, J., Berenguer, J., Boelaert, M., den Boer, M., Davidson, R.N., 2006. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 43, 917–924.
- Colombo, F.A., Odorizzi, R.M., Laurenti, M.D., Galati, E.A., Canavez, F., Pereira-Chiocola, V.L., 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* 109, 267–274.
- Croft, S.L., Hogg, J., Gutteridge, W.E., Hudson, A.T., Randall, A.W., 1992. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30, 827–832.
- den Boer, M.L., Alvar, J., Davidson, R.N., Ritmeijer, K., Balasegaram, M., 2009. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 14, 395–410.
- Frézard, F., Demicheli, C., 2010. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(7), 1343–1358.
- Garnier, T., Mäntylä, A., Järvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., Croft, S., 2007. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 802–810.
- Gokhale, N.H., Padhye, S.B., Croft, S.L., Kendrick, H.D., Davies, W., Anson, C.E., 2003. Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents. 1. Synthesis, X-ray crystal-structures, electrochemistry and antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 95, 249–258.
- Grimaldi Jr., G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230–250.
- Maltezou, H.C., 2008. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery* 3, 192–198.
- Manna, L., Gravino, A.E., Picillo, E., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2008. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 358–360.
- Mäntylä, A., Mäntylä, A., Garnier, T., Rautio, J., Nevalainen, T., Vepsäläinen, J., 2004. Synthesis, in vitro evaluation and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 188–195.
- Müller, R.H., Jacobs, C., 2002. Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability. *International Journal of Pharmaceutics* 237, 151–161.
- Murray, H.W., 2001. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2185–2297.
- New, R.R.C., 1992. *Liposomes: A Practical Approach*. University Press, Oxford.
- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chiocola, V.L., Tempone, A.G., 2011. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Experimental Parasitology* 128, 111–115.
- Reimão, J.Q., Taniwaki, N.N., Tempone, A.G., 2010. Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. *Parasitology Research* 106, 1465–1469.
- Sudarshan, M., Weirather, J.L., Wilson, M.E., Sundar, S., 2011. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 1751–1755.
- Sundar, S., Sinha, P.K., Verma, D.K., Kumar, N., Alam, S., Pandey, K., 2011. Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 115–117.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods* 93, 157–165.
- Tempone, A.G., Mortara, R.A., de Andrade, H.F., Reimão, J.Q., 2010. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36, 159–163.
- Tempone, A.G., Perez, D., Rath, S., Vilarinho, A.L., Mortara, R.A., de Andrade, H.F., 2004. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 60–68.
- Torres, D.C., Adai, V., Ribeiro-Alves, M., Romero, G.A., Arévalo, J., Cupolillo, E., Dujardin, J.C., 2010. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 727–733.
- Venkatesh, G., Majid, M.I., Ramanathan, S., Mansor, S.M., Nair, N.K., Croft, S.L., 2008. Optimization and validation of RP-HPLC-UV method with solid-phase extraction for determination of buparvaquone in human and rabbit plasma: application to pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* 22, 535–541.
- Vexenat, J.A., Croft, S.L., Furtado-Campos, J.H., Miles, M.A., 1998. Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 77, 71–73.

ANEXO 10

Repurposing drugs for visceral leishmaniasis: experimental evaluation of calcium channel blockers and a liposomal formulation of nimodipine

Abstract

Considering that calcium channel blockers (CCB) may be potential anti-leishmanial compounds and considering the need for alternative treatments for Leishmaniasis and American Trypanosomiasis, the present work evaluated the *in vitro* activity of amrinone, fendiline, lidoflazine and mibefradil against different species of *Leishmania* and *T. cruzi* parasites. The *in vivo* efficacy of amlodipine, fendiline and nimodipine against *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infected hamsters was also examined. The *in vitro* cytotoxicity in mammalian cells was determined to provide the selectivity index. Finally, a liposomal formulation of nimodipine-containing phosphatidylserine was developed, and its effectiveness was evaluated *in vivo* in the spleen and liver of hamsters using real time PCR. The *in vitro* results demonstrated that fendiline, lidoflazine and mibefradil were active against *Leishmania* spp. promastigotes ($IC_{50} = 2$ to $21 \mu M$), but only fendiline and lidoflazine were active against *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes ($IC_{50} = 11$ and $15 \mu M$, respectively). The tested CCB were effective against *T. cruzi* trypomastigotes ($IC_{50} = 2$ to $11 \mu M$), and lidoflazine was the most selective drug in both models. The *in vivo* studies revealed a lack of activity for amlodipine, fendiline and nimodipine, but the liposomal nimodipine caused a significant decrease (97 %) in the parasite burden of the spleen, suggesting a higher efficacy only when entrapped into phosphatidylserine-liposomes. Novel treatments are need for visceral leishmaniasis, and liposomes represent a promising alternative for the targeted delivery of drug candidates.

Keywords: *Leishmania*, *T. cruzi*, therapy, drugs, calcium channel blocker, liposomes

1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, family Trypanosomatidae. The disease has four major forms: cutaneous, mucocutaneous, cutaneous-diffuse and visceral leishmaniasis (VL). VL, the most severe form, is characterized by the migration of parasites to vital organs and is a fatal disease in the absence of treatment (Tiuman et al., 2011). Currently, Leishmaniasis represents an important public health threat in 98 countries: there are 12 million cases worldwide, 350 million people at risk, and 500,000 new cases of VL per year (WHO, 2010, Desjeux, 2010). The available treatment for VL has low efficacy, severe adverse effects and an elevated cost. For almost a century, antimony has been the conventional treatment; however, in India, increasing resistance has necessitated new treatment approaches such as amphotericin B and its lipid formulations, injectable paromomycin, and oral miltefosine (Tiuman et al., 2011). Considering the few therapeutic options to treat LV, the need for novel drugs is evident (Moore, Lockwood, 2010).

Calcium channel blockers (CCB) are considered to be promising anti-parasitic drugs, especially against protozoan parasites. The *in vivo* oral efficacy of amlodipine and lacidipine against *L. (L.) donovani* has been shown using the BALB/c mice model (Palit and Ali, 2008). Recently, the *in vitro* anti-parasitic activity of eight clinically used 1,4-dihydropyridines was demonstrated against *Leishmania* and *T. cruzi* parasites (Reimão et al., 2010). It has also been reported that nifedipine and verapamil can effectively inhibit macrophage infection by *L. (L.) donovani* (Misra et al. 1991), suggesting the participation of calcium ions in the internalization process. In addition, verapamil was demonstrated to effectively reverse antimony resistance in *L. (L.) donovani* parasites (Valiathan et al., 2006).

The use of Drug Delivery Systems (DDS) for old drugs is an important strategy to overcome the severe adverse effects of a toxic drug, providing higher patient compliance (Yang et al., 2008). In the present work, CCB were tested against *Leishmania* and *T. cruzi* parasites, and their cytotoxicity in mammalian cells was evaluated. The investigation of the *in vivo* efficacy of amlodipine, fendiline and nimodipine, including a liposomal formulation of nimodipine, was demonstrated in *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

DMSO, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, thiazol blue), sodium dodecyl sulfate, RPMI-1640 medium, M199 medium, amrinone, fendiline, lidoflazine, mibefradil, and nimodipine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Pentavalent antimony (Glucantime®) was obtained from Aventis, and pentamidine from Sideron. Amlodipine was kindly donated by Bayer (São Paulo, SP, Brazil). Hydrogenated phospholipids were kindly donated by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Other analytical reagents were purchased from Sigma unless otherwise stated.

2.2. Experimental animals

Golden hamsters and BALB/c mice were supplied by the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute of São Paulo. They were maintained in sterilized cages under a controlled environment and received water and food *ad libitum*. Golden hamsters were infected each month with amastigotes from the spleen to maintain the parasite. BALB/c mice were used for obtaining peritoneal macrophages. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission, in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

2.3. Parasites and macrophages

Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903), and *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24° C. *L. (L.) infantum chagasi* was maintained in Golden hamsters up to approximately 60–70 days post-infection. *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes were obtained from the spleen by differential centrifugation at the 60–70th day post-infection. Macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c mice by washing with RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and were maintained at 37° C in a 5% CO₂-humidified incubator. *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes (Y

strain) were maintained in LLC-MK2 (ATCC CCL 7) cells using RPMI-1640 medium supplemented with 2% calf serum at 37° C.

2.4. Determination of the *in vitro* anti-leishmanial activity

To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against *Leishmania* promastigotes, the drugs were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted with M-199 medium in 96-well microplates, with 100 µg/mL as the highest concentration. Each drug was tested twice at eight concentrations prepared in two-fold dilutions. Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1×10^6 /well, with a final volume of 150 µL. Controls with DMSO and without drugs were performed. Pentamidine was used as a standard drug. The plate was incubated for 24 h at 24° C, and the viability of promastigotes was verified by the diphenyltetrazolium assay (MTT) (Tada et al., 1986). Briefly, MTT (5 mg/mL) was dissolved in PBS, sterilized through 0.22 µm membranes, and 20 µL/well was added for 4 h at 24° C. Promastigotes were incubated without compounds and used as a viability control. Formazan extraction was performed using 10% SDS for 18 h (80 µL/well) at 24° C, and the optical density (OD) was determined in a Multiskan MS (UNISCIENCE) plate reader at 550 nm. Pentamidine was used as a standard drug. The data analysis was performed in Graph Pad Prism 5.0 software. 100% viability was expressed based on the optical density of control promastigotes, after normalization. To determine the IC₅₀ value against *L. (L.) infantum chagasi* intracellular amastigotes, peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of BALB/c as described above and added to 16-well chamber slides (Lab-Tek - NUNC ®) at 5×10^4 per well. Plates were incubated at 5% CO₂ at 37° C for 24 hours. *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes extracted from spleens and separated by differential centrifugation were added to macrophages at a ratio of 10:1 (amastigotes:macrophage). After 24 hours, extracellular parasites were removed by washing, fresh medium containing the drugs and controls was added, and the cells were incubated at 37° C for a period of 120 hours. Further medium changes with fresh drugs were carried out after 72 hours. At the end of the assay, the slides were stained with Giemsa and observed using light microscopy. Glucantime was used as a standard drug. The IC₅₀ was determined by the number of infected macrophages out of 400 cells.

2.5. Determination of the anti-trypanosomal activity

To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, drugs were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted with M-199 medium in 96-well microplates, with the highest concentration at 100 µg/mL. Trypomastigotes, obtained from LLC-MK2 cultures, were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1 x 10⁶/well in 96-well microplates. Test drugs were incubated for 24 h at 37° C in a 5% CO₂ humidified incubator, and the viability of trypomastigotes was verified by the diphenyltetrazolium assay (MTT) as described above. Benznidazole was used as a standard drug.

2.6. Cytotoxicity in mammalian cells

Kidney *Rhesus* monkey cells (LLC-MK2) were seeded at 5 x 10⁴ cells/well in 96-well microplates and incubated with drugs, with 200 µg/mL as the highest concentration, for 48 h at 37° C in a 5% CO₂ humidified incubator. The viability of the cells was determined by the MTT assay as described above. Control cells were incubated in the presence of DMSO and without drugs. Viability of 100% was expressed based on the optical density of control LLC-MK2 cells, after normalization. The Selectivity Index (SI) was given by the ratio between the cytotoxicity in LLC-MK2 cells and the anti-parasitic activity.

2.7. Nimodipine entrapment in liposomes

Liposomes were prepared by the lipid hydration method followed by extrusion through 0.2 µm polycarbonate membranes (Szoka, Papahadjopoulos, 1980). For liposome preparation, saturated egg phosphatidylcholine, phosphatidylserine and cholesterol were used at a 7:2:1 molar ratio. Untrapped material was separated from the liposomes by centrifugation (4000 x g for 15 min). The concentration of encapsulated nimodipine was determined in a ultra-performance liquid chromatography (UPLC) binary system (Prominence LC-20; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) using an ultraviolet photodiode array (PDA) detector SPD-M20A on a reverse phase ACE C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5 µm particle size). The flow rate was 1 mL/min, using an isocratic method with acetonitrile:methanol (v/v 7:3). Nimodipine was diluted in methanol (1 mg/mL) to

obtain standard solutions in a range concentration between 200 to 6.25 µg/mL; samples of 20 µL were injected in the UPLC. Different batches of liposomes were analyzed. Briefly, liposomal nimodipine (10 µL) was diluted 10-fold in methanol:ethanol (1:1), and 20 µL aliquots were injected in the UPLC. A linear regression ($Y = ax + b$) was obtained using the LC Solution 1.24 software (Shimadzu-Japan).

2.8. Experimental studies with *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters

Young male golden hamsters (120 g) were previously infected (intraperitoneal route) with *L. (L.) infantum chagasi* amastigotes (1.8×10^8 /animal). Forty-five days after infection, the hamsters were intraperitoneally treated for ten consecutive days with amlodipine at 10 mg/kg/day (n = 5), fendiline at 3 mg/kg/day (n = 5), nimodipine at 40 mg/kg/day (n = 5) or Glucantime at 50 mg/kg/day (n = 5). Amlodipine, fendiline and nimodipine were diluted in PBS containing Cremophor® EL and ethanol (ratio = 80:15:5 v/v). The control group (n = 5/group) received the vehicle without any drugs. The concentration of nimodipine entrapped in liposomes was previously determined (as described above), and liposomal nimodipine was intraperitoneally administered for 10 consecutive days at 0.86 mg/kg/day (n = 5). The animals were euthanized 57 days post-infection. Tissue samples of the spleen and liver (approximately 200 mg) were removed, weighed and used for RNA extraction (Reimão et al., 2011).

2.9. Real-time PCR analysis

The number of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes was estimated using a hemocytometer and was used to prepare a standard curve ranging from 10^2 to 10^8 forms (Reimão et al., 2011). RNA samples were obtained from spleen and liver fragments collected from the studied hamsters, and one sample was collected from a healthy animal and used as a negative control. RNA extraction from the spleen and liver samples and from the parasite cultures was performed as previously described (Reimão et al., 2011). All TaqMan primers and probes were selected as previously reported and supplied by Applied Biosystems (Reimão et al., 2011). The amplification runs contained two negative controls (pure water and a negative DNA sample collect from a hamster without

leishmaniasis or treatment) and one positive control (DNA sample extracted from a culture of promastigotes - standard strain of *L. (L.) infantum chagasi*). The results were shown as the number of parasites per gram in the spleen and liver, calculated by the cycle threshold value (C_T) that informed the quantity of the target gene at which the fluorescence exceeded a preset threshold, and were automatically determined by the equipment. The RNA was extracted from each organ, and the number of parasites was obtained by calculating the number of C_T , using a standard curve (Reimão et al., 2011).

2.10. Statistical analysis

The IC_{50} values were calculated using sigmoidal dose-response curves in Graph Pad Prism 5.0 software, and the 95% confidence intervals are indicated. The data obtained represented the mean and standard deviation of two independent assays. The Mann-Whitney test (unpaired two-tailed) was calculated in Graph Pad Prism 5.0 software for determining the significance ($P < 0.05$) of the parasitic burden and treatment.

3. Results and discussion

The CCB are a class of drugs that disrupt the movement of calcium through calcium channels (Motro, Shemesh, Grossman, 2001). CCB have effects on many excitable cells of the body, such as the cardiac muscle, the smooth muscles of blood vessels, and neurons. The most widespread clinical usage of CCB is to decrease blood pressure in patients with hypertension, with particular efficacy in the treatment of elderly patients (Nelson 2010). In addition, CCB are frequently used to control heart rate, prevent cerebral vasospasm, and reduce chest pain due to angina pectoris.

In this work, we used the drug repurposing approach. Amrinone, fendiline, lidoflazine and mibefradil were incubated with *Leishmania* spp. promastigotes, intracellular amastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes to evaluate their *in vitro* anti-parasitic activity (Table 1). Fendiline, lidoflazine and mibefradil showed IC_{50} values ranging from 2.2 to 21.97 μ M against *Leishmania* promastigotes, and mibefradil was the most active compound. However, mibefradil showed lack of activity against *L. (L.) infantum chagasi* intracellular

amastigotes, possibly due to the lack of macrophage-specific receptors, leading to a non-internalized drug or to the higher metabolic resistance of amastigotes (Sadick and Raff, 1985). When *Leishmania* intracellular amastigotes were examined, fendiline demonstrated a similar activity to lidoflazine, but a higher selectivity could be observed for lidoflazine (SI = 5.7).

Despite the previous report of the anti-leishmanial activity of 1,4-dihydropyridines (Reimão et al, 2010), amrinone, an aminopyridine compound, lacked anti-leishmanial activity in our assays. Conversely, another closely related compound, 4-aminopyridine, exhibited considerable activity against *L. (L.) amazonensis*, with an IC₅₀ value of 46 µM (Ponte-Sucre et al, 1998), but lacked activity against the Old-World cutaneous *L. (L.) major* (IC₅₀ > 400 µM).

The anti-trypanosomal activity was also examined. The compounds fendiline, lidoflazine and mibefradil were effective against *T. cruzi* trypomastigotes, with IC₅₀ values ranging from 2.94 to 11.76 µM (Table 1); amrinone was ineffective at the highest tested concentration. Mibefradil, a tetrahydronaphthalene compound, was the most highly active against *T. cruzi*, showing similar IC₅₀ value to 1,4-dihydropyridine azelnidipine (IC₅₀ = 2.90 µM) (Reimão et al., 2010). Lidoflazine showed the highest SI against *T. cruzi* (SI = 8.73) and *Leishmania* (SI = 5.71) (Table 1). Piperazine-derived compounds have been proposed to be potent anti-leishmanial candidates, with promising activity against *L. (L.) donovani* (IC₅₀ = 0.41 µM) (Mayence et al, 2004). This is the first report of anti-protozoal activity of these CCB, which confirms their potential use as drug prototypes against protozoan parasites. In a previous work, the 1,4-dihydropyridines lacidipine and isradipine demonstrated *in vitro* activity against *T. cruzi* epimastigotes (IC₅₀ = 33.5 and 20.8 µM, respectively) (Nuñez-Vergara et al., 1998), showing a similar activity to fendiline and lidoflazine against *T. cruzi* trypomastigotes (IC₅₀ = 11.76 and 10.23 µM, respectively) (Table 1).

Considering the *in vitro* anti-leishmanial activity of fendiline, the previous *in vitro* activity of nimodipine against *L. (L.) infantum chagasi* (Tempone et al, 2009) and the *in vivo* activity of amlodipine against *L. (L.) donovani* (Palit and Ali, 2008), these three CCB were tested against *L. (L.) infantum chagasi*, using the hamster model. The evaluation of *in vivo* treatment was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) to detect living amastigotes (RNA) in the

spleen and liver after treatment. Previous studies have also reported the use of qPCR, which proved to be a sensitive technique for quantifying *Leishmania* after drug treatment in experimental models (Reimão et al. 2011, Sudarshan et al, 2011, Dantas-Torres et al, 2011, Galleti et al, 2011).

Our results demonstrated that the selected CCB were devoid of *in vivo* activity. In contrast to the results found by Palit and Ali (2008) against *L. (L.) donovani*, our results demonstrated that amlodipine was ineffective *in vivo* against *L. (L.) infantum chagasi*, as no significant difference between the drug and the control group was found (Figure 2A). However, different drug susceptibilities among *Leishmania* species have been found. Miltefosine, an oral anticancer drug, has been successfully (> 90% cure rate) used in India against Leishmaniasis but showed only a 33% to 63% cure rate in clinical studies in Guatemala and Afghanistan (Soto and Soto, 2006). Other important aspects could also have contributed to the differences between our results and others: (i) the different experimental method (mouse vs. hamster); (ii) the different route of administration (oral vs. intraperitoneal) and (iii) the different treatment regimen (weekly administration vs. daily administration for 10 days). Moreover, the lack of *in vivo* activity of amlodipine in the present work could be attributed to a poor biodistribution to infected macrophages in the spleen and liver.

Although fendiline has exhibited *in vitro* selectivity (Table 1) and promising IC₅₀ values against *Leishmania*, fendiline was not able to reduce the parasite load in the spleen and liver of infected hamsters (Figure 2B). Despite the low administered dose (3 mg/kg/day) when compared to the standard drug Glucantime (50 mg/kg/day), toxicological data (LD₅₀ in mice = 14.5 mg/kg i.v.) (www.druglead.com) limited its testing at higher doses.

Nimodipine, a 1,4-dihydropyridine, has exhibited *in vitro* activity against *L. (L.) infantum chagasi*, contributing to extensive mitochondrial damages in parasites (Tempone et al, 2009). In our present work, nimodipine lacked *in vivo* anti-leishmanial activity, as no significant differences could be observed between the test drug and control group ($P > 0.05$) (Figure 2 C). Similar to the currently tested drugs, our previous studies with bepridil also demonstrated a lack of *in vivo* effectiveness against *L. (L.) infantum chagasi* (Reimão et al., 2011).

Therefore, considering the lack of anti-leishmanial activity of the tested CCB, a drug delivery system (DDS) was also examined. DDS have been developed to deliver drugs to the site of action (targeted delivery), to avoid fluctuations in plasma drug levels (controlled release), to slow the drug release in plasma and to overcome cellular barriers and enzymatic degradation (Kshirsagar et al., 2005). Considering the anti-parasitic effect of 1,4-dihydropyridines (Misra et al., 1991; Núñez-Vergara et al., 1998; Tempone et al., 2009; Reimão et al., 2010; Reimão et al., 2011), nimodipine was entrapped in phosphatidylserine-liposomes, quantified by liquid chromatography and further administered to *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters. The amount of nimodipine entrapped in liposomes was previously determined by RP-UPLC-PDA, using a standard curve of the drug ($r^2 = 0.99898$). The results indicated a minor variation of nimodipine encapsulation among the different batches, which resulted in an overall concentration of 515.64 $\mu\text{g/mL}$ (SEM = 44.36) (Figure 3). In the experimental treatment, liposomal nimodipine induced a significant ($P < 0.05$) decrease (approximately 97%) in the parasite burden in the spleen when compared to the untreated group. Conversely, liposomal nimodipine demonstrated no ability to reduce the parasite burden in the liver, likely due to the small amount of nimodipine administered in the liposomal formulation (a 46-fold smaller dose than the free nimodipine). Additionally, these results corroborate the efficiency of this liposomal formulation in the targeted delivery of drugs to *Leishmania*, which is primarily due to the interaction of phosphatidylserine-liposomes with macrophage scavenger receptors (Tempone et al., 2004). A similar result was also achieved with a similar liposomal formulation that used furazolidone as the active compound (Tempone et al., 2010). These results suggest preferential targeting to the spleen rather than the liver, but the use of higher doses of drugs entrapped in the liposomes might overcome this problem.

5. Conclusions

Calcium antagonists have been studied as possible drug candidates against protozoan parasites because of *in vitro* results (Tempone et al, 2009, Reimão et al, 2010, Palit et al, 2008). The present results demonstrate the need

for continuous experimental studies with CCB, as pharmacokinetic and pharmaco-dynamic issues contribute to different results. Our data also suggest the use of phosphatidylserine-liposomes as a potential drug delivery system for Visceral Leishmaniasis, which could represent a promising tool to increase the therapeutic index of drugs. Further studies should be considered, including examining different routes of administration, different dose regimens and higher administered doses.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 08/09260-7). We also acknowledge the CNPq scientific research award given to AGT and the FAPESP scholarship given to JQR (08/11434-3) and FAC (08/57245-7).

Figure and table legends

Figure 1: Chemical structures of amrinone (A), fendiline (B), lidoflazine (C) and mibefradil (D).

Figure 2: Evaluation of the experimental treatment of BCCs against *L. (L.) infantum chagasi*-infected hamsters. Real-time PCR quantification of *Leishmania* amastigotes per gram in the spleen and liver after administration of amlodipine (A), fendiline (B), and nimodipine (C). The RNA was extracted from each organ, and the samples were weighed. The filled symbols represent the spleen, and the open symbols represent the liver. * $P < 0.05$ compared to the untreated group.

Figure 3: Quantification of nimodipine in phosphatidylserine-liposomes by RP-UPLC-PDA. The standard curve of nimodipine was developed using a reverse phase C18 column in an isocratic method of acetonitrile:methanol (7:3) at 1 mL/min flow. The chromatogram obtained at 236 nm (A), and the standard curve of nimodipine (B).

Table 1: Effect of CCB and standard drugs on parasites and mammalian cells. IC₅₀: 50% inhibitory concentration; 95% CI: 95% confidence interval. *Concentrations for Glucantime are expressed as µg/mL, as the molecular weight is unknown.

Figure 1.

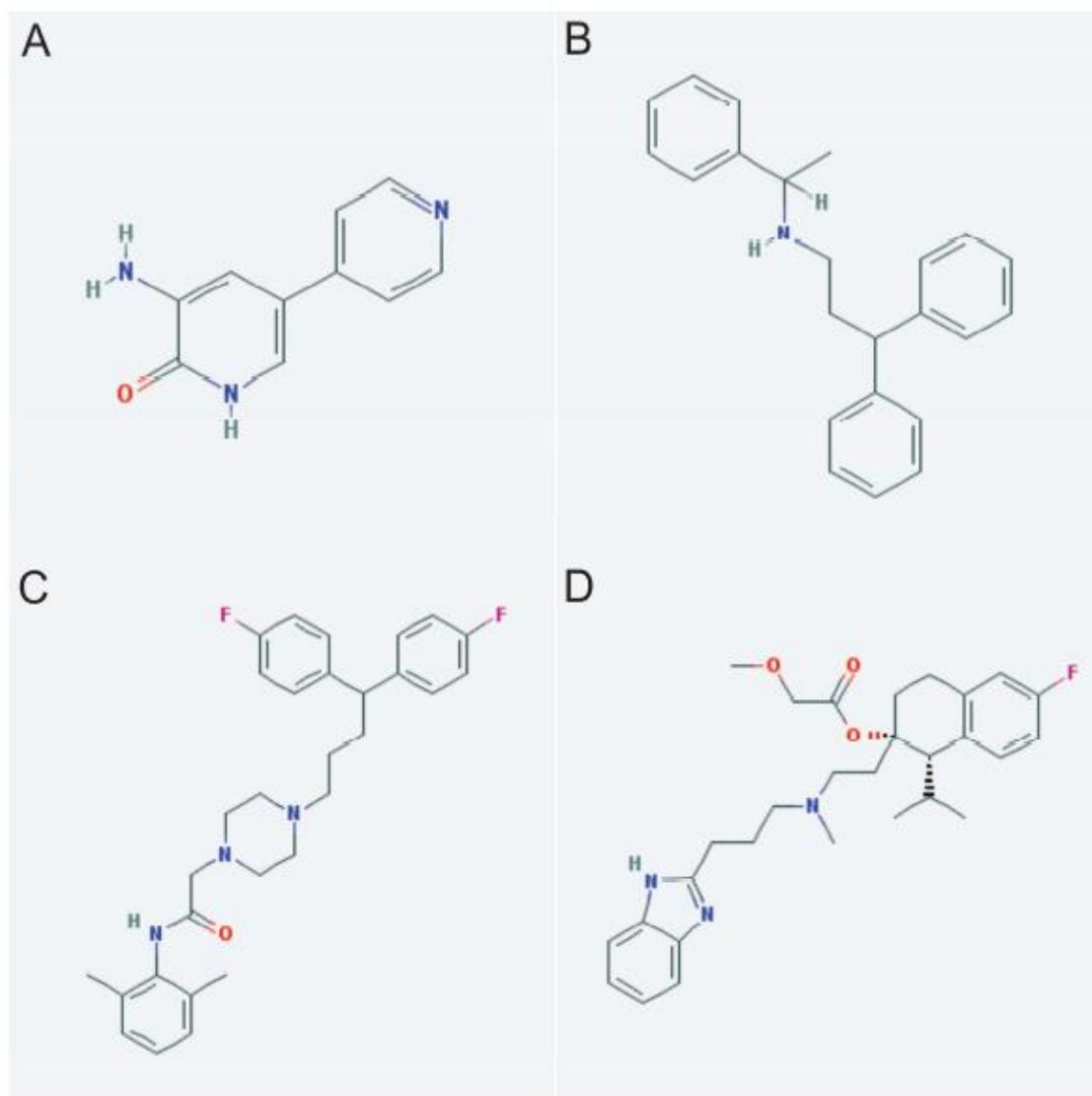


Figure 2.

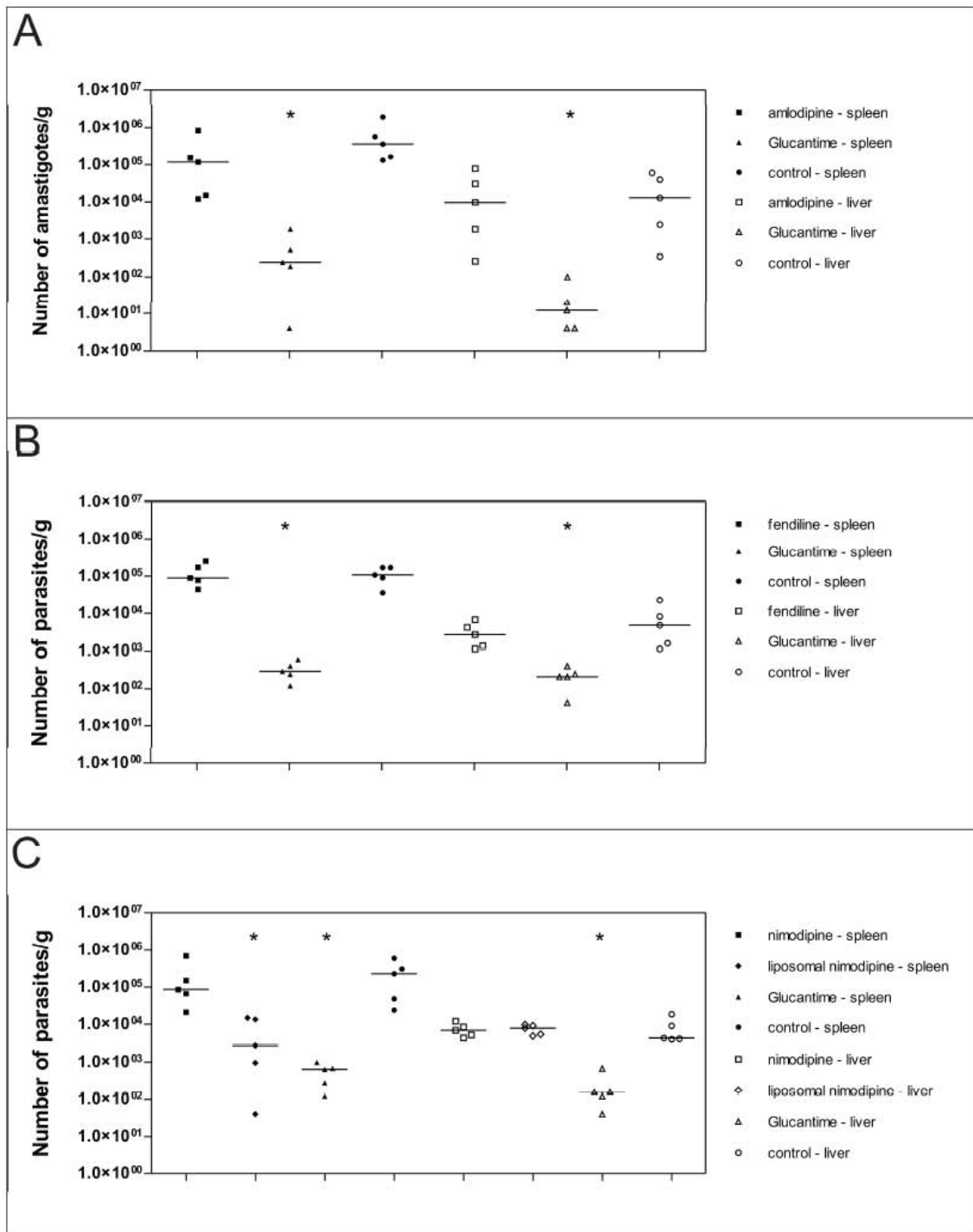


Table 1.

Compound	IC ₅₀ (µM) (CI 95%)						Selectivity index		
	<i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i> promastigotes	<i>L. (L.) infantum</i> <i>chagasi</i> amastigotes	<i>L. (L.)</i> <i>amazonensis</i> promastigotes	<i>L. (V.)</i> <i>braziliensis</i> promastigotes	<i>T. cruzi</i> trypomastigotes	MK2 cytotoxicity	<i>L. (L.) chagasi</i> amastigotes	<i>T. cruzi</i> trypomasti gotes	<i>T. cruzi</i> trypomasti gotes
Amrinone	ne	ne	ne	ne	618.06 (515.12 – 741.46)	> 2671	nd	nd	> 4.3
Fendiline	21.97 (11.95 – 40.35)	11.63 (10.46 – 13.93)	8.56 (7.39 – 9.92)	9.09 (8.37 – 9.92)	11.76 (9.16 – 15.09)	49.20 (41.69 – 58.01)	4.23	4.18	4.18
Lidoflazine	17.63 (16.74 – 18.59)	15.66 (11.84 – 20.73)	11.45 (10.05 – 13.02)	14.44 (13.40 – 15.56)	10.23 (8.52 – 12.26)	89.38 (48.55 – 164.52)	5.71	8.73	8.73
Mibefradil	3.47 (3.49 – 3.71)	ne	2.20 (1.81 – 2.64)	2.70 (2.36 – 3.13)	2.94 (2.56 – 3.41)	11.92 (10.93 – 12.99)	nd	4.05	4.05
Pentamidine	1.06 (0.94 – 1.17)	nd	1.12 (0.99 – 1.29)	0.67 (0.65 – 0.73)	nd	nd	nd	nd	nd
Glucantime*	nd	6.91 (6.18 – 7.74)	nd	nd	nd	> 500	> 72.36	nd	nd
Benznidazole	nd	nd	nd	nd	293.68 (196.23 – 391.12)	> 1921	nd	> 6.54	> 6.54

ANEXO 11

Participação em projetos paralelos

Ao longo do período em que esta tese foi desenvolvida, a aluna participou de colaborações científicas envolvendo o estudo de novos compostos com atividade contra *Leishmania* e *Trypanosoma*. Os artigos científicos resultantes destes trabalhos são listados a seguir:

1. Grecco SS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Cunha RL, Romoff P, Ferreira MJ, Fávero OA, Lago JH. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Exp Parasitol* 2012; 130:141 – 5.
2. Corrêa DS, Tempone AG, Reimão JQ, Taniwaki NN, Romoff P, Fávero OA, Sartorelli P, Mecchi MC, Lago JH. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). *Parasitol Res* 2011; 109:231-6.
3. Morais TR, Romoff P, Fávero OA, Reimão JQ, Lourenço WC, Tempone AG, Hristov AD, Di Santi SM, Lago JH, Sartorelli P, Ferreira MJ. Anti-malarial, anti-trypanosomal, and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). *Parasitol Res* 2012; 110:95-101.
4. Sartorelli P, Carvalho CS, Reimão JQ, Lorenzi H, Tempone AG. Antitrypanosomal Activity of a Diterpene and Lignans Isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Medica* 2010; 76:1454-6.
5. Siqueira CAT, Oliani J, Sartoratto A, Queiroga CL, Moreno PRH, Reimão JQ, Tempone AG, Fischer DCH. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* Mart., Annonaceae, and in vitro antiprotozoal activity. *Rev Bras Farmacognosia* 2010; 21:33-40.
6. Grecco SS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Romoff P, Ferreira MJ, Fávero OA, Lago JH. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Parasitol Res* 2010; 106:1245-8.
7. Sartorelli P, Salomone CS, Reimão JQ, Ferreira MJ, Tempone AG. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). *Parasitol Res* 2009; 104:311-4.

ANEXO 12



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174



São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Ilmo (a)

Prof. Dr. ... Andre Gustavo Tempone Cardoso do

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número 031/08 e intitulado "Combinações terapêuticas na leishmaniose visceral: o potencial anti-leishmania de bloqueadores de canais de cálcio e o uso de nanoformulações lipossomais", sob a responsabilidade e do Dr Heitor franco de Andrade Jr,

Atenciosamente



Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP