

Juliana Tonini Mesquita

Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e
associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum*

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

Co-orientadora: Dra. Juliana Quero Reimão.

SÃO PAULO

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mesquita, Juliana Tonini

Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L) infantum* / Juliana Tonini Mesquita – São Paulo, 2013.

Dissertação (mestrado) - 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

Co-orientadora: Juliana Quero Reimão

1. Fármacos 2. Terapêutica 3. *Leishmania* 4. Farmacologia
5. Reposicionamento de medicamentos 6. Mitocôndrias

SES/CCD/CD-273/13

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

Dedido este trabalho aos meus queridos familiares e aos pacientes com Leishmaniose espalhados ao redor do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me permitir desenvolver este trabalho.

Aos meus queridos pais Bernardete e Armando pelo imenso apoio, amor, paciência, incentivo, carinho e compreensão ao longo desses anos e principalmente nesses últimos seis meses.

Ao meu irmão Rafael pela oportunidade, confiança e incentivo, e também aos meus familiares que de certa forma contribuíram nesse trabalho, em especial meus primos Ricardo e Juliana.

Ao meu orientador professor doutor André Gustavo Tempone pela oportunidade, confiança, apoio, conhecimento, compreensão, amizade e carinho nos diversos obstáculos que encontramos ao longo desse trabalho.

À minha co-orientadora doutora Juliana Quero Reimão por compartilhar seus conhecimentos, pela ajuda, paciência, atenção e amizade depositadas ao longo desse trabalho.

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

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida (processo 132336/2011-1).

À professora doutora Noemi Nosomi Taniwaki pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e ao professor doutor Andres Jimenez Galisteo Jr e à aluna de doutorado Nahiara Esteves Zorgifor pela citometria de fluxo.

Aos técnicos de laboratório Matilia Nascimento e Vicente Duarte pela assistência e ajuda laboratorial prestada, além do companheirismo e amizade ao longo desta jornada.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz pela convivência.

Às minhas amigas do laboratório de Toxinologia Aplicada Daiane, Daniela, Érika, Isabela, Lígia, Marta, Renata, Thaís e Walkyria, além das amigas do laboratório de Biologia Molecular Cida, Cristina, Inara, Gabriela e Kate, e os amigos Alexandre, Dan, Fábio, Jeferson, Luís e Ricardos pela ajuda, paciência, conhecimento e momentos de descontração.

Em especial, agradeço a amiga Tatiana pela ajuda, paciência, companheirismo e amizade ao longo deste trabalho.

Enfim, sou grata a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada endêmica em 68 países e que se tornou um grande problema na área da saúde pública. Essa doença afeta principalmente populações menos favorecidas, onde o acesso, os cuidados médicos e a terapia medicamentosa são limitados. Visando buscar novas alternativas para o tratamento da LV, o reposicionamento de fármacos oferece uma grande oportunidade para introdução de novas terapias. Por meio desta abordagem, foi realizada em *Leishmania (Leishmania) infantum*: i) a triagem de oito fármacos nitrogenados, sendo eles: bifonazol, clotrimazol, cloxazolam, econazol, hidroxizina, loratadina, nitazoxanida e quetiapina; ii) o estudo da ação letal dos fármacos loratadina e nitazoxanida, e iii) o estudo *in vitro* da associação do fármaco nitazoxanida com fármacos padrões. Para isto, os possíveis mecanismos de ação foram estudados por meio de ensaios fluorimétricos, visando avaliar alteração de permeabilidade de membrana plasmática, alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, exposição de fosfatidilserina, assim como o estudo das alterações ultraestruturais. Os resultados mostram que todos os fármacos apresentaram atividade contra formas promastigotas, com concentração efetiva 50% (CE₅₀) entre 2 e 167 µM; apenas o econazol e a nitazoxanida eliminaram os amastigotas intracelulares, com CE₅₀ de 11 a 22 µM, respectivamente. O fármaco loratadina alterou a permeabilidade da membrana plasmática do parasita, causando poros e levando o parasita a morte. O estudo da ação letal da nitazoxanida em *Leishmania* sugere que o fármaco tenha como alvo a mitocôndria, considerando a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo e morte celular. Além disso, a presença de marcadores específicos como a exposição de fosfatidilserina e alterações ultraestruturais específicas, sugerem que o fármaco possa induzir a morte celular programada. O estudo da associação entre nitazoxanida e os fármacos anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina demonstrou interações indiferentes; porém, as somatórias da concentração inibitória fracionária (Σ CIF) de nitazoxanida:anfotericina B (1:4 v/v), assim como de nitazoxanida:Glucantime[®] (2:3 v/v) foram bastante próximas do valor considerado como sinergismo. Sendo assim, os fármacos estudados poderiam contribuir para a descoberta de novos alvos terapêuticos em *L. (L.) infantum* e as associações de nitazoxanida poderiam ser avaliadas em modelos animais, já que não se observou antagonismo *in vitro*.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease endemic in 68 countries and has been considered a major problem in public health. The disease affects mainly underprivileged populations, where access, medical care and therapeutical treatment are limited. In the search for new alternatives for the treatment of VL, drug repurposing offers a great opportunity to introduce new therapies. By using this approach, we have performed the following assays with *Leishmania (Leishmania) infantum*: i) screening of eight nitrogenated drugs as bifonazole, clotrimazole, cloxazolam, econazole, hydroxyzine, loratadine, nitazoxanide and quetiapine; ii) the lethal action study of loratadine and nitazoxanide, and iii) the *in vitro* association of nitazoxanide with standard drugs. We have also studied the lethal action of nitazoxanide and loratadine using fluorimetric probes, in order to evaluate changes in permeability of the plasma membrane, mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species, phosphatidylserine exposure, as well as the study of ultrastructural damages. The results demonstrated that 100% of drugs showed activity against promastigotes, with 50% effective concentration (EC_{50}) values between 2-167 μ M; only econazole and nitazoxanide eliminated intracellular amastigotes, with EC_{50} values of 11 and 22 μ M, respectively. The drug loratadine altered the permeability of the plasma membrane of the parasite, causing membrane pores and leading to cellular death. The study of the lethal action of nitazoxanide in *Leishmania* suggests that the drug targeted the mitochondria, considering the depolarization of the mitochondrial membrane potential and increased production of reactive oxygen species, which may resulted in oxidative stress and cell death. Furthermore, the presence of specific markers such as phosphatidylserine exposure and specific ultrastructural alterations suggest that nitazoxanide may induce programmed cell death. The association between nitazoxanide and drugs amphotericin B, Glucantime[®], miltefosine and sitamaquine demonstrated indifferent interactions, but the sum of fractional inhibitory concentration (Σ CIF) of nitazoxanide:amphotericin B (1:4 v/v), and of nitazoxanide:Glucantime[®] (2:3 v/v) were close to the value considered as synergism. Thus, the studied drugs could contribute to the discovery of new therapeutic targets in *L. (L.) infantum* and associations of nitazoxanide could be evaluated in animal models, since no *in vitro* antagonism was observed.

LISTA DE ABREVIATURAS

GABA	Ácido gama-aminobutírico
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE ₁₀₀	Concentração Efetiva 100%
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
DNDi	Drug for Neglected Diseases Initiative
DMSO	Dimetilsulfóxido
ROS	Espécies reativas de oxigênio
AIF	Fator indutor de apoptose
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLU	Glucantime®
IS	Índice de seletividade
LV	Leishmaniose visceral
LHSC	London Health Sciences Centre
XΣCIF	Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária
MSF	Médicos sem fronteiras
M-199	Meio 199
MS	Ministério da Saúde
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate-buffered saline
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
ΣCIF	Somatória da Concentração Inibitória Fracionária
SFB	Soro fetal bovino
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução espacial do número de casos de LV no Brasil de 1983 a 2006. Cada ponto simboliza um caso de LV.....	13
Figura 2: Evolução do número de casos no Brasil de LV de 2000 a 2010..	14
Figura 3: Evolução do número de óbitos de LV no Brasil de 2000 a 2011..	14
Figura 4: Letalidade da LV no Brasil de 2000 a 2011.	15
Figura 5: Fêmea de flebotomíneo adulto, engurgitada (foto ampliada).....	16
Figura 6: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	17
Figura 7: Representação esquemática da ultra-estrutura da forma amastigota de <i>Leishmania</i> . Legenda: B: blefaroplasto, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo.....	18
Figura 8: Representação esquemática da ultra-estrutura da forma promastigota de <i>Leishmania</i> . Legenda: B: blefaroplasto, F: flagelo, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, L: lisossomo, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo, RE: retículo endoplásmico.....	19
Figura 9: Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial e indicação da membrana externa, membrana interna, das cristas e da matriz mitocondrial.	20
Figura 10: Paciente com LV. Notar o emagrecimento e a hepatoesplenomegalia.	26
Figura 11: Representação gráfica de um isoblograma, mostrando as possíveis interações: aditividade, antagonismo e sinergismo.....	33
Figura 12: Estrutura do anel piperazínico (a) e do anel imidazólico (b).	34
Figura 13: Ensaio de associação de NTZ e GLU em placas de 16 poços (NUNC®); foram usadas seis placas para associar dois fármacos, cada placa representa uma proporção de fármacos.	49
Figura 14: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX green®. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * (p<0,05) e ** (p<0,002) em relação ao	

controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo. 53

Figura 15: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando a sonda Mitotracker® Red CM-H₂XROS realizada após uma hora de incubação com os fármacos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * (p<0,05) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo. 55

Figura 16: Avaliação da produção de ROS em promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando a sonda H₂DCF-DA realizada após uma hora de incubação com os fármacos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * (p<0,05) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo. 56

Figura 17: Análise por citometria de fluxo usando as sondas anexina V (FITC-A) e iodeto de propídio (PI-A) para avaliar a exposição de fosfatidilserina na superfície de membrana. A) controle interno (parasitas sem marcação); B) controle (parasitas não tratados, incubados por 24 horas); C) controle positivo (parasitas tratados com miltefosina por 24 horas); D) parasitas tratados com loratadina por 18 horas; E) parasitas tratados com nitazoxanida por 12 horas; F) nitazoxanida por 16 horas e G) nitazoxanida por 24 horas. 58

Figura 18: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados e incubados por diferentes períodos a 24 ° C. Imagem adquirida por microscopia eletrônica de transmissão. A) controle (parasitas não tratados incubados por 16 horas); B) parasitas tratados com nitazoxanida por 1 hora; C) nitazoxanida por 3 horas; D e E) nitazoxanida por 6 horas e F) nitazoxanida por 16 horas. K-cinetoplasto; n- núcleo; f-flagelo. 60

Figura 19: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados e incubados por diferentes períodos a 24° C. Imagem adquirida em microscopia eletrônica de transmissão. A) controle (parasitas não tratados incubados por 16 horas); B) parasitas tratados com loratadina por 1 hora; C)

loratadina por 3 horas e D) loratadina por 6 horas. Núcleo (n), membrana plasmática (MP) e flagelo (f). 62

Figura 20: Curvas de dose-resposta geradas pela associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. *as concentrações do Glucantime[®] foram expressos em µg/mL..... 64

Figura 21: Isoblograma gerado com base nos valores de CE₅₀ da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de nitazoxanida e os fármacos padrões, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade, as linhas pontilhadas indicam a faixa de confiança e as barras ao redor dos pontos correspondem aos intervalos de confiança. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina..... 70

Figura 22: Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos submetidos à triagem anti- <i>Leishmania</i>	35
Tabela 2: Valores expressos em μM das CE_{50} dos fármacos estudados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i> e citotoxicidade em células de mamífero NCTC clone 929 e IS dos fármacos.	52
Tabela 3: Valores expressos em μM das CE_{50} dos fármacos padrões contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i> e citotoxicidade em células de mamífero NCTC clone 929 e IS dos fármacos.	52
Tabela 4: Valores de CE_{50} , CIF e ΣCIF gerados pela associação entre nitazoxanida e os fármacos padrões em amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i>	67
Tabela 5: Valores da $X\Sigma\text{CIF}$ da associação entre nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i>	68

ÍNDICE

1. Introdução	13
1.1. Leishmaniose visceral.....	13
1.1.1. Função e biologia	17
1.1.2. Patogenia e diagnóstico	25
1.1.3. Tratamento	26
a) Antimoniais pentavalentes	27
b) Anfotericina B.....	27
c) Isotionato de pentamidina	29
d) Paromomicina	29
e) Miltefosina	29
f) Sitamaquina	30
1.1.4. Pesquisa de fármacos e alternativas terapêuticas.....	30
1.2. Justificativa e relevância	39
2. Objetivos.....	40
3. Materiais e métodos	41
3.1. Reagentes e compostos sintéticos	41
3.2. Parasitas, células de mamífero e animais de experimentação	41
3.2.1. <i>Leishmania (L.) infantum</i>	41
3.2.2. NCTC.....	42
3.2.3. Animais de experimentação	42
3.3. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos estudados	42
3.3.1. Ensaio com promastigotas.....	43
3.3.2. Ensaio com amastigotas	43
3.3.3. Ensaio de citotoxicidade	44
3.4. Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	45
3.4.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática	45
3.4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	46
3.4.3. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio	46

3.4.4.	Alteração na exposição de fosfatidilserina.....	47
3.4.5.	Estudo das alterações ultraestruturais em <i>Leishmania</i>	48
3.5.	Determinação <i>in vitro</i> das associações entre nitazoxanida e fármacos padrões.....	48
3.6.	Análises estatísticas	50
4.	Resultados.....	51
4.1.	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade <i>in vitro</i> dos fármacos.	51
4.2.	Avaliação dos mecanismos de ação dos fármacos loratadina e nitazoxanida em <i>L. (L.) infantum</i>	53
4.2.1.	Alteração da permeabilidade de membrana plasmática	53
4.2.2.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	54
4.2.3.	Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio.....	55
4.2.4.	Exposição de fosfatidilserina	56
4.3.	Associação entre nitazoxanida e fármacos padrões.....	63
5.	Discussão	74
6.	Conclusões.....	88
7.	Referências Bibliográficas	89
8.	Anexos	104

1. Introdução

A Leishmaniose é uma doença tropical que acompanha a humanidade desde os tempos mais antigos e possui grande ligação com a pobreza. Atualmente a leishmaniose ocorre em 98 países e cerca de 350 milhões de pessoas estão em situação de risco de adquirir a infecção. A doença pode ser classificada em quatro formas: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral ou calazar (OMS, 2012).

1.1. Leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em 68 países. O número de casos de LV vem aumentando no Brasil (**Figura 1 e 2**) e no mundo, tornando-se um problema em expansão na área da saúde pública (MS, 2012).

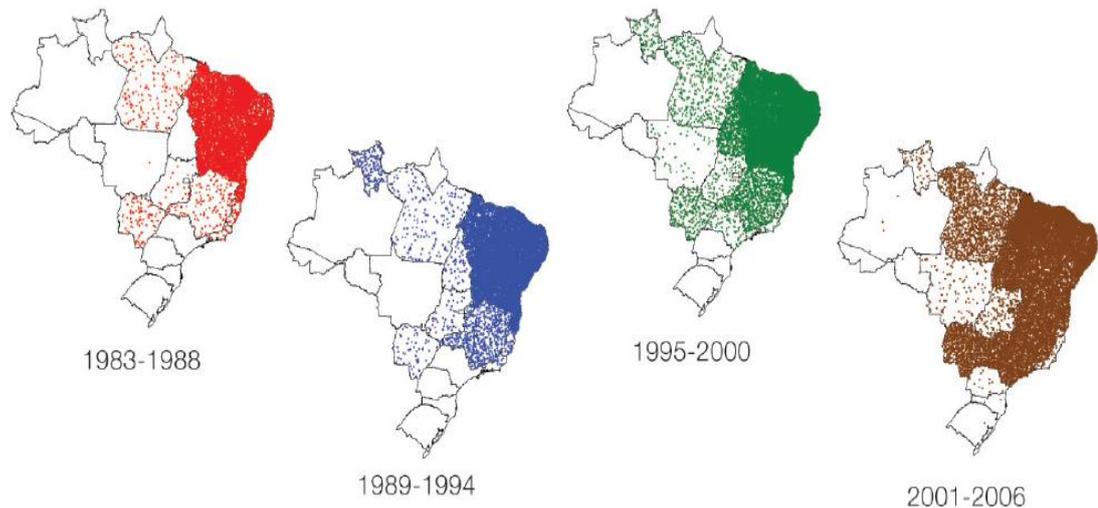


Figura 1: Evolução espacial do número de casos de LV no Brasil de 1983 a 2006. Cada ponto simboliza um caso de LV.
Fonte: SVS apud Alves, 2009.

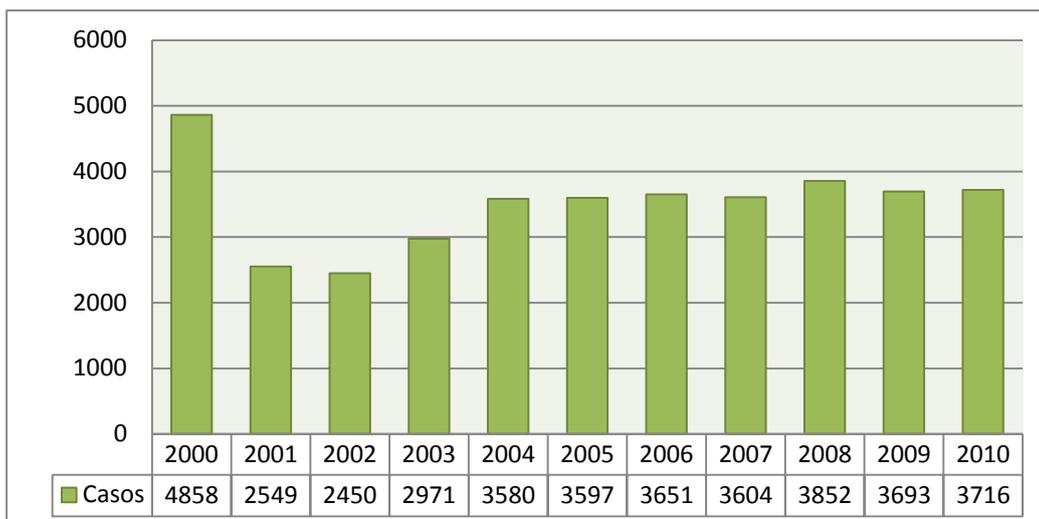


Figura 2: Evolução do número de casos no Brasil de LV de 2000 a 2010.
Fonte: Alvar et al., 2012 (modificado).

Segundo o Ministério da Saúde (2012) o número de óbitos de LV no Brasil aumentou de 155 casos no ano de 2000 para 262 casos em 2011 (**Figura 3**); e a letalidade da LV aumentou de 3,2% em 2000 para 6,7% em 2011 (**Figura 4**).

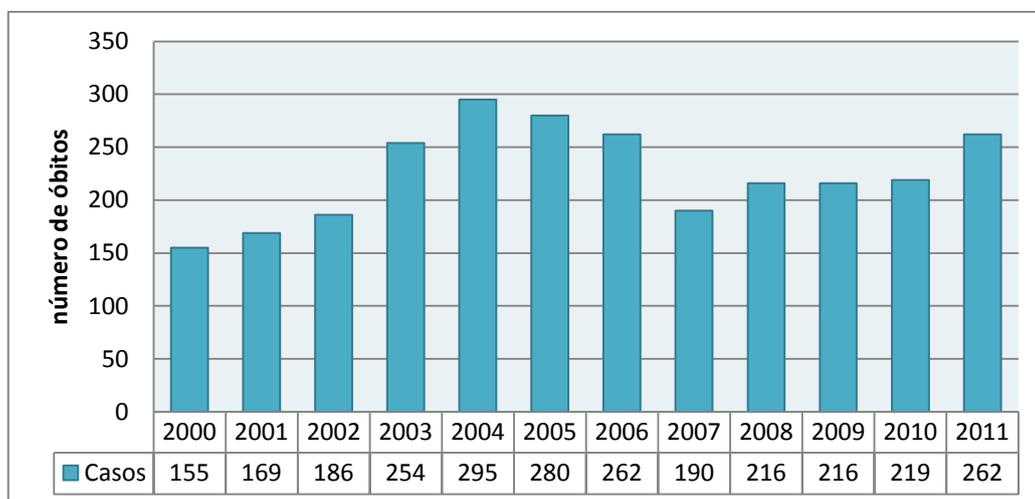


Figura 3: Evolução do número de óbitos de LV no Brasil de 2000 a 2011.
Fonte: Sinam/SVS/MS, 2012 (modificado).

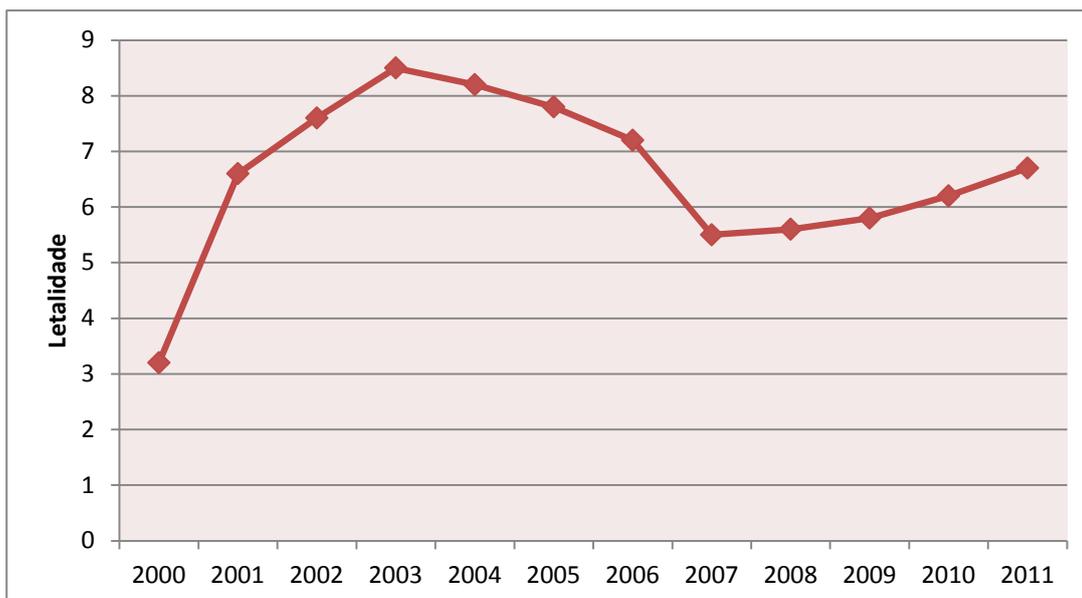


Figura 4: Letalidade da LV no Brasil de 2000 a 2011.

Fonte: Sinam/SVS/MS, 2012 (modificado).

Os agentes etiológicos da LV são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*, complexo “*Leishmania donovani*”, das seguintes espécies:

- *Leishmania donovani*: encontra-se na África Oriental, Índia, China, Paquistão e países asiáticos.

- *Leishmania infantum*: presente em áreas do Mediterrâneo, África Oriental e Central, Oriente Médio, Norte da Ásia e China. No Continente Americano, alguns autores atribuem sua etiologia à *Leishmania chagasi*, supondo ser uma espécie distinta, porém, estudos com marcadores enzimáticos e genéticos mostram que a diferença entre elas são tão restritas que não permitem diferenciá-las (Maurício, 1999 e 2000; Rey, 2001).

O principal reservatório da LV na área urbana é o cão (*Canis familiaris*) e no ambiente silvestre são raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), dentre outros animais (MS, 2006).

Os vetores da LV são as fêmeas de insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras e birigui, pertencentes à família Psychodidae, gênero *Lutzomya* (Novo Mundo) (**Figura 5**) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (Coura, 2008). No Brasil, duas

espécies estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lutzomyia longipalpis* (predominante) e *Lutzomyia cruzi* (MS, 2006).



Figura 5: Fêmea de flebotomíneo adulto, engurgitada (foto ampliada).
Fonte: MS, 2006.

A transmissão da leishmaniose é feita pela fêmea do flebotomíneo infectado, que durante o repasto sanguíneo regurgita formas infectantes (promastigotas) no hospedeiro vertebrado pela sua probóscide (aparelho bucal do inseto). As formas promastigotas são englobadas por células do sistema mononuclear fagocítico, transformando-se em amastigotas intracelulares. Estas formas disseminam-se pelo sistema linforreticular do fígado, baço e endotélio vascular, onde se multiplicam intensamente por divisão binária até romper a célula infectada, tornando a infectar novas células (**Figura 6**) (Coura, 2008; CDC, 2010; Neves, 2010).

A fêmea do flebotomíneo ao realizar novo repasto sanguíneo provoca uma pequena laceração da pele e um hematoma, do qual ingere macrófagos infectados com amastigotas. Estes se transformam em promastigotas no intestino médio do inseto, onde sofrem divisão e migram para a probóscide, infectando novos hospedeiros (**Figura 6**) (Coura, 2008; CDC, 2010; Neves, 2010).

Estágio Flebotomíneo

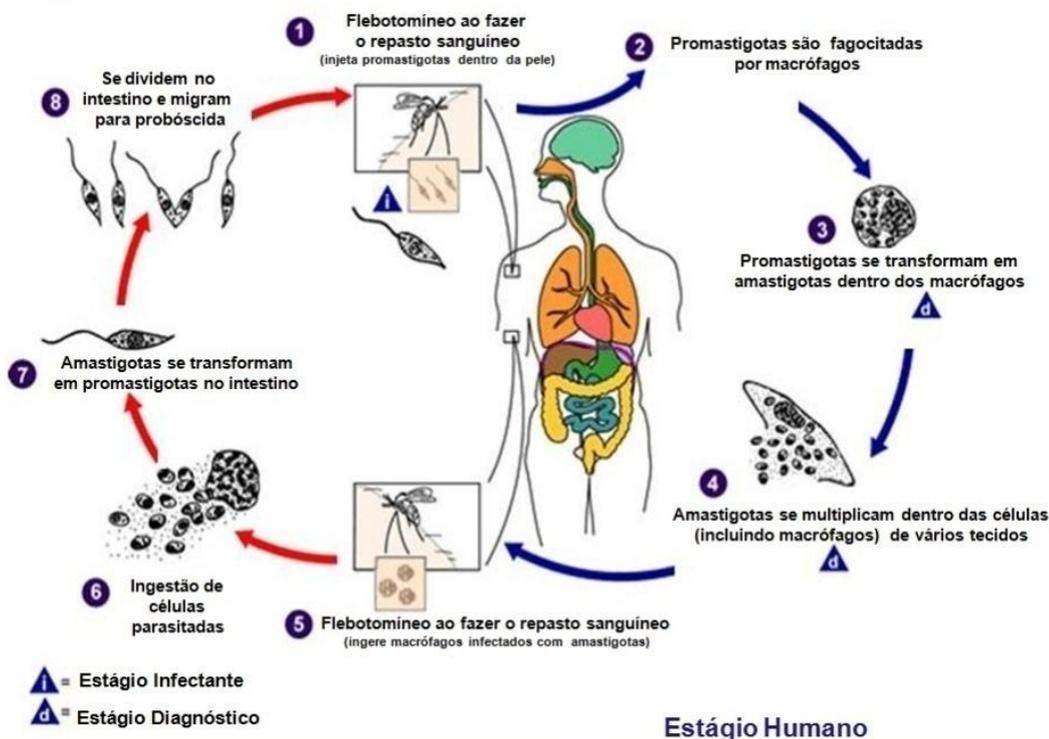


Figura 6: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Fonte: CDC, 2010 (modificado).

1.1.1. Função e biologia

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam principalmente duas formas em seu ciclo de vida: a forma amastigota intracelular (forma sem flagelo externo, presente nos tecidos do hospedeiro) e a forma promastigota extracelular (forma flagelada, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor).

A forma amastigota é arredondada e possui dimensões geralmente de 2 a 6 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de largura; apresenta limite externo formado por membrana celular unitária, sob a qual se encontram os microtúbulos. O núcleo é excêntrico, contém geralmente dois nucléolos e abundante material granuloso forrando a membrana nuclear. Esta forma caracteriza-se por ser levemente achatada e de contorno ovóide, elíptico ou fusiforme e o flagelo curto interiorizado. O retículo endoplasmático

é pouco abundante; o aparelho de Golgi, as vesículas e outras formações citoplásmicas não apresentam particularidade. Quanto à mitocôndria, provida de septos internos irregulares e pouco numerosos, mostra continuidade com a parede do cinetoplasto (**Figura 7**) (Rey, 2001).

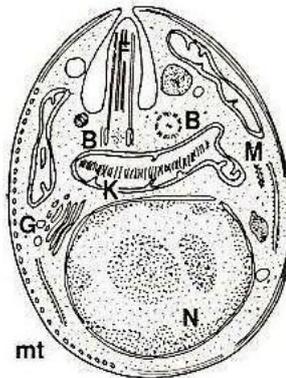


Figura 7: Representação esquemática da ultra-estrutura da forma amastigota de *Leishmania*. Legenda: B: blefaroplasto, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo.
Fonte: Rey, 2001.

A forma promastigota possui dimensões entre 14 e 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm de largura. Possui forma alongada e assume aspecto fusiforme ou piriforme, com a extremidade anterior mais arredondada e a posterior mais fina. O núcleo fica situado no terço médio da célula e o cinetoplasto encontra-se anterior ao núcleo, com flagelo livre a partir da porção anterior. O flagelo deixa o corpo flexível dando motilidade (**Figura 8**) (Rey, 2001).

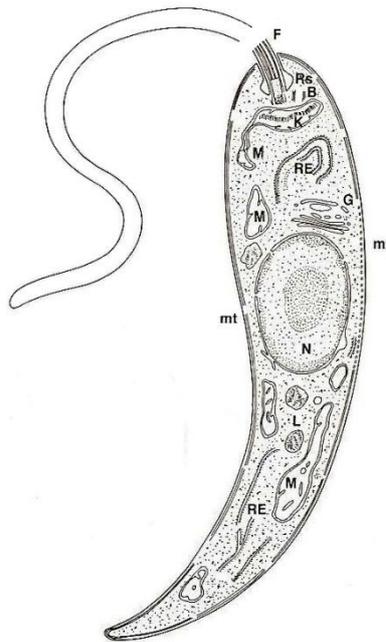


Figura 8: Representação esquemática da ultra-estrutura da forma promastigota de *Leishmania*. Legenda: B: blefaroplasto, F: flagelo, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, L: lisossomo, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo, RE: retículo endoplasmático.
Fonte: Rey, 2001.

O gênero *Leishmania* apresenta uma única mitocôndria e o DNA mitocondrial se apresenta condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo - nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central - sendo chamado de cinetoplasto, onde fica armazenado o kDNA. A mitocôndria é uma organela que possui uma membrana mitocondrial externa, a qual constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol e separa o espaço intermembranar do citosol (**Figura 9**). O espaço intermembranar, cuja composição iônica é semelhante à do citosol, contém um distinto grupo de proteínas incluindo o citocromo c. Também possui uma membrana mitocondrial interna paralela à membrana externa, permeável ao oxigênio, dióxido de carbono e água. Pequenas porções desta membrana invaginam para o interior da matriz como cristas mitocondriais, onde estão localizados o sistema de elétrons, o sistema fosforilativo e os transportadores membranares. A matriz mitocondrial contém as enzimas metabólicas, o DNA e o RNA mitocondrial,

onde os genes codificam algumas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Lesnefsky et al., 2001).

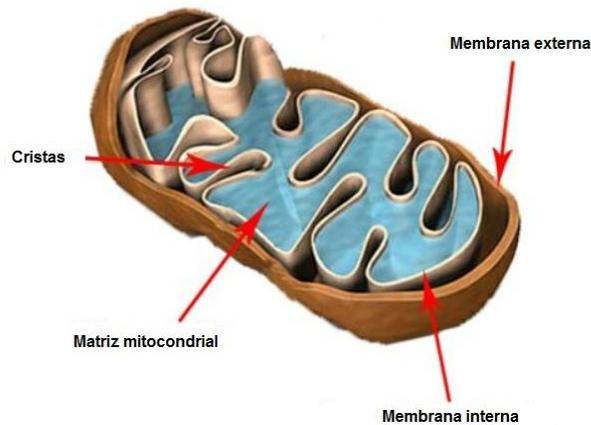


Figura 9: Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial e indicação da membrana externa, membrana interna, das cristas e da matriz mitocondrial. Fonte: LHSC, 2011.

As mitocôndrias são geradoras de energia química para a célula, onde oxidam carboidratos para produzir energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP). Por consumir oxigênio e liberar dióxido de carbono, durante sua atividade, o processo inteiro é chamado de respiração celular. Também conhecida como central energética da célula, a mitocôndria é responsável pela maior parte da produção de ATP que a célula necessita (Alberts et al., 1999; LHSC, 2011). Ela está envolvida em diversos processos e vias metabólicas, tais como: i) conversão do piruvato a acetil-CoA, processo este catalisado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; ii) ciclo do ácido cítrico; iii) fosforilação oxidativa, que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória acoplada à síntese de ATP; iv) degradação dos ácidos graxos; v) ciclo da uréia; vi) fornecimento de intermediários metabólicos à célula; vii) armazenamento de cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático a um nível baixo e constante; viii) síntese de DNA, RNA e proteínas; ix) reparação do DNA e x) formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pedersen, 1999).

Durante o processo evolutivo, as mitocôndrias desenvolveram estratégia para a produção de ATP, baseada na transferência de elétrons, desde compostos redutores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) até o oxigênio. Ao mesmo tempo, ejetam prótons hidrogênio (H^+) para o exterior, gerando um potencial elétrico através da membrana mitocondrial interna. A mitocôndria também cria um sistema de oxidação de lipídios, por meio de um transporte específico de ácidos graxos de cadeia longa. Da mesma forma, possuem um sistema que regula o seu funcionamento em função das necessidades energéticas da célula, o qual é dependente da concentração de Ca^{2+} intramitocondrial, já que o Ca^{2+} ativa várias enzimas-chave nas mitocôndrias. O metabolismo mitocondrial produz ROS, sendo que a quantidade de ROS pode controlar a duração da vida celular. Nas células eucariotas de uma forma geral, podem formar-se nas mitocôndrias poros protéicos por onde se libera parte do conteúdo mitocondrial, incluindo citocromo c, o qual desencadeia uma série de eventos conducentes à morte celular. Este poro é modulado por diversas substâncias, incluindo proteínas da família Bcl-2, as quais podem induzir à morte celular. A morte celular pode ser programada ou não, sendo denominada apoptose e necrose, respectivamente. Para controlar todas estas atividades, as mitocôndrias possuem um genoma reduzido que codifica algumas das proteínas essenciais ao seu funcionamento (Monteiro et al., 2003).

Alguns trabalhos demonstram que a mitocôndria é responsável por controlar a vida e a morte da célula. A permeabilidade da membrana mitocondrial precede o processo de morte celular, sendo um de seus principais indicadores. De fato, existe um número elevado de fatores pró-apoptóticos que atuam na membrana mitocondrial induzindo a permeabilização da membrana, que por sua vez, ativam os compostos anti-apoptóticos da família Bcl-2 e interagem com proteínas da membrana mitocondrial evitando a sua permeabilização. Outro fato que reforça o envolvimento da mitocôndria na morte celular é observado na presença de

fármacos que atuam nas proteínas mitocondriais, evitando, retardando ou induzindo à morte celular (Loeffler et al., 2000).

A mitocôndria de tripanossomatídeos vem sendo estudada como potencial alvo para fármacos, visto que se apresenta como organela única no parasita (Fidalgo e Gille, 2011). É também considerada de suma importância nos processos apoptóticos, pois é no seu espaço intermembranar que ocorre a liberação proteica, sendo este o primeiro evento característico de apoptose. Perante um estímulo apoptótico, como danos ao DNA, isquemia, radiações ionizantes, estresse, ação de fármacos, entre outros, seu papel original, que é o de manter a célula viva, se transforma no oposto, ou seja, facilitar a morte celular. Existem vários fatores envolvidos nesta alteração, tais como cálcio, ceramida, óxido nítrico, caspases, ROS e membros da família Bcl-2. Em células eucariotas de uma forma geral, o efeito desses fatores envolve a liberação de duas proteínas, o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF), as quais participam de eventos pós-mitocondriais necessários para completar o programa de morte celular. A forma como estes fatores agem na mitocôndria para gerar a morte programada ainda não é inteiramente esclarecida.

Em células de mamíferos, o citocromo c é a proteína cuja liberação parece ser mais crítica para a iniciação dos processos de apoptose (Desagher e Martinou, 2000). No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a sua liberação da mitocôndria ainda não foi esclarecido, podendo ocorrer de um modo controlado pelos poros na membrana externa ou por ruptura física desta membrana. O citocromo c na presença de ATP ou dATP, forma um complexo com o fator de ativação de proteases apoptóticas (cuja sigla em inglês é Apaf-1 - *apoptosis protease-activating factor 1*) e a procaspase 9. A formação deste complexo (apoptossoma) cliva a procaspase 9 com liberação da caspase 9 ativa, a qual cliva e ativa a procaspase 3. Por sua vez, a caspase 3 ativa induz a clivagem proteolítica de uma série de proteínas-alvo no citosol, núcleo e membrana plasmática responsáveis pela morfologia característica de apoptose (Parone et al., 2002).

Estudos também têm demonstrado que a mitocôndria está envolvida na indução de apoptose por mecanismos independentes das caspases. Durante este processo, ocorre liberação de proteínas designadas AIF e endonuclease G do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, desencadeando este tipo de morte celular sem ativar a cascata apoptótica. Durante apoptose, o AIF desloca-se da membrana mitocondrial externa para o citosol e, posteriormente, para o núcleo, onde induz condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Daugas et al., 2000).

A natureza exata da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial é mal compreendida, mas poderia incluir, entre outros, o canal aniônico voltagem dependente, o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) e a proteína matricial ciclofilina. A principal importância da transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) reside no fato de poder ser crucial na morte celular, quer por necrose, quer por apoptose. Foi demonstrado que a transição de permeabilidade mitocondrial pode ser induzida em condições que ocorrem durante o acúmulo de fosfato inorgânico, oxidação de nucleotídeos de piridina, produção de ROS, alteração do pH da matriz, dentre outros.

Outro agente importante na indução da apoptose é o Ca^{2+} . Sabe-se que quando ocorre o aumento de Ca^{2+} citosólico, a mitocôndria aumenta a sua captação de Ca^{2+} , funcionando como sistema tampão, por formar e garantir a estabilidade das concentrações citosólicas de Ca^{2+} . Esta capacidade tamponizadora é limitada, uma vez que um aumento do Ca^{2+} matricial acima de certos limites constitui um importante indutor da formação dos referidos canais de alta condutância. Estes atravessam as membranas mitocondriais interna e externa, com dissipação do potencial elétrico mitocondrial e perda do citocromo c para o citosol (Monteiro et al., 2003).

O papel do Ca^{2+} em organismos vivos é conhecido por governar uma série de funções celulares vitais. Entretanto, estudos têm mostrado que a sobrecarga ou perturbação do Ca^{2+} intracelular pode ser a causa (ou gatilho) da morte celular (Orrenius et al., 2003).

Independentemente do mecanismo subjacente, a liberação de fatores pró-apoptóticos, habitualmente confinados ao interior da mitocôndria, vai desencadear uma sequência de eventos, a qual se inicia com a ligação do citocromo c ao Apaf-1. Este complexo, na presença de ATP, converte a procaspase 9 em caspase 9, a qual, por sua vez, cliva a procaspase 3 em caspase 3, dando início à chamada “cascata das caspases”. Daqui se infere que a apoptose é um fenômeno dependente de energia e, como tal, só pode ocorrer em células com reservas de ATP suficientes para suportar um processo que consome energia (Monteiro et al., 2003).

Em organismos multicelulares, a apoptose é um processo fisiológico essencial, necessário ao desenvolvimento normal e à manutenção da homeostase dos tecidos (Fumarola e Guidotti, 2004). No entanto, a apoptose está também envolvida em diversos processos patológicos, tais como: doença neurodegenerativa, imunológica e processo cancerígeno. Assim, após um sinal apoptótico na célula, ocorre uma série de alterações resultando em sua morte (Monteiro et al., 2003). Este processo foi observado em formas amastigotas de *Leishmania* por Lindoso e colaboradores (2004) como o responsável pela regulação da população de parasitas durante certas fases da infecção. A necrose por sua vez, pode ser provocada por estresse ou dano celular. Ocorre um rápido colapso da homeostase interna acompanhada de lise da membrana citoplasmática e das membranas internas com liberação de restos celulares para o espaço extracelular, gerando processo inflamatório. É caracterizada morfológicamente pela formação de protuberâncias na membrana plasmática seguida pela eventual ruptura de algumas delas e a consequente liberação de componentes citosólicos (Monteiro et al., 2003).

A principal diferença entre a necrose e a apoptose está relacionada aos aspectos bioenergéticos, já que o nível de ATP no processo de necrose diminui drasticamente, gerando a morte celular. No processo de apoptose, a reserva de ATP se mantém parcialmente, já que o processo é dependente de energia (Malhi et al., 2006). De acordo com o exposto, a

mitocôndria se mostra um elemento fundamental nos processos de morte celular, tanto por apoptose quanto necrose.

1.1.2. Patogenia e diagnóstico

A *L. (L.) infantum* é um parasito de células do sistema fagocítico mononuclear, presentes principalmente no baço, fígado, linfonodo e medula óssea. Outros órgãos e tecidos podem ser afetados, com o decorrer da infecção, tais como: intestino, sangue, pulmões, rins e pele. Observa-se também que nas fases mais avançadas desta doença, são raros os órgãos onde não se encontra o parasito (Neves, 2010; Cota et al., 2012).

As manifestações clínicas são de intensidade variável. Trata-se de uma doença infecciosa sistêmica crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração e palidez de mucosas. O paciente pode apresentar tosse e diarreia, esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia (**Figura 10**), acompanhada de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Devido ao emagrecimento, o edema e o estado de debilidade favorecem a caquexia e o óbito. No entanto, existem relatos de pessoas que contraem a infecção e não desenvolvem a doença, sendo consideradas assintomáticas. Na doença abrupta, em pacientes portadores de HIV ou com qualquer condição imunossupressora, a doença pode levar a óbito, antes mesmo que os sintomas sejam observados (Neves, 2010; MS, 2011; Cota et al., 2012;).

Vários métodos podem ser aplicados ao diagnóstico da LV, sendo importante associar informações do quadro clínico e informações epidemiológicas aos resultados do diagnóstico laboratorial. Entre os métodos diagnósticos laboratoriais estão o diagnóstico parasitológico e sorológico (Coura, 2008; MS, 2011). Em casos assintomáticos, há relatos de dificuldade no diagnóstico de LV, devido aos baixos níveis de anticorpos e parasitas. Atualmente, as técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são utilizados para confirmar o diagnóstico de

LV, apresentando alta sensibilidade (75% - 98%) e especificidade (97% - 100%). Estes métodos são também mais precisos do que as técnicas de identificação sorológica em portadores assintomáticos da infecção. Também existe uma variante do PCR convencional, o PCR em tempo real que permite além da detecção do DNA do parasita, a quantificação de cópias da sequência do DNA ou RNA alvo (Dos Santos Marques et al., 2012).

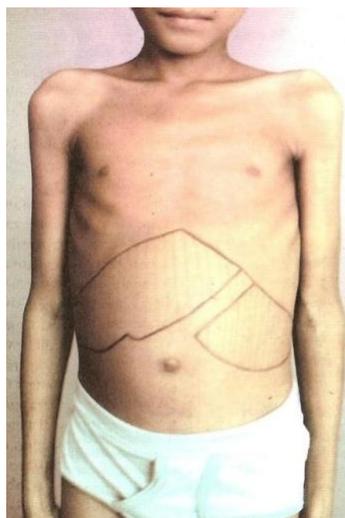


Figura 10: Paciente com LV. Notar o emagrecimento e a hepatoesplenomegalia.
Fonte: Coura, 2008.

1.1.3. Tratamento

Em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz para o tratamento da leishmaniose, o que levou ao estudo na introdução de outros derivados antimoniais. Mais tardiamente, foi sintetizada uma formulação pentavalente do antimônio, que deu origem ao Glucantime[®] e Pentostam[®] (Rath et al, 2003).

No Brasil, atualmente os medicamentos utilizados no tratamento específico da LV são o antimônio pentavalente e a anfotericina B. A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e comorbidades (MS, 2011). Os tratamentos alternativos incluem as

formulações lipossomais de anfotericina B e pentamidina. Exceto as duas primeiras, as demais se encontram em fase de investigação (MS, 2006).

Segundo o DNDi (2010) nos últimos anos, o número de tratamentos disponíveis para a LV aumentou, mas ainda existem grandes limitações, tais como dificuldade de administração, duração do tratamento, toxicidade, custo e crescente resistência dos parasitas aos medicamentos. As principais limitações dos fármacos atualmente em uso clínico para o tratamento da leishmaniose são descritas a seguir:

a) Antimoniais pentavalentes

Considerados como fármacos de primeira escolha no tratamento da LV, os antimoniais pentavalentes (Sb^V) estão disponíveis no mercado em duas formulações: estibogliconato de sódio (Glucantime[®]) e o antimoniato-N-metil-glucamina (Pentostam[®]) (Frézard et al, 2009).

A única formulação disponível no Brasil é o antimoniato-N-metil glucamina, o qual é distribuído pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 mL (contendo 405 mg de Sb^V). A sua via de administração preferencialmente é intravenosa e também pode ser intramuscular na região glútea. O principal efeito colateral do Sb^V é sobre o aparelho cardiovascular. Por isso deve-se realizar o eletrocardiograma semanal e ausculta cardíaca com o objetivo de detectar arritmias; outros efeitos adversos incluem artralgia e anorexia, dentre outros (MS, 2006; 2011; Pandey et al., 2009; Rang et al., 2001).

b) Anfotericina B

Anfotericina B é um antibiótico macrolídico de estrutura complexa, caracterizada por um anel de átomos de carbono com múltiplos membros. Atualmente é o fármaco leishmanicida com maior taxa de cura disponível no mercado. Possui ação nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Rang et al., 2001; Mishra et al., 2007; MS, 2011).

A experiência clínica acumulada com seu uso no tratamento da LV vem mostrando que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia, com redução da toxicidade (MS, 2011).

Duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (MS, 2011). As formulações lipídicas de anfotericina B possuem vantagens, tais como menor toxicidade e duração de tratamento. Nesta formulação, o fármaco é entregue diretamente às células do retículo endotelial, o que torna o fármaco mais específico às células-alvo. Sua desvantagem é o custo elevado, o que limita a utilização em países em desenvolvimento (Pandey et al., 2009).

Nos casos de resposta insatisfatória aos antimoniais, a anfotericina B deve ser utilizada na dose de 1mg/kg, em dias alternados. Doses acima das recomendadas podem ser usadas em casos especiais. Em crianças, a anfotericina B deve ser utilizada na dose total de 15 a 25 mg/kg, também administrada em dias alternados (MS, 2006).

A comercialização ocorre sob a forma liofilizada em frascos contendo 50 mg de desoxicolato sódico. Por possuir baixa solubilidade, a mesma deve ser reconstituída em água destilada no momento do uso, podendo ser mantida sob refrigeração por um período de até sete dias. A administração deve ser feita por via endovenosa em infusão lenta de 4 a 6 horas com limite máximo de 50 mg/dose/dia (MS, 2006).

Os efeitos indesejáveis consistem em toxicidade renal, tromboflebite, hipocalcemia, anemia, trombocitopenia, dentre outros. Durante a injeção poderá ocorrer cefaléia, febre, calafrios, tinido, vômitos, dores musculares e articulares e hipotensão (Rang et al., 2001). A infusão rápida é responsável pela instalação de hiperpotassemia, determinando alterações cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca (MS, 2006).

c) Isotionato de pentamidina

Isotionato de pentamidina pode ser usado na leishmaniose resistente ao Sb^V. Para o uso intramuscular, deve ser diluído em água destilada e no uso endovenoso deve ser diluído em soro glicosado e administrado lentamente em infusão contínua. O uso intravenoso lento pode evitar o aparecimento dos eventos adversos agudos, como hipotensão, náusea, vômitos e síncope (Rang et al., 2001; MS, 2011)

d) Paromomicina

Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que é ativo contra espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*. Estudos clínicos têm sido realizados na Índia para LV, onde o tratamento antimonial padrão não é efetivo e as taxas de mortalidade são altas (Rath et al., 2003). Estudos de fase IV devem começar em breve em vários centros clínicos de Bihar. A dose utilizada é de 15 mg/kg/dia durante 21 dias por via intramuscular. É um fármaco estável e solúvel em água. Os efeitos colaterais, assim como outros fármacos pertencentes à mesma classe, incluem nefrotoxicidade e ototoxicidade (Pandey et al, 2009; Wiwanitkit, 2012).

e) Miltefosina

Miltefosina é uma alquilfosfocolina que tem atividade contra células cancerígenas e várias espécies de parasitas, assim como bactérias e fungos. Por dez anos, este medicamento vem sendo utilizado na Índia para o tratamento da LV. É o primeiro tratamento oral para LV e leishmaniose cutânea (Dorlo et al., 2012).

Este fármaco tem meia vida de 150 a 200 horas, motivo pelo qual tem se elevado a preocupação com o surgimento de resistência. A dose recomendada é de 2,5 mg/kg/dia, durante 28 dias. Estudos de fase III e IV têm demonstrado taxa de cura de 94% (Pandey et al., 2009).

O regime de monoterapia por 28 dias é bem tolerado, com exceção de leves efeitos colaterais gastrointestinais, tais como diarreia, náuseas e vômitos, mas seu potencial teratogênico dificulta sua utilização generalizada (Pandey et al., 2009; Dorlo et al., 2012).

f) Sitamaquina

Sitamaquina (WR6026) é um 8-aminoquinolina em desenvolvimento para o tratamento de LV por via oral e sua eficácia na terapia da LV foi verificada em modelos animais. Uma vantagem deste fármaco é sua eliminação rápida, pois possui meia-vida curta, impedindo o aparecimento de resistência. A ação leishmanicida dos seus metabólitos não é conhecida (Loiseau et al., 2011). A dose utilizada nos ensaios clínicos é de 2 mg/kg/dia, durante 21 dias (López-Martín et al., 2008; Pandey et al., 2009). Os principais efeitos colaterais observados foram: nefrotoxicidade, glomerulonefrite e necrose tubular (Pandey et al., 2009).

1.1.4. Pesquisa de fármacos e alternativas terapêuticas

A pesquisa de fármacos e alternativas terapêuticas para doenças negligenciadas não desperta grande interesse na indústria farmacêutica, por atingirem populações de baixa renda. De forma geral, novas alternativas terapêuticas podem ser introduzidas no tratamento de determinada doença pelos seguintes processos: encontro ao acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de compostos já existentes, síntese, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos, dentre outros (Korolkovas, 1982; Tempone et al., 2011; DNDi, 2012).

A introdução de fármacos pode ocorrer ao acaso, como aconteceu, por exemplo, com a penicilina (antibacteriano), piperazina (anti-helmíntico), imipramina (antidepressivo), clorotiazida (diurético), dentre outros (Korolkovas, 1982).

A triagem empírica envolve o processo de descobrir novos fármacos por meio de ensaios biológicos com um grande número de compostos. Não é de se surpreender que este método empírico não seja muito recompensatório. Calcula-se que o encontro de um fármaco resulte, em média, da triagem de 200.000 compostos ativos. Uma variante deste método é a triagem empírica racionalmente dirigida. Esta técnica foi usada, por exemplo, na segunda Guerra Mundial para descobrir compostos antimaláricos (Korolkovas, 1982).

A extração de fontes naturais é um método que traz bons efeitos, por isso é extensivamente explorada. Vários medicamentos usados hoje em dia, tais como: alcalóides, antibiótico, vitaminas e hormônios, são resultados de purificação dos extratos, isolamento e identificação de seus princípios ativos. Um bom exemplo é a anfotericina B, um antifúngico que foi isolado pela primeira vez a partir de *Streptomyces nodosus* (Korolkovas, 1982; Tempone et al., 2011).

O método de obter novos fármacos através de modificação molecular de compostos já existentes tem se mostrado recompensador. Consiste em usar uma substância de ação biológica conhecida como modelo ou protótipo e sintetizar novos compostos que sejam homólogos ou análogos estruturais do fármaco matriz. São dois os objetivos desse método: descobrir o grupo farmacofórico, que consiste no grupamento que lhe confere ação farmacológica, e obter fármacos que apresentem propriedades mais desejáveis que o protótipo em potência, especificidade, duração de ação, facilidade de administração, estabilidade, custo, dentre outros. Alguns exemplos de fármacos obtidos por esse método são: efedrina, cinarina e prednazato (Korolkovas, 1982).

O planejamento racional de fármacos fundamenta-se basicamente no conhecimento da estrutura molecular dos receptores, o que possibilita elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos. Para tanto, as hipóteses são elaboradas fundamentando-se no conhecimento das propriedades físico-químicas dos compostos ativos e seus respectivos sítios moleculares de ação. Entretanto, como muitas vezes a estrutura dos

receptores não é conhecida, admite-se que a gênese de moléculas potencialmente bioativas seja realizada sem levar em conta sua natureza (Amaral et al., 2003).

O reposicionamento de fármacos consiste em encontrar novas indicações terapêuticas para fármacos já aprovados no mercado. Esta é uma estratégia cada vez mais utilizada para encontrar novos medicamentos. Esta abordagem é de grande interesse principalmente para doenças negligenciadas porque os dados de segurança e eficácia já se encontram disponíveis e podem ser aproveitados. Coletar e disponibilizar ao público o máximo de dados possível sobre o perfil e alvo dos fármacos oferece oportunidades para redefinição do seu uso, mas pode limitar as aplicações comerciais de pedidos de patente. Certas aplicações clínicas podem ser mais viáveis para a redefinição do que outras devido a diferenças na tolerância e efeito adverso (Oprea e Mestres, 2012). O uso deste método levou à introdução da miltefosina no tratamento oral da LV, a qual era utilizada no tratamento de câncer (Tempone et al., 2011).

Há um consenso sobre a necessidade de se avaliar a associação de fármacos ou combinação terapêutica como estratégia de curto prazo para o tratamento da LV. A terapia em associação propõe um tratamento de menor duração, menor toxicidade, menor custo, maior adesão ao tratamento, maior eficácia e menor risco de desenvolvimento de resistência (DNDi, 2012). Diversas tentativas têm sido feitas para associar fármacos para o tratamento LV, mas só recentemente fármacos mais eficazes tornaram-se disponíveis e associações foram testadas sistematicamente. Tratamentos com anfotericina B seguidos de miltefosina ou paromomicina, bem como a administração concomitante de miltefosina e paromomicina foram muito eficazes na Índia, com taxas de cura maiores que 95%. O estibogluconato de sódio combinado com paromomicina mostrou taxas de cura maiores que 90% na África Oriental (Olliaro, 2010). Segundo estudo realizado na Índia por Sundar e colaboradores (1995), o uso do antimônio concomitantemente com interferon-gama no tratamento da LV indica que interferon-gama acelera a resposta clínica e parasitológica do tratamento do

antimônio, permitindo a redução do tempo da terapia convencional. Até o momento, nenhum regime de associação foi testado no Brasil, Nepal e Bangladesh, embora os estudos sejam esperados num futuro próximo (Olliaro, 2010).

Há evidências de alta eficácia dos regimes de associação na Índia (Olliaro, 2010). Porém, mais estudos são necessários em outras áreas endêmicas, visando tornar as associações uma alternativa para o tratamento da LV.

A associação de dois fármacos pode produzir valores de CE_{50} mais altos, mais baixos ou iguais aos valores dos fármacos previstos separadamente. Esse método baseia-se no conceito de equivalência, isto é, uma dose igualmente eficaz de um fármaco irá adicionar seu efeito à dose do outro fármaco. Para fármacos com potência equivalente, são geradas isóboles aditivos lineares, ou seja, curva de efeito constante, ou linha de aditividade. Tem-se que considerar também que uma relação de variação da potência gera curvas não lineares (sinérgicas ou antagônicas). Para construir uma isóbole, tem-se que gerar uma curva aditiva para avaliar as interações sinérgicas e antagônicas da associação (**Figura 11**) (Tallarida, 2006).

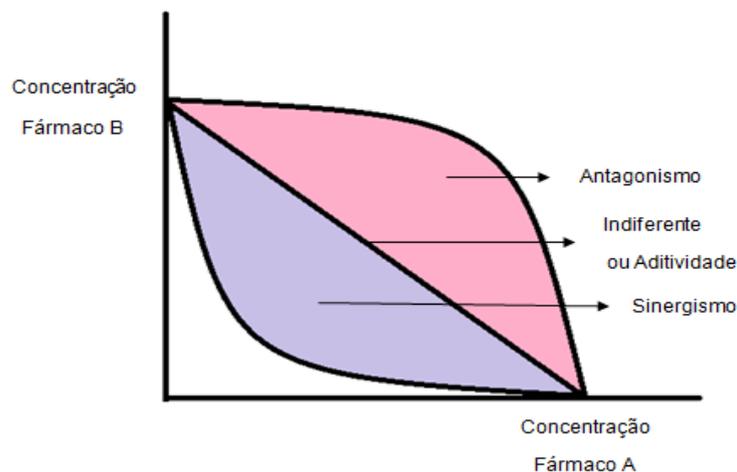
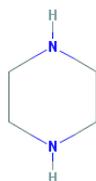


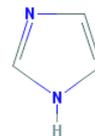
Figura 11: Representação gráfica de um isoblograma, mostrando as possíveis interações: aditividade, antagonismo e sinergismo.
Fonte: Tallarida, 2006 (modificado).

1.1.5. Fármacos estudados

O sucesso na descoberta de novas terapias depende de bases farmacológicas que permitem a escolha do fármaco adequado de forma racional e científica. Considerando o potencial anti-*Leishmania* de compostos nitrogenados (Kelly et al., 2003), realizou-se neste trabalho uma ampla busca em banco de dados como o Pubchem compound (Pubmed) e DrugBank, com o objetivo de selecionar candidatos ao estudo. Sendo assim, a escolha foi baseada na estrutura química dos mesmos, contemplando fármacos que apresentassem o átomo de nitrogênio disposto em anéis de cinco a sete átomos, incluindo ou não a presença do anel piperazínico ou imidazólico (**Figura 12**). Os fármacos estudados, seus usos e estruturas químicas são descritos na **Tabela 1**.



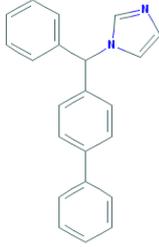
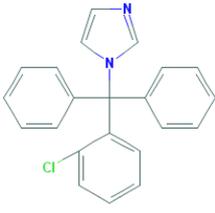
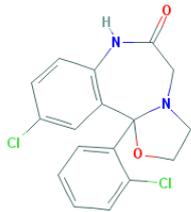
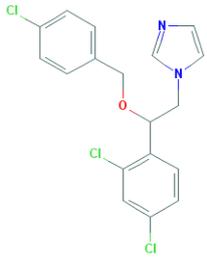
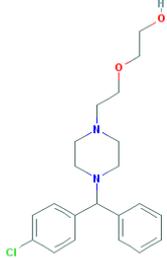
(a)



(b)

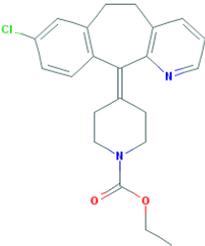
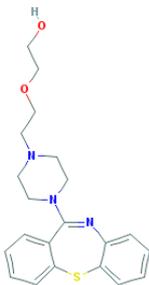
Figura 12: Estrutura do anel piperazínico (a) e do anel imidazólico (b).
Fonte: PubChem Compound (2012).

Tabela 1: Fármacos submetidos à triagem anti-*Leishmania*.

Fármaco	Uso clínico	Estrutura química*	Atividade
bifonazol	antifúngico		<i>Tinea pedis</i> e <i>Escherichia coli</i> (PubChem Compound, 2012).
clotrimazol	antifúngico		<i>Candida</i> spp (DrugBank, 2012).
cloxazolam	anti-psicótico		Tratamento da epilepsia (Kimura et al., 2010; MS, 2012).
econazol	antifúngico		<i>Tinea pedis</i> , <i>T. cruris</i> , <i>T. corporis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>M. audouini</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> (DrugBank, 2012).
hidroxizina	anti-histamínico		Urticária crônica, dermatite, alergia, náuseas, vômitos, alívio dos sintomas de ansiedade, tensão, sedativo e abstinência de álcool (DrugBank, 2012; PubChem Compound, 2012).

*Fonte: PubChem Compound (2012)

Tabela 1 (continuação): Fármacos submetidos à triagem anti-*Leishmania*.

Fármaco	Uso clínico	Estrutura química*	Atividade
loratadina	anti-histamínico		Tratamento de rinite alérgica, urticária, eritema e prurido (DrugBank, 2012).
nitazoxanida	antiparasitário		<i>G. lamblia</i> , <i>C. parvum</i> , <i>T. vaginalis</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>H.pylori</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) donovani</i> , <i>P.berghe</i> e <i>T. cruzi</i> (Zhang et al., 2010; Navarrete-Vazquez et al., 2011; DrugBank, 2012).
quetiapina	anti-psicótico		Esquizofrenia, transtornos psicóticos, desordem bipolar (Aa et al., 2012; DrugBank, 2012).

*Fonte: PubChem Compound (2012)

a) Antagonistas de histamina (piperazinas):

A histamina (5-imidazoletilamina) é uma amina biogênica com vários efeitos fisiológicos. É encontrada em numerosos tecidos de animais, venenos de insetos, bactérias e plantas. Ela é biossintetizada principalmente por mastócitos e é armazenada nos grânulos de heparina, os quais liberam vários compostos químicos, tais como: antígenos, venenos e toxinas, tripsina e substâncias proteolíticas, dentre outros. A histamina produz diversos efeitos sobre diferentes órgãos, como por exemplo: vasodilatação dos capilares, estimulação da contração da musculatura lisa, estimulação da

secreção do suco gástrico, aceleração dos batimentos cardíacos e inibição da contração uterina. A histamina está também ligada a processos alérgicos e ao choque anafilático (Korolkovas, 1982; Shi et al., 2012).

A histamina exerce suas atividades biológicas por meio de quatro receptores distintos, conhecidos como receptores de histamina H1, H2, H3 e H4. Os receptores H1 e H2 foram identificados décadas atrás, e têm se mostrado alvos para drogas, como tratamento de úlceras gástricas e alergia, respectivamente. O receptor de histamina H3 foi identificado por Arrang e colaboradores em 1983, utilizando um ensaio funcional, onde se verificou que a histamina inibe a sua própria síntese. O receptor de histamina H4 foi descoberto em 2000, e tem sido identificado como alvo potencial para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como alergias, asma crônica, dermatite e doenças inflamatórias intestinais (Shi et al., 2012).

Existem três classes de antagonistas de histamina: os antagonistas de receptores H1, H2 e H3. Os agentes anti-histamínicos são usados para controlar afecções de fundo alérgico e rinite, como antitussígenos, ansiolíticos, antipsicóticos, antiparkinsonianas, anti-eméticos e antiúlceras (Korolkovas, 1982; Rang et al. 2001).

Loratadina é um antagonista de receptor de histamina H1 de segunda geração utilizada no tratamento de rinite alérgica e urticária. Diferentemente da maioria dos anti-histamínicos clássicos, estes carecem de efeitos deprimentes no sistema nervoso. A farmacologia da loratadina é semelhante à de outros anti-histamínicos. Seu mecanismo de ação exato é desconhecido, mas sugere-se que o antagonismo prolongado pode ser devido à sua dissociação lenta a partir do receptor ou à formação do metabólito ativo, a desloratadina. A loratadina tem baixa afinidade para receptores colinérgicos e não apresenta qualquer atividade alfa-adrenérgica *in vitro*. Este fármaco é rapidamente absorvido após administração oral. Seu metabolismo é hepático e sua meia vida é de 8,4 horas (Rang et al., 2001; PubChem Compound, 2012; DrugBank, 2012).

b) Nitrotiazólicos

Nitazoxanida é um derivado nitrotiazólico sintetizado em 1974. Desde 1994, sua atividade vem sendo avaliada contra amplo espectro de bactérias, protozoários e helmintos que infectam o trato gastrointestinal do homem como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Clostridium perfringens* e *Helicobacter pylori*. É indicado para o tratamento de diarreias causadas pelos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (Andrade et al., 2011; DrugBank, 2012).

Estudos demonstraram que este fármaco inibe uma enzima fundamental para o metabolismo energético destes microrganismos, a piruvato ferredoxina oxidoreductase. Acredita-se que o mecanismo de ação antiprotozoário seja devido à interferência com o piruvato ferredoxina oxidoreductase, enzima dependente da reação de transferência de elétrons que é essencial ao seu metabolismo. Estudos com *G. lamblia* têm demonstrado que a enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase diretamente reduz nitazoxanida por transferência de elétrons, na ausência de ferredoxina. A interferência com a reação de transferência de piruvato ferredoxina oxidoreductase parece não ser a única via pela qual nitazoxanida exibe atividade antiprotozoária. Em humanos, este fármaco é rapidamente metabolizado a tizoxanida, que é um composto igualmente eficaz. A eliminação e excreção ocorrem pela urina, bile e fezes e sua meia vida é de 3,5 horas. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam a eficácia contra protozoários, tais como *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) donovani*, *Plasmodium berghe* e *Trypanosoma cruzi* (Zhang et al., 2010; Navarrete-Vazquez et al., 2011; DrugBank, 2012).

1.2. Justificativa e relevância

Endêmica em 68 países, a LV tornou-se um grave problema em crescimento na área da saúde pública, já que essa doença negligenciada afeta principalmente áreas pobres, onde o acesso, os cuidados médicos e os medicamentos são limitados (OMS, 2012; MSF, 2012). O tratamento disponibilizado possui limitações, exigem períodos prolongados, além de possuir custo e toxicidade elevados. A resistência à medicação também é outra dificuldade, especialmente na Índia, onde 65% dos pacientes não respondem ao tratamento com antimoniais (MSF, 2012). A busca por terapias alternativas é de extrema necessidade nos dias atuais, e o reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma ferramenta de suma importância nessa busca.

A escolha dos fármacos neste projeto foi baseada na estrutura química dos mesmos, selecionando-se compostos com o átomo de nitrogênio em anéis aromáticos. Outros aspectos considerados nesta seleção também incluíram: i) compostos azólicos, classe esta conhecida por possuir atividade anti-*Leishmania*, e presença de anel imidazólico (bifonazol, clotrimazol e econazol); ii) fármacos com atividade anti-*Leishmania donovani in vivo* (nitazoxanida) e iii) presença de anel piperazínico (hidroxizina e quetiapina).

Com base nos relatos de atividade *in vivo* contra *L. donovani*, o fármaco nitazoxanida foi escolhido para investigação do seu mecanismo de ação e da associação com os fármacos padrões. A escolha do fármaco loratadina para estudos de mecanismo de ação se deu pelo ineditismo da atividade anti-*Leishmania* de anti-histamínicos.

2. Objetivos

- 1- Avaliar a Concentração Efetiva 50% *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* do bifonazol, clotrimazol, cloxazolam, econazol, hidroxizina, loratadina, nitazoxanida e quetiapina.
- 2- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos mesmos fármacos em células de mamífero NCTC clone 929.
- 3- Avaliar *in vitro* os possíveis mecanismos de ação dos fármacos nitazoxanida e loratadina em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* como: i) alteração da permeabilidade da membrana celular; ii) avaliação do potencial da membrana mitocôndrial, iii) produção de espécies reativas de oxigênio, iv) exposição de fosfatidilserina.
- 4- Avaliar as alterações ultraestruturais causadas em promastigotas de *L. (L.) infantum* pela incubação com o fármaco loratadina e nitazoxanida, por microscopia eletrônica de transmissão.
- 5- Realizar a associação *in vitro* do fármaco nitazoxanida com fármacos padrões (anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes e compostos sintéticos

Alamar blue[®] (resazurin), SYTOX[®] green dye, Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS, H₂DCf-DA, Kit Apoptose Anexina-V FITC foram adquiridas da Molecular Probes[®] (Invitrogen). Dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol foram obtidos da Merck. Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), meio 199 (M-199) e Phosphate-buffered saline (PBS) foram adquiridos da Sigma.

Anfotericina B, antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime[®]) e isotionato de pentamidina foram adquiridos da Cristália, Aventis e Sideron, respectivamente. Bifonazol, clotrimazol, nitrato de econazol foram doados pela farmacêutica Bayer (Brasil). Hidrocloreto de hidroxizina, loratadina, miltefosina, nitazoxanida e sitamaquina foram adquiridos da Sigma. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma.

3.2. Parasitas, células de mamífero e animais de experimentação

3.2.1. *Leishmania (L.) infantum*

As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 0,25% de hemina, sob a temperatura de 24° C em estufa BOD, livre da adição de antibióticos.

As formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* foram obtidas procedendo-se a centrifugação diferencial de baço de hamsteres previamente infectados e o número de parasitas foi determinado pelo método descrito por Stauber e colaboradores (1958), 60 a 70 dias pós-infecção.

3.2.2. NCTC

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do American Type Culture Collection (ATCC CCL1), fornecida pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, SP, foram armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70 °C e posteriormente mantidas em meio M-199 suplementado com 10% SFB, sob a temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO₂, livre da adição de antibióticos.

3.2.3. Animais de experimentação

Os animais foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 1×10^8 amastigotas por animal 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 no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (0085-2010).

3.3. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos estudados

Os fármacos testados (bifonazol, clotrimazol, cloxazolam, hidrocloreto de hidroxizina, loratadina, nitazoxanida, nitrato de econazol e quetiapina) foram dissolvidos em DMSO ou metanol. Os fármacos padrões anfotericina B, isotianato de pentamidina, miltefosina e sitamaquina foram dissolvidos em água mili-Q estéril, enquanto que o Glucantime[®] foi usado em sua formulação original. Em seguida, os fármacos estudados foram diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes

concentrações com o objetivo de se determinar as respectivas CE_{50} . A concentração do solvente foi inferior a 0,5% do volume final do poço, para não causar danos aos parasitas, conforme prévio conhecimento de nosso grupo. A CE_{50} dos fármacos foi determinada utilizando promastigotas ou amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* ou células de mamíferos, conforme descrito a seguir.

3.3.1. Ensaios com promastigotas

Utilizaram-se promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase estacionária. A quantidade de célula utilizada foi 1×10^6 células por poço em placas pretas de 96 poços (Brand[®]) contendo os diferentes fármacos, diluídos em meio M-199 suplementado com 10% SFB, sem a adição de antibióticos. Após um período de 48 horas de incubação em estufa BOD à 24 °C, adicionou-se 10% de resazurina (Alamar Blue[®]). Em seguida, a placa foi incubada por mais 48 horas sob as mesmas condições. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 595 nm (Mikus e Steverding, 2000). Como controle positivo (100% de células mortas), utilizou-se o fármaco padrão anfotericina B, devido a sua utilização na terapia clínica, e como controle (100% de células vivas), utilizaram-se células não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados pelo menos dois ensaios distintos.

3.3.2. Ensaios com amastigotas

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por meio de lavagem em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB. Semeram-se 1×10^5 macrófagos por poço em placas de 16 poços (NUNC[®]) que formam incubados por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram infectados com amastigotas purificadas de baço de hamster infectado na

proporção de 10:1 amastigotas/macrófago, ou seja, 1×10^6 amastigotas por poço, e foram incubados por 24 horas. Posteriormente, os macrófagos infectados foram tratados com os fármacos em estudo que foram seriadamente diluídos e incubados por 120 horas sob as mesmas condições (Tempone et al., 2005). Ao final do ensaio, os poços foram retirados e a lâmina foi fixada em metanol, corada com Giemsa e observada em microscópio ótico. A CE_{50} foi determinada por meio da contagem de 500 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley e Croft, 2000). Como controle do ensaio foram utilizados macrófagos infectados não tratados, e como controle positivo foram utilizados macrófagos infectados tratados com os fármacos em uso clínico anfotericina B e Glucantime[®]. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.3.3. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se células NCTC (clone 929), 6×10^4 células/poço, incubadas com os fármacos que foram seriadamente diluídos em meio M-199 com 10% SFB em placas pretas de 96 poços. Incubou-se por 48 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 e em seguida, adicionou-se 10% de Alamar Blue[®]. Incubou-se por mais 20 horas e a leitura foi feita da mesma forma descrita anteriormente para promastigotas. Anfotericina foi utilizada como controle positivo (100% de células mortas) e como controle (100% de células vivas), utilizaram-se células não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos.

Para avaliar o Índice de Seletividade (IS) dos fármacos em estudo, utilizou-se a seguinte razão:

$IS = CE_{50}$ em células de mamífero/ CE_{50} em amastigotas intracelulares; onde os fármacos com IS maior que 1 foram considerados seletivos.

3.4. Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas de *L. (L.) infantum*

3.4.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

O SYTOX[®] Green é um fluoróforo utilizado para avaliar a permeabilidade da membrana das células através de sua ligação ao DNA. Neste caso, o método foi utilizado para observar se os fármacos estudados alteravam ou não a permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum*. Os fármacos testados foram loratadina e nitazoxanida, todos com os seus respectivos valores de Concentração Efetiva a 100% (CE₁₀₀). As formas promastigotas (2x10⁶ parasitas/poço) foram lavadas com PBS e incubadas com 30 µL de SYTOX[®] Green (1 µM) em placas pretas de 96 poços por 15 minutos em estufa BOD à 24 °C, e posteriormente, foram adicionados os fármacos. O aumento na fluorescência devido à ligação do marcador fluorescente ao DNA do parasita foi mensurado utilizando-se espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. As leituras foram realizadas a cada 20 minutos num total de 80 minutos. A normalização das leituras foram realizadas subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,5% (controle positivo) (Kulkarni et al., 2009). Este ensaio também foi usado para avaliar a cinética de penetração de SYTOX[®] Green, onde as leituras foram realizadas a cada hora num total de 24 horas. Poços contendo os fármacos em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar o possível aumento de fluorescência na presença pelos fármacos. Além disso, o solvente utilizado, metanol ou DMSO, foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

3.4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS é um fluoróforo que se acumula em mitocôndrias viáveis e seu acúmulo é dependente do potencial de membrana mitocondrial. Esse fluoróforo difunde-se passivamente através da membrana plasmática e acumula-se na mitocôndria ativa. O Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS está na forma reduzida e por isso não fluoresce até que entre nas células vivas, onde sofre oxidação, gerando fluorescência. Esse método foi utilizado para avaliar o potencial da membrana mitocondrial de *L. (L.) infantum*. Formas promastigotas (2x10⁶ parasitas por poço) foram lavadas duas vezes em PBS e incubadas com os fármacos estudados por 60 minutos no escuro. Os fármacos loratadina e nitazoxanida foram testados com os seus respectivos valores de CE₁₀₀. Em seguida, adicionou-se 20 µL de Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS a 500 nM e incubou-se por mais 40 minutos no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em PBS e a leitura foi realizada imediatamente em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 595 nm. Como controle, utilizaram-se parasitas não tratados. A normalização da leitura foi realizada subtraindo-se as amostras da fluorescência basal do fluoróforo. Poços contendo os fármacos em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência dos fármacos. Além disso, o solvente utilizado, metanol ou DMSO, foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

3.4.3. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína utilizada como um indicador de ROS. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, a sonda H₂DCF-DA que não é fluorescente é convertida para a forma altamente fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein

(DCF). Esse método foi utilizado para avaliar a produção de ROS nos parasitas. Promastigotas de *L. (L.) infantum* (2×10^6 parasitas por poço) foram lavados em solução HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) e incubados com os fármacos loratadina e nitazoxanida, no valor da CE_{100} por 60 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas por 15 minutos com $H_2DCF\text{-}DA$ (5 μM) e foi feita a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Como controle positivo, utilizaram-se parasitas tratados com oligomicina (20 μM) (Carvalho et al., 2011) e como controle, utilizaram-se parasitas não tratados. A normalização da leitura foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). Poços contendo os fármacos em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência dos fármacos. Além disso, o solvente utilizado, metanol ou DMSO, foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

3.4.4. Alteração na exposição de fosfatidilserina

A anexina V é utilizada como sonda para detectar as células que expressaram a fosfatidilserina (PS) sobre a superfície da célula, um evento encontrado na apoptose. O ApoTarget™ Anexina V-FITC Apoptosis Kit possui anexina-V marcada com fluoresceína e iodeto de propídio (PI), o qual se liga ao DNA. O regime de coloração dupla (anexina e PI) permite detectar três distintas populações de células, tais como, células não-apoptóticas (anexina-V negativa e PI negativo), células em apoptose precoce (anexina V-positiva e PI negativo) e células necróticas ou células em apoptose tardia (anexina V-positiva e PI positivo). Os parasitas (2×10^6 por poço) foram lavados em meio M-199 e incubados com os fármacos nitazoxanida e loratadina, ambos com seus CE_{100} em diferentes tempos de incubação. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen) e a leitura foi realizada em citometria de fluxo utilizando o filtro

de excitação de 488 nm. Como controle, utilizaram-se parasitas não tratados e como controle positivo, utilizaram-se o fármaco miltefosina. Poços contendo os fármacos em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência dos fármacos. Além disso, o solvente utilizado, metanol ou DMSO, foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

3.4.5. Estudo das alterações ultraestruturais em *Leishmania*

O presente estudo teve como objetivo observar as alterações geradas em promastigotas de *L. (L.) infantum* após diferentes tempos de incubação com os fármacos loratadina e nitazoxanida. Os parasitas (1×10^7 por poço) foram lavados em meio M-199 e incubados à 24 °C com os fármacos em tempos variados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e lavadas três vezes em PBS. Após as lavagens, as células foram fixadas 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 analisado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL) no Instituto Adolfo Lutz. Como controle interno, utilizaram-se parasitas incubados com o solvente utilizado para diluir os compostos (metanol ou DMSO), para verificar possível interferência nos resultados.

3.5. Determinação *in vitro* das associações entre nitazoxanida e fármacos padrões

Nitazoxanida foi associada *in vitro* com fármacos padrões anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina e a natureza das associações foi avaliada em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* utilizando-se o método de isoblograma modificado (Fivelman et al., 2004, Reimão e Tempone, 2011). Para a associação de fármacos foi

realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.2., utilizando dois fármacos nas proporções pré-determinadas. Para cada associação, os valores de CE_{50} de cada fármaco isolado foram previamente determinados, assegurando assim o ponto de partida da diluição seriada de base dois. Os fármacos estudados foram dissolvidos em seus respectivos solventes e diluídos em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. As concentrações foram preparadas nas seguintes proporções de nitazoxanida e fármacos padrões: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, em placas de 16 poços, em duplicata (**Figura 13**).

A concentração inicial dos fármacos usados foi: 220 μ M para nitazoxanida (NTZ), 0,8 μ M para anfotericina B, 180 μ g/mL para Glucantime[®] (GLU), 150 μ M para miltefosina e 26 μ M para sitamaquina, com a finalidade de seu CE_{50} ficar próximo ao quarto poço da diluição. Também foram usados dois poços no final de cada placa como controle positivo (100% infecção).

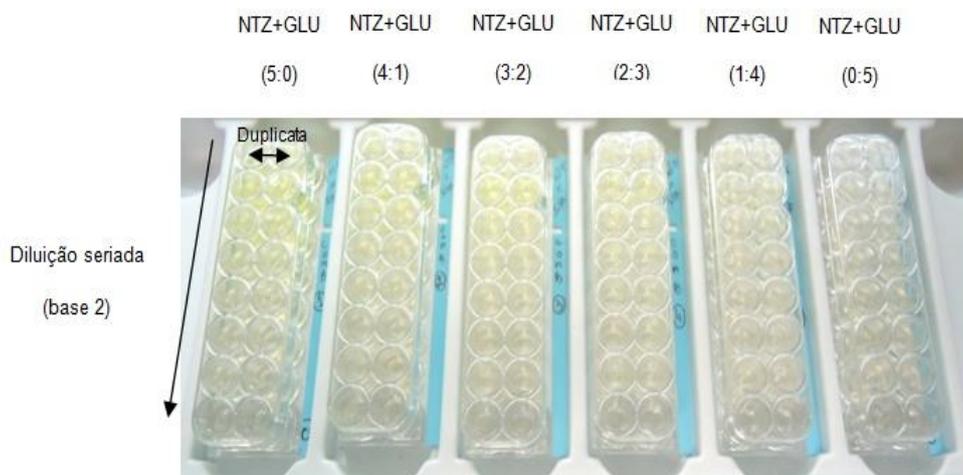


Figura 13: Ensaio de associação de NTZ e GLU em placas de 16 poços (NUNC[®]); foram usadas seis placas para associar dois fármacos, cada placa representa uma proporção de fármacos.

Fonte: arquivo pessoal.

A partir da CE_{50} de cada associação, foram realizados os seguintes cálculos:

- Concentração Inibitória Fracionária (CIF) = CE_{50} do fármaco combinado / CE_{50} do fármaco individual;
- Somatória da Concentração Inibitória Fracionária (Σ CIF) = CIF do fármaco A + CIF do fármaco B;
- Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária ($X\Sigma$ CIF) = somatória das Σ CIF / 4.

A $X\Sigma$ CIF foi utilizada para classificar as associações dos fármacos avaliados. Quando a $X\Sigma$ CIF for menor ou igual a 0,5 a associação foi considerada sinérgica, quando for maior que 0,5 e menor ou igual a 4, a associação foi considerada indiferente e quando for maior que 4, a associação foi considerada antagônica (Odds, 2003).

3.6. Análises estatísticas

A CE_{50} dos fármacos analisados foi determinada por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (r). As diferenças entre amostras foram estatisticamente avaliadas por meio dos valores de P (one-way ANOVA, nonparametric).

4. Resultados

4.1. Determinação da atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade *in vitro* dos fármacos.

Os compostos foram incubados por 48 horas com formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e a viabilidade determinada pelo método fluorimétrico com Alamar Blue[®]. Todos os fármacos apresentaram atividade contra as formas promastigotas, matando 100% dos parasitas na concentração máxima testada. A CE₅₀ variou entre 2 a 167 µM, sendo o clotrimazol o fármaco mais ativo e o cloxazolam o menos ativo. Apenas o econazol e a nitazoxanida apresentaram atividade contra formas intracelulares, com valores de CE₅₀ entre 11 a 22 µM (**Tabela 2**). Os fármacos padrões anfotericina B, sitamaquina, miltefosina e pentamidina demonstraram valores CE₅₀ entre 0,1 a 16 µM em formas promastigotas e CE₅₀ entre 0.07 a 16 µM contra formas amastigotas. O medicamento Glucantime[®] apresentou uma CE₅₀ de 22 µg/mL (**Tabela 3**).

A citotoxicidade dos fármacos foi demonstrada em células NCTC clone 929 após 48 horas de incubação, e a viabilidade foi determinada pelo método fluorimétrico com Alamar Blue[®]. Todos os fármacos apresentaram citotoxicidade, sendo o clotrimazol o fármaco que apresentou o menor valor de CE₅₀ (39 µM) e o cloxazolam o maior valor CE₅₀ (270 µM). Considerando a relação entre atividade antiparasitária contra formas amastigotas e a toxicidade contra células NCTC, observa-se que a nitazoxanida e o econazol apresentaram um Índice de Seletividade de aproximadamente 3 (**Tabela 2**). Os fármacos padrões também foram incluídos nos ensaios de citotoxicidade, sendo que a anfotericina B, sitamaquina, miltefosina e pentamidina demonstraram uma CE₅₀ entre 33 a 319 µM. O medicamento Glucantime[®] não apresentou citotoxicidade até a concentração máxima de 200 µg/mL (**Tabela 3**).

Tabela 2: Valores expressos em μM das CE_{50} dos fármacos estudados contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* e citotoxicidade em células de mamífero NCTC clone 929 e IS dos fármacos.

Fármaco	CE_{50} (μM) IC 95%			
	Promastigotas	Amastigotas	Células NCTC	IS
bifonazol	8,97 (8,39 – 9,58)	na	41,81 (19,98 – 87,47)	nd
clotrimazol	2,81 (2,55 – 3,10)	na	39,24 (33,71 – 45,68)	nd
cloxazolam	167,80 (143,90 - 195,58)	na	270,50 (257,60 – 284,10)	nd
econazol	5,36 (4,60 - 6,25)	11,95 (3,28 – 43,49)	42,69 (37,18 – 49,01)	3,6
hidroxizina	59,57 (58,36 - 60,81)	na	159,50 (148,70 – 171,10)	nd
loratadina	52,96 (31,48 - 89,10)	na	69,52 (55,58 – 86,82)	nd
nitazoxanida	139,00 (93,63 - 206,50)	22,08 (21,19 – 23,00)	68,14 (58,28 – 79,67)	3,08
quetiapina	84,64 (79,45 – 90,16)	na	229,20 (186,10 – 282,20)	nd

CE_{50} : Concentração Efetiva 50%; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; nd: não determinado; na: não ativo.; IS: Índice de Seletividade, dados pela razão entre CE_{50} em células de mamíferos e CE_{50} em amastigotas intracelulares.

Tabela 3: Valores expressos em μM das CE_{50} dos fármacos padrões contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* e citotoxicidade em células de mamífero NCTC clone 929 e IS dos fármacos.

Fármaco	CE_{50} (μM) IC 95%			
	Promastigotas	Amastigotas	Células NCTC	IS
anfotericina B	0,10 (0,09 – 0,11)	0,07 (0,07 – 0,08)	319,80 (302,00 – 338,60)	4.568,57
Glucantime [®] *	nd	22,80 (20,76 – 25,04)	>200	>8,7
miltefosina	16,43 (15,45 – 17,46)	16,86 (11,57 – 24,57)	122,00 (94,78 – 157,00)	7,23
pentamidina	0,74 (0,70 – 0,77)	nd	38,51 (31,81 – 46,61)	nd
sitamaquina	3,22 (2,92 – 3,55)	3,22 (3,16 – 3,28)	33,89 (32,05 – 35,85)	10,52

CE_{50} : Concentração Efetiva 50%; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; nd: não determinado; na: não ativo; * valor expresso em $\mu\text{g/mL}$; IS: Índice de Seletividade, dados pela razão entre CE_{50} em células de mamíferos e CE_{50} em amastigotas intracelulares.

4.2. Avaliação dos mecanismos de ação dos fármacos loratadina e nitazoxanida em *L. (L.) infantum*

4.2.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

Os fármacos nitazoxanida e loratadina foram incubados por até 80 minutos com promastigotas de *L. (L.) infantum* e a permeabilidade da membrana plasmática avaliada com SYTOX[®] Green. Conforme indicado na **figura 14**, se observou que a nitazoxanida não alterou o influxo da sonda durante os 80 minutos de incubação, não apresentando diferença significativa quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p > 0,05$). Já o fármaco loratadina permitiu o influxo da sonda fluorescente após 20 minutos de incubação; aos 60 e 80 minutos de incubação, se observou significativo influxo da sonda quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p < 0,05$). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 (controle positivo) e se observou significativo influxo da sonda quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p < 0,002$).

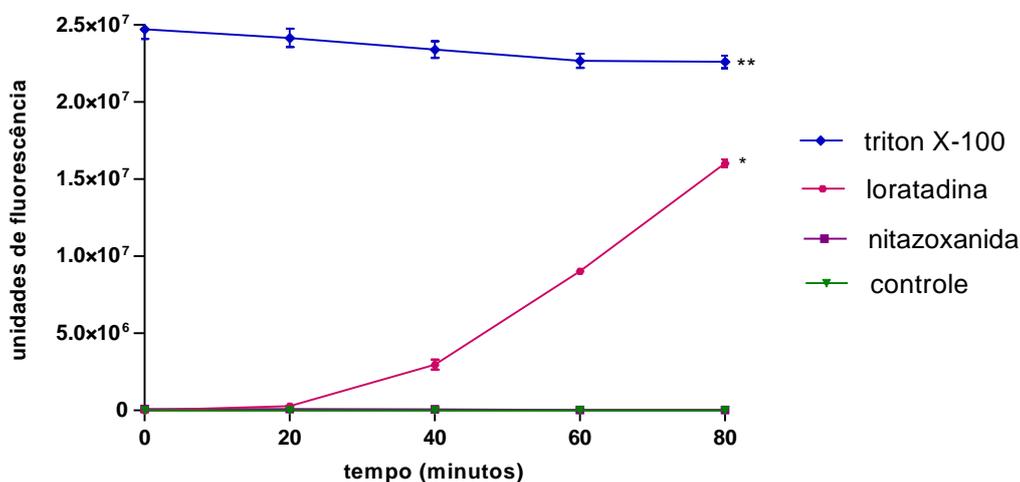


Figura 14: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum*, representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX green[®]. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,002$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo.

A avaliação da cinética de penetração de SYTOX Green foi avaliada por um período de 24 horas com os dois fármacos testados (dados não mostrados). A nitazoxanida apresentou aumento de influxo da sonda a partir de 12 horas de incubação, com aumento gradual até 24 horas de incubação. A loratadina iniciou o influxo da sonda com 20 minutos de incubação e atingiu seu ponto máximo de influxo após 18 horas de incubação.

4.2.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas foi monitorada pela sonda Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS. Para isto, parasitas não tratados (controle), foram incubados com a sonda. Após 60 minutos de incubação, os níveis de fluorescência detectados representam o funcionamento normal do potencial de membrana mitocondrial da célula. Os resultados demonstraram que o fármaco nitazoxanida (**figura 15**) reduziu em 100% a oxidação da sonda, resultando em níveis de fluorescência não detectáveis. A comparação entre o grupo controle e a nitazoxanida resultou em valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). O fármaco loratadina (**figura 15**), reduziu em 89% a oxidação da sonda, porém este decréscimo não foi significativo ($p > 0,05$) quando comparado ao controle (**figura 15**).

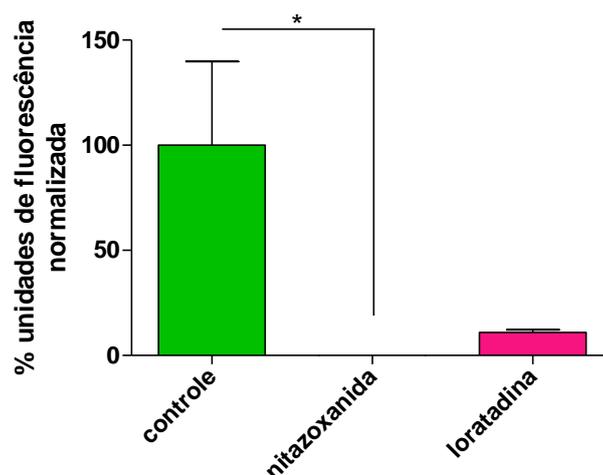


Figura 15: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando a sonda Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS realizada após uma hora de incubação com os fármacos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * ($p < 0,05$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo.

4.2.3. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A regulação de ROS em promastigotas foi avaliada na presença dos fármacos após 60 minutos de incubação, utilizando-se a sonda H₂DCF-DA. Parasitas não tratados (controle) foram utilizadas com o objetivo de normalizar o resultado obtido após incubação com os fármacos em teste. O fármaco nitazoxanida (**figura 16**) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de ROS nos promastigotas em relação ao controle. Desta forma, observou-se ainda que no grupo tratado com nitazoxanida, a fluorescência foi cerca de 36% superior àquela encontrada no controle positivo da reação, dado pela oligomicina (**figura 16**). O fármaco loratadina não alterou a produção de ROS nos promastigotas quando comparada ao controle.

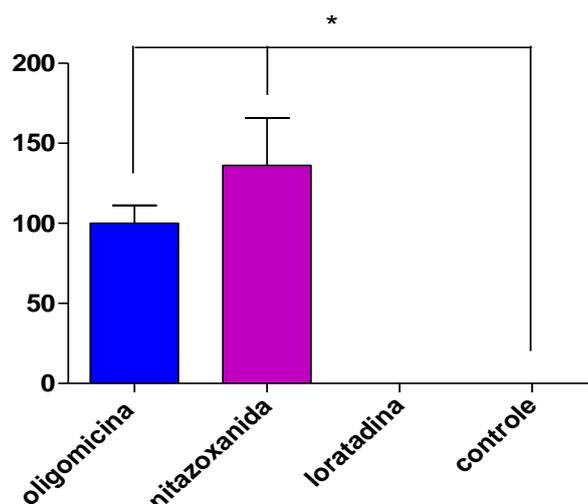


Figura 16: Avaliação da produção de ROS em promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando a sonda H_2DCF -DA realizada após uma hora de incubação com os fármacos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * ($p < 0,05$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo.

4.2.4. Exposição de fosfatidilserina

A exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* foi avaliada na presença dos fármacos loratadina (18 horas) e nitazoxanida (12, 16 e 24 horas), utilizando marcação com anexina V e observação por citometria de fluxo. Promastigotas sem marcação foram utilizadas como controle interno (**figura 17- A**). Parasitas não tratados foram usados como controle e após 24 horas de incubação, observaram-se os seguintes resultados: 6,58% mostraram-se positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 2% mostraram-se positivos para iodeto de propídeo e 1,75% mostraram-se positivos para anexina V (**figura 17-B**). Miltefosina foi usada como controle positivo para expressão de fosfatidilserina. Após 24 horas de incubação, 99,4% dos parasitas estavam positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 0,12% estavam positivos apenas para iodeto de propídeo e 0,018% positivos apenas para anexina V (**figura 17-C**).

Os resultados obtidos após 18 horas de incubação com o fármaco **loratadina** demonstraram que 96,8% dos parasitas estavam positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 1,53% dos parasitas positivos somente para iodeto de propídio e 0,22% dos parasitas positivos somente para anexina V (**figura 17-D**).

Após 12 horas de incubação com a **nitazoxanida**, cerca de 83,9% dos parasitas foram positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 3,97% estavam positivos somente para iodeto de propídio e 0,49% positivos apenas para anexina V (**figura 17-E**). Após 16 horas de incubação, cerca de 93,4% estavam positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 5,9% estavam positivos somente para iodeto de propídio e 0,04% positivos apenas para anexina V (**figura 17-F**). Após 24 horas de incubação, 97,4% dos parasitas estavam positivos tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio; 2,43% estavam positivos somente para iodeto de propídio e 0,024% positivos apenas para anexina V (**Figura 17-G**).

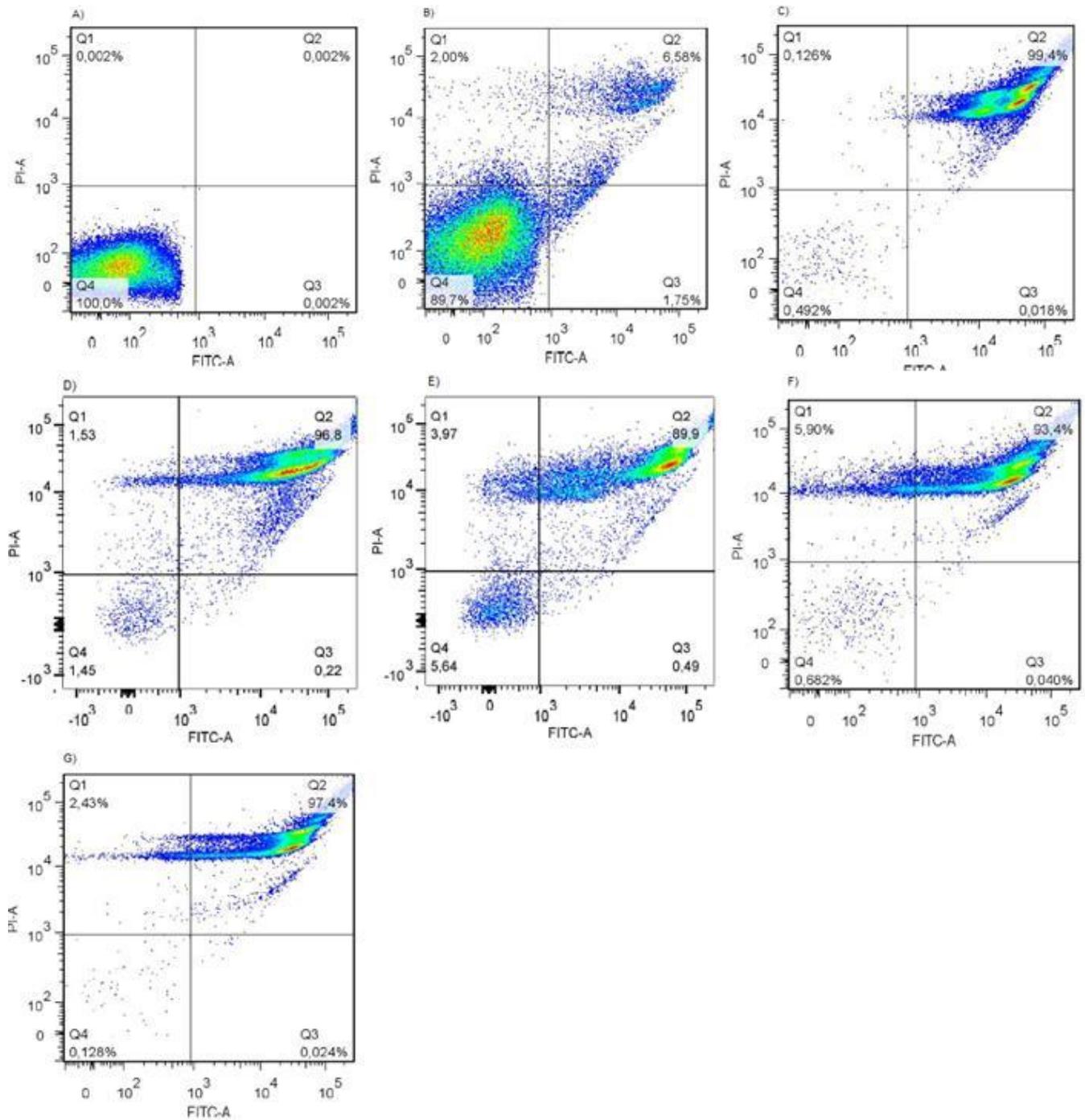


Figura 17: Análise por citometria de fluxo usando as sondas anexina V (FITC-A) e iodeto de propídio (PI-A) para avaliar a exposição de fosfatidilserina na superfície de membrana. A) controle interno (parasitas sem marcação); B) controle (parasitas não tratados, incubados por 24 horas); C) controle positivo (parasitas tratados com miltefosina por 24 horas); D) parasitas tratados com loratadina por 18 horas; E) parasitas tratados com nitazoxanida por 12 horas; F) nitazoxanida por 16 horas e G) nitazoxanida por 24 horas.

As possíveis alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum* foram avaliadas na presença dos fármacos utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão. Após 1 hora de incubação com o fármaco nitazoxanida, foi possível observar um pequeno aumento do volume da mitocôndria (**figura 18-B seta amarela**) e aumento na formação de vacúolos quando comparado ao controle (**figura 18-A**). Apesar disso, observou-se a preservação do cinetoplasto, assim como da membrana plasmática do parasita. Após 3 horas de incubação, observou-se que a nitazoxanida induziu um alargamento dos vacúolos (**seta vermelha**) assim como da mitocôndria (**figura 18-C seta amarela**). Após 6 horas de incubação observaram-se: i) destacamento da membrana nuclear (**seta branca**); ii) condensação da cromatina (**seta azul**); iii) aumento de vesículas (bolhas) na superfície da membrana plasmática (**seta laranja**) e, iv) aumento progressivo do volume da mitocôndria (**figura 18-D/E seta amarela**). Após 16 horas de incubação com nitazoxanida, a morfologia dos promastigotas foi completamente alterada para uma forma arredondada incomum, com redução do tamanho da célula (aproximadamente 2-3 vezes) e visíveis danos na membrana plasmática (poros), culminando em perda de organelas citoplasmáticas (**figura 18-F seta laranja**). Células tratadas com o solvente na concentração utilizada nos ensaios foram adicionadas como controle interno do ensaio, sendo compatíveis com o grupo controle (células não tratadas), onde se pode notar estruturas íntegras como núcleo, cinetoplasto, membrana plasmática, bolsa flagelar e flagelo.

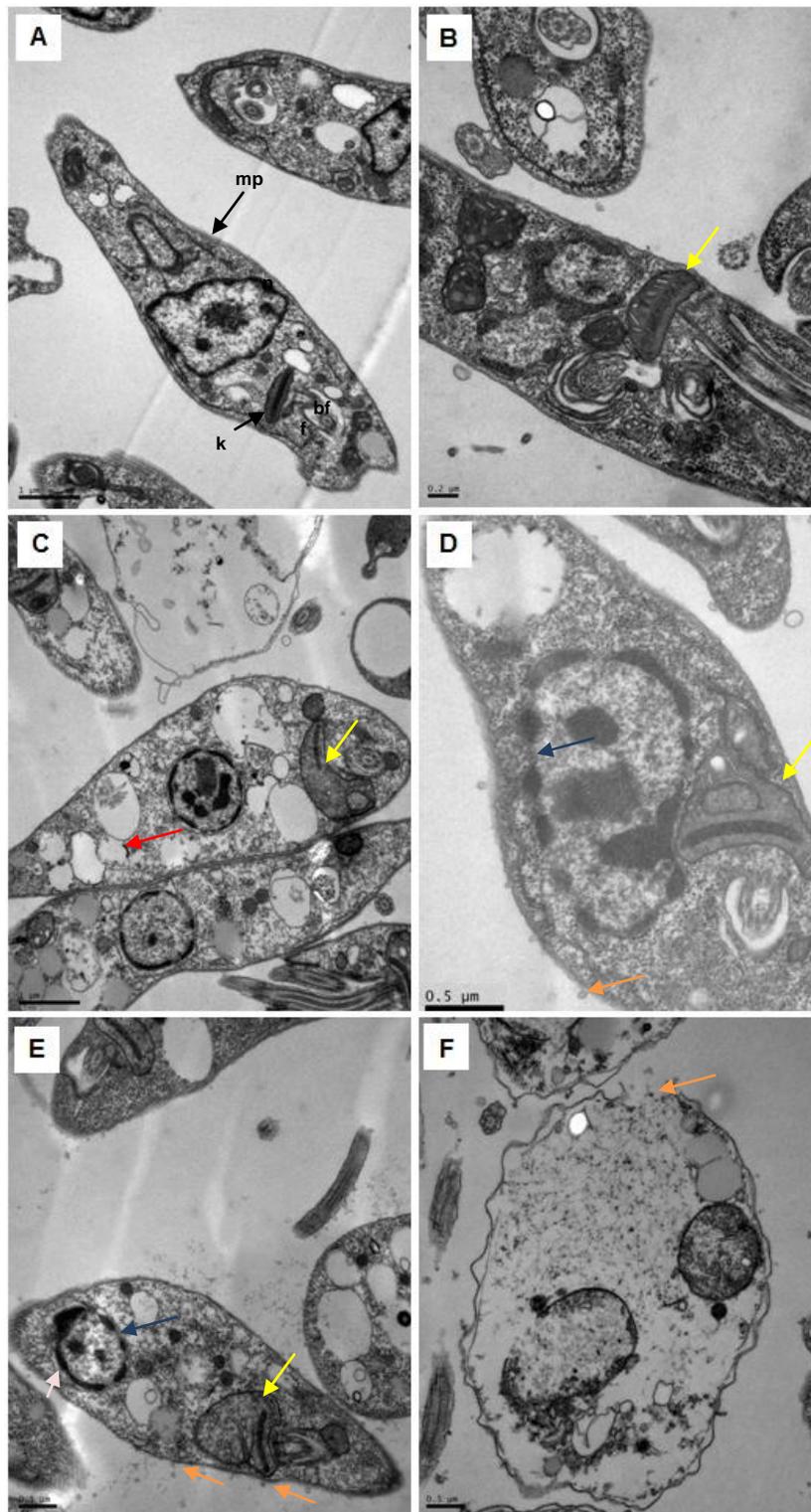


Figura 18: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados e incubados por diferentes períodos a 24 ° C. Imagem adquirida por microscopia eletrônica de transmissão. A) controle (parasitas não tratados incubados por 16 horas); B) parasitas tratados com nitazoxanida por 1 hora; C) nitazoxanida por 3 horas; D e E) nitazoxanida por 6 horas e F) nitazoxanida por 16 horas. K-cinetoplasto; n- núcleo; f-flagelo.

Logo após 1 hora de incubação com o fármaco loratadina, observaram-se intensos danos ultraestruturais nos promastigotas, incluindo o aparecimento de poros na membrana plasmática (**seta laranja**), bem como a formação de vacúolos (**seta vermelha**), inchaço da mitocôndria (**seta amarela**) e danos ao cinetoplasto (**Figura 19 - B**). Após 3 horas de incubação, observaram-se descolamento da bicamada da membrana plasmática (**seta laranja**), alteração da morfologia para uma forma arredondada, assim como intensos danos nucleares (**seta verde**) (**Figura 19 - C**). Após 6 horas de incubação, observaram 100% dos parasitas totalmente destruídos, com perda de organelas citoplasmáticas (**Figura 19 - D**). Células tratadas com o solvente na concentração utilizada nos ensaio foram adicionadas como controle interno do ensaio, sendo compatíveis com o grupo controle (células não tratadas), onde se encontram estruturas íntegras como núcleo, membrana plasmática e flagelo (**Figura 19 - A**).

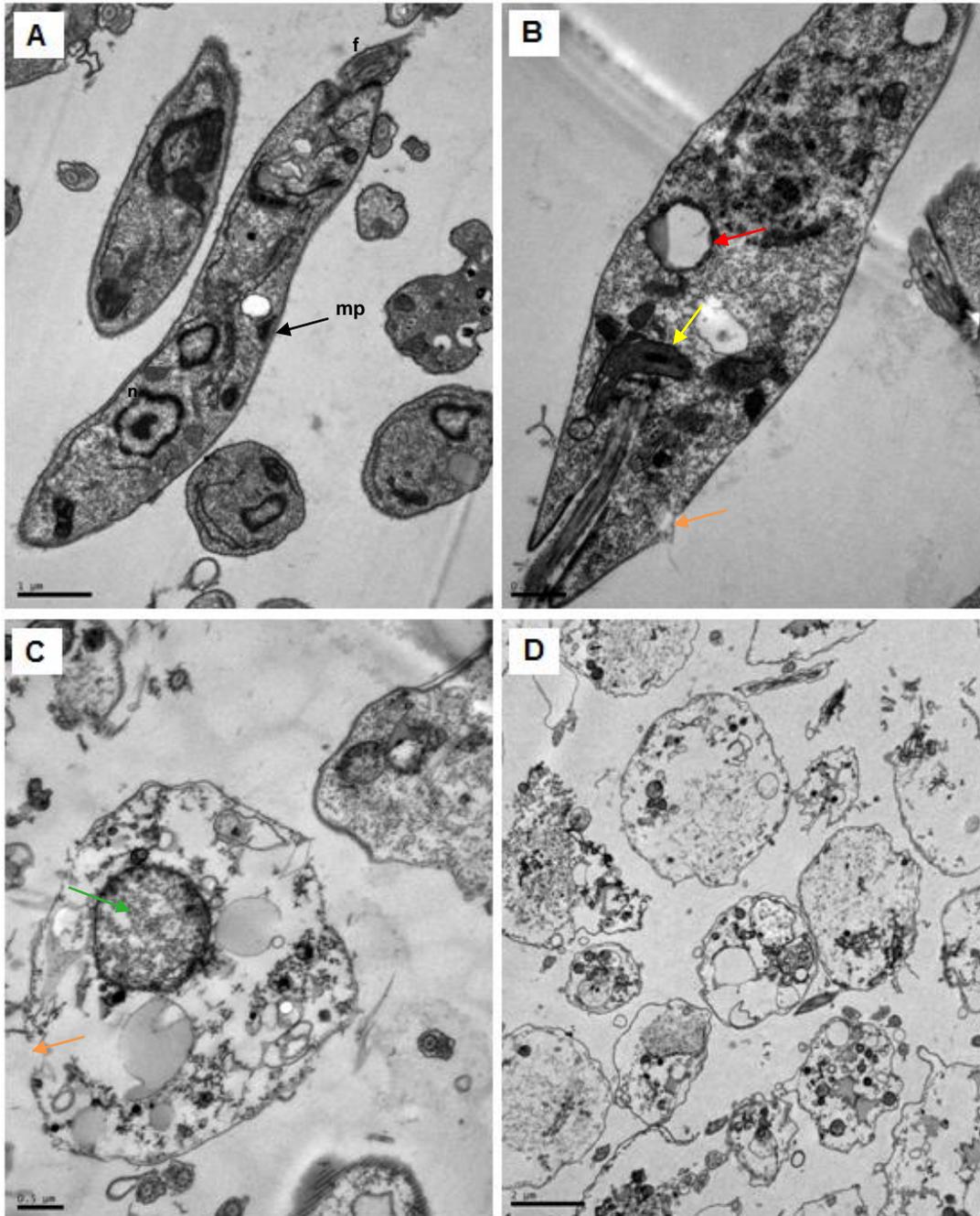


Figura 19: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados e incubados por diferentes períodos a 24° C. Imagem adquirida em microscopia eletrônica de transmissão. A) controle (parasitas não tratados incubados por 16 horas); B) parasitas tratados com loratadina por 1 hora; C) loratadina por 3 horas e D) loratadina por 6 horas. Núcleo (n), membrana plasmática (MP) e flagelo (f).

4.3. Associação entre nitazoxanida e fármacos padrões

As possíveis interações entre nitazoxanida e os fármacos padrões (anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina) foram avaliadas *in vitro* através do método de isoblograma de proporções fixas modificado utilizando-se amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* após 120 horas de incubação com os respectivos fármacos. Ao final de cada experimento de associação, foram geradas quatro curvas dose-resposta, correspondente às diferentes proporções em que os fármacos foram combinados (4:1, 3:2, 2:3, e 1:4) e duas curvas correspondentes aos fármacos isolados (5:0 e 0:5), totalizando seis curvas dose-resposta. As curvas obtidas pela associação de nitazoxanida e anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina são apresentados na **figura 20**. Conforme se pode observar, de uma forma geral houve uma mudança nas curvas sigmoidais dose-resposta da direita para a esquerda, indicando uma redução nos valores de CE₅₀ dos fármacos quando administrados em associação.

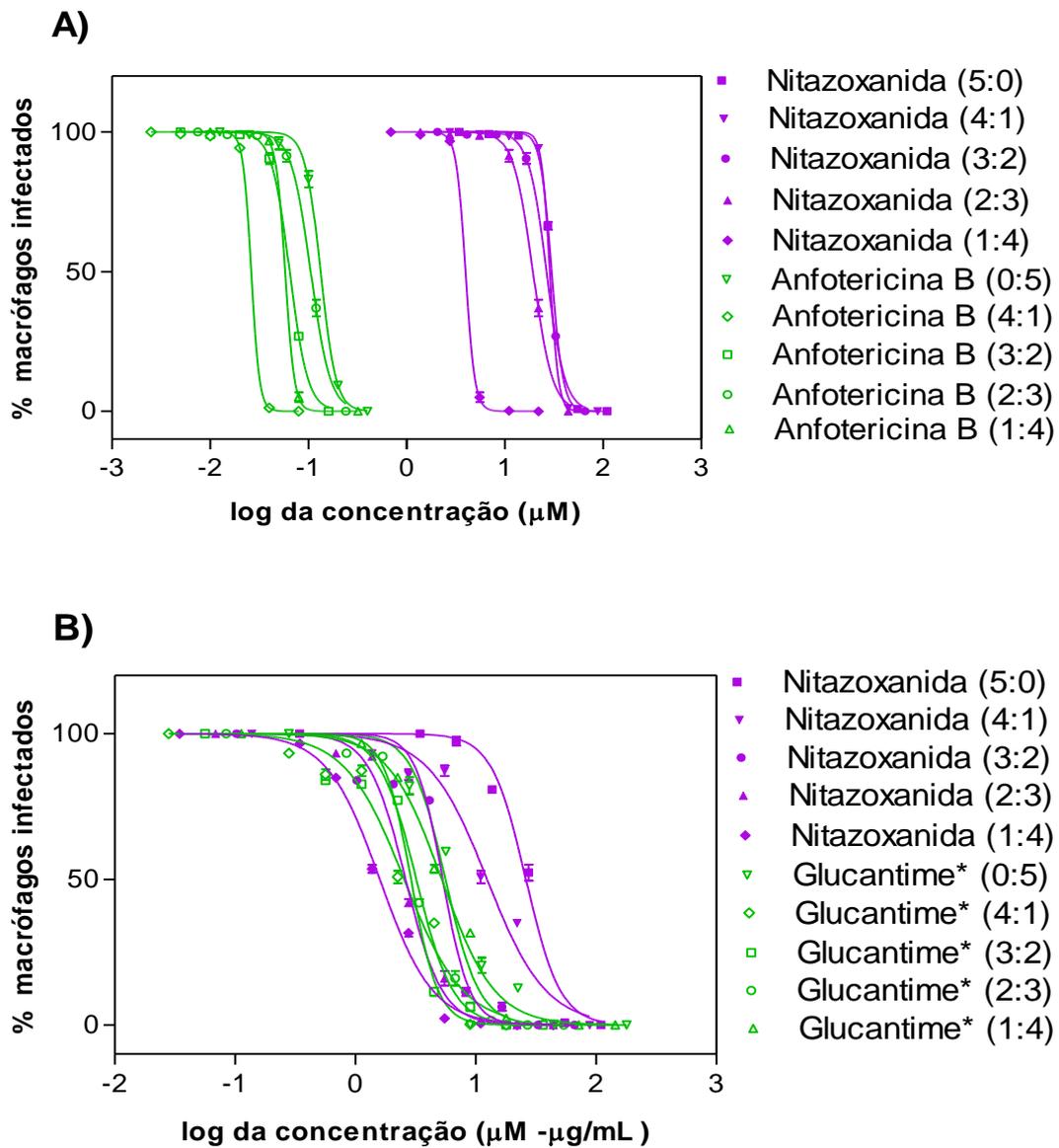
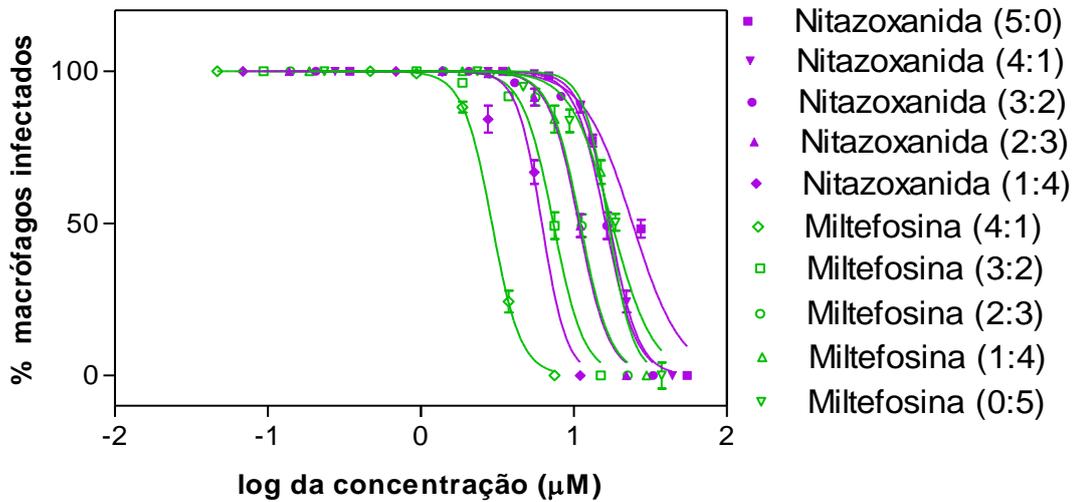


Figura 20: Curvas de dose-resposta geradas pela associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. *as concentrações do Glucantime[®] foram expressos em µg/mL.

C)



D)

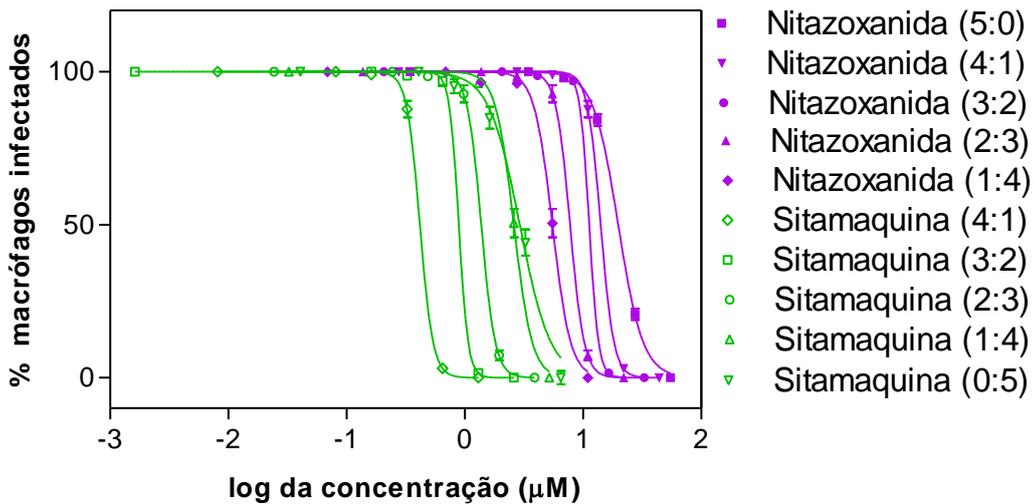


Figura 20 (continuação): Curvas de dose-resposta geradas pela associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. *as concentrações do Glucantime[®] foram expressos em µg/mL.

O fármaco nitazoxanida isoladamente apresentou valores de CE_{50} que variaram de 19,85 a 30,07 μM (**tabela 4**) enquanto que os fármacos padrões anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina isoladamente apresentaram valores de CE_{50} de 0,13 μM , 5,61 $\mu\text{g/mL}$, 17,76 μM e 2,92 μM , respectivamente (**tabela 4**). Como se pode observar na **tabela 4**, os valores de CE_{50} do fármaco “A” (nitazoxanida) diminuíram conforme se aumentou a dose do fármaco “B” (fármacos padrões) e vice-versa. Este comportamento é característico de interações indiferentes. Com base nos valores de CE_{50} de cada associação, calcularam-se as CIF de ambos os fármacos, as quais são apresentadas na **tabela 4**. Também se observou que as CIF do fármaco “A” (nitazoxanida) diminuíram conforme se aumentou a dose do fármaco “B” (fármacos padrões) e vice-versa. Ao se calcular a ΣCIF de cada associação, foram obtidos valores que variaram de 0,59 a 1,41. De acordo com a classificação adotada no presente trabalho, tais associações foram consideradas indiferentes com base nos valores de CIFs. Por sua vez, a média da ΣCIF , a qual representa o comportamento geral da associação, variou se 0,82 a 1,12 (**tabela 5**), indicando interações indiferentes.

Tabela 4: Valores de CE_{50} , CIF e Σ CIF gerados pela associação entre nitazoxanida e os fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*.

Fármaco associado		Proporção		CE ₅₀ da associação (µM) (IC 95%)		CIF da associação		ΣCIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B
Nitazoxanida	Antofercina B	5	0	30,07 (29,30 – 30,85)	-	-	-	-
		4	1	28,83 (27,58 – 30,14)	0,02 (0,02 – 0,03)	0,96	0,15	1,11
		3	2	26,65 (26,12 – 27,20)	0,06 (0,06 – 0,07)	0,89	0,46	1,35
		2	3	19,37 (18,76 – 19,99)	0,10 (0,10 – 0,11)	0,64	0,77	1,41
		1	4	3,98 (3,86 – 4,11)	0,06 (0,05 – 0,06)	0,13	0,46	0,59
		0	5	-	0,13 (0,12 – 0,14)	-	-	-
Nitazoxanida	Glucantime®	5	0	26,18 (24,53 – 27,93)	--	--	--	--
		4	1	12,44 (11,19 – 13,84)	2,54 (2,29 – 2,83)	0,47	0,45	0,92
		3	2	5,32 (4,83 – 5,86)	2,90 (2,64 – 3,20)	0,20	0,52	0,72
		2	3	2,62 (2,48 – 2,76)	3,21 (3,05 – 3,38)	0,10	0,57	0,67
		1	4	1,59 (1,51 – 1,68)	5,22 (4,96 – 5,50)	0,06	0,93	0,99
		0	5	-	5,61 (5,03 – 6,26)	-	-	-
Nitazoxanida	Miltefosina	5	0	24,20 (22,27 – 26,28)	-	-	-	-
		4	1	17,13 (16,56 – 17,71)	2,92 (2,82 – 3,02)	0,71	0,16	0,87
		3	2	16,19 (15,55 – 16,85)	7,36 (7,07 – 7,66)	0,67	0,41	1,08
		2	3	10,79 (10,37 – 11,22)	11,04 (10,61 – 11,48)	0,45	0,62	1,07
		1	4	6,19 (5,70 – 6,71)	16,87 (15,54 – 18,31)	0,26	0,95	1,21
		0	5	-	17,76 (16,43 – 19,20)	-	-	-
Nitazoxanida	Sitamaquina	5	0	19,85 (19,33 – 20,39)	-	-	-	-
		4	1	14,14 (13,58 – 14,71)	0,42 (0,40 – 0,43)	0,71	0,14	0,85
		3	2	11,30 (10,94 – 11,67)	0,89 (0,86 – 0,92)	0,57	0,31	0,88
		2	3	7,78 (7,49 – 8,07)	1,38 (1,33 – 1,43)	0,39	0,47	0,86
		1	4	5,51 (5,35 – 5,67)	2,60 (2,53 – 2,68)	0,28	0,89	1,17
		0	5	-	2,92 (2,73 – 3,12)	-	-	-

* as CE_{50} do Glucantime® foram expressas em µg/mL.

Tabela 5: Valores da $X\Sigma$ CIF da associação entre nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*.

Associação	$X\Sigma$CIF
Nitazoxanida + Anfotericina B	1,12
Nitazoxanida + Glucantime [®]	0,82
Nitazoxanida + Miltefosina	1,06
Nitazoxanida + Sitamaquina	0,94

$X\Sigma$ CIF: média da somatória das concentrações inibitórias fracionárias.

Outra forma de analisar os resultados de associação de fármacos é pela construção de isobogramas, que são representações gráficas onde se plotam os valores de CE_{50} ou de CIF de cada uma das associações e se analisa a posição de cada ponto em relação à linha de aditividade. Os isobogramas obtidos no presente trabalho são apresentados nas **figuras 21 e 22**, com base nos valores de CE_{50} e de CIF, respectivamente.

Na **figura 21**, os valores de CE_{50} das associações foram plotados e o intervalo de confiança 95% (IC 95%) foi representado por uma barra de erros ao redor de cada ponto. Com base no IC 95% dos fármacos aplicados isoladamente, gerou-se uma faixa de confiança, que foi identificada por duas linhas pontilhadas. A linha de aditividade, por sua vez, foi indicada por uma linha contínua, que foi gerada pela junção dos valores de CE_{50} dos fármacos aplicados isoladamente. Nesta figura se pode observar a presença de alguns pontos acima da linha de aditividade, tais como: P_2 , P_3 e P_4 na associação com anfotericina B e P_5 na associação com miltefosina e sitamaquina. Também foram observados pontos abaixo da linha de aditividade, como os pontos P_5 na associação com anfotericina B, P_3 e P_4 na associação com Glucantime[®], P_2 na associação com miltefosina e P_2 , P_3 e P_4 na associação com sitamaquina.

A análise dos pontos isolados em relação à linha de aditividade, contudo, considera que os valores abaixo da linha de aditividade são sinérgicos e os valores acima são antagônicos. Desta forma, os valores de CIF abaixo de 1 são considerados sinérgicos, acima de 1 são antagônicos e iguais a 1 são indiferentes ou aditivos. Esta forma de classificação foi

amplamente discutida e uma classificação mais conservadora foi proposta. Neste caso, os valores de CIF abaixo de 0,5 são considerados sinérgicos e os valores acima de 4 são considerados antagônicos, enquanto que os valores no intervalo de 0,5 a 4 são considerados indiferentes ou aditivos. Baseado nesta classificação, as associações entre nitazoxanida e os fármacos padrões apresentaram interação indiferente, como pode ser observado na **figura 22**. Nesta figura, os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado por linhas pontilhadas (**figura 22**). Desta forma, fica claro que, embora alguns pontos de localizem ligeiramente abaixo ou acima da linha de aditividade (**figura 21**), todos estes pontos se encontram dentro da faixa que classifica estes valores como indiferentes.

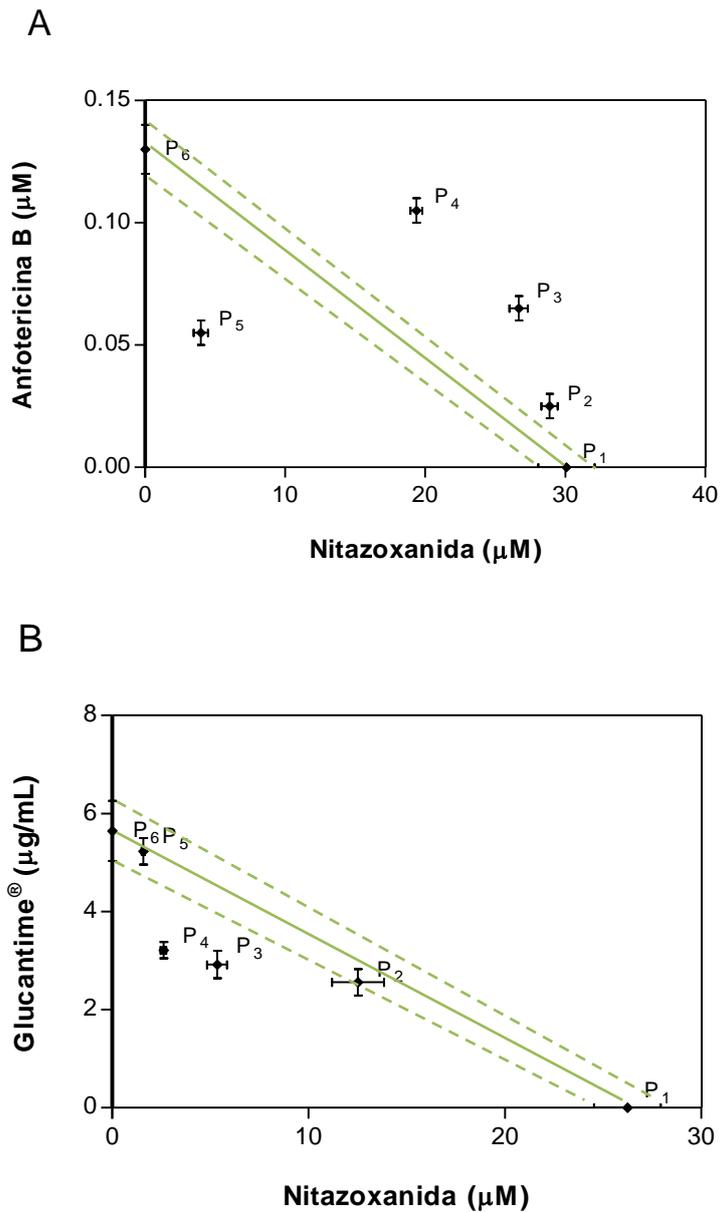
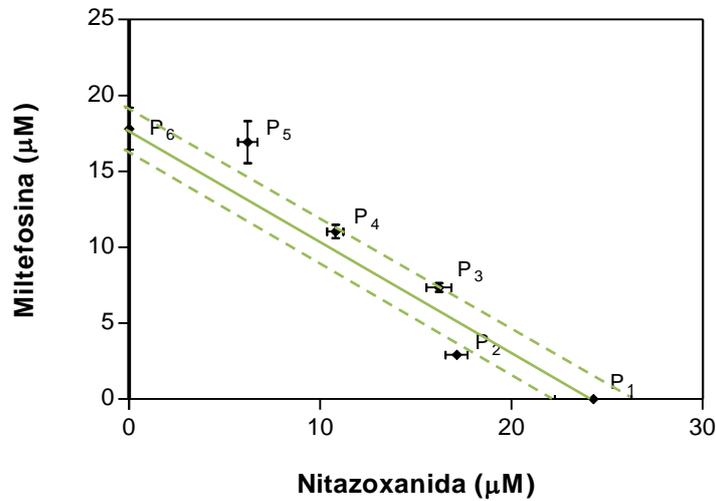


Figura 21: Isoblograma gerado com base nos valores de CE_{50} da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. Os pontos P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 e P_6 correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de nitazoxanida e os fármacos padrões, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade, as linhas pontilhadas indicam a faixa de confiança e as barras ao redor dos pontos correspondem aos intervalos de confiança. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina.

C



D

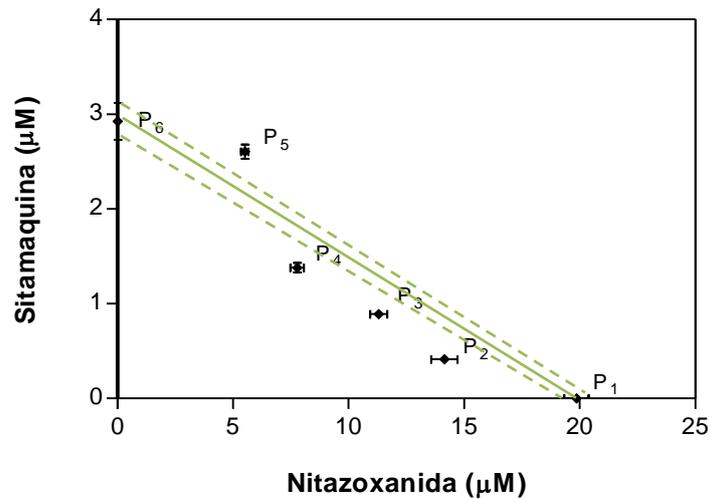


Figura 21 (continuação): Isoblograma gerado com base nos valores de CE_{50} da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. Os pontos P₁, P₂, P₃, P₄, P₅ e P₆ correspondem às proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de nitazoxanida e os fármacos padrões, respectivamente. A linha contínua corresponde à linha de aditividade, as linhas pontilhadas indicam as faixas de confiança e as barras ao redor dos pontos correspondem aos intervalos de confiança. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina.

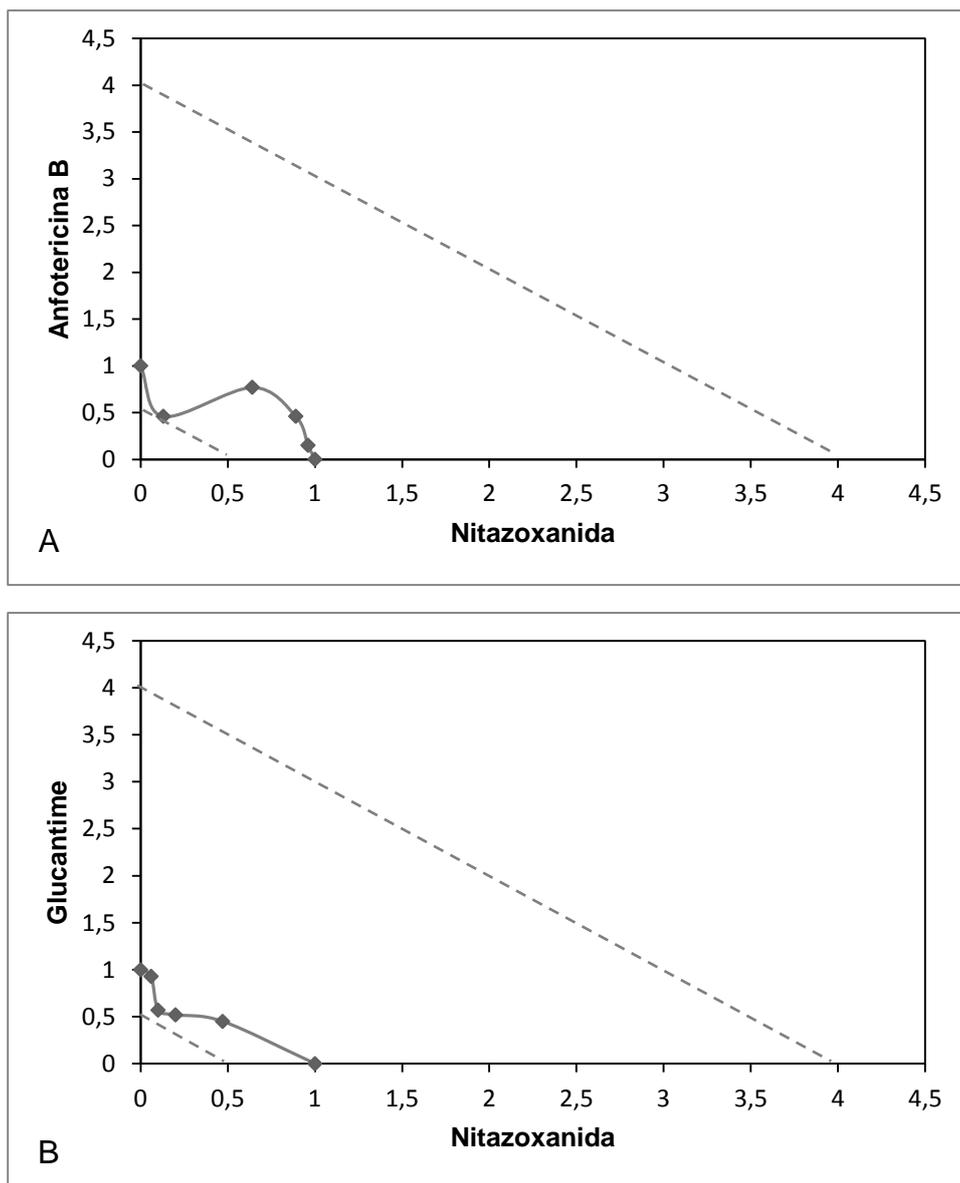


Figura 22: Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas.

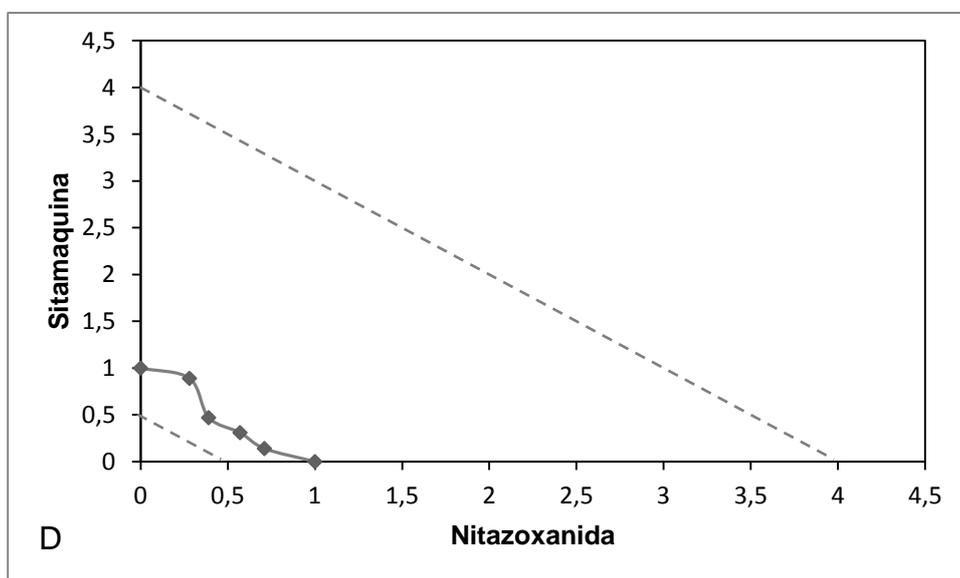
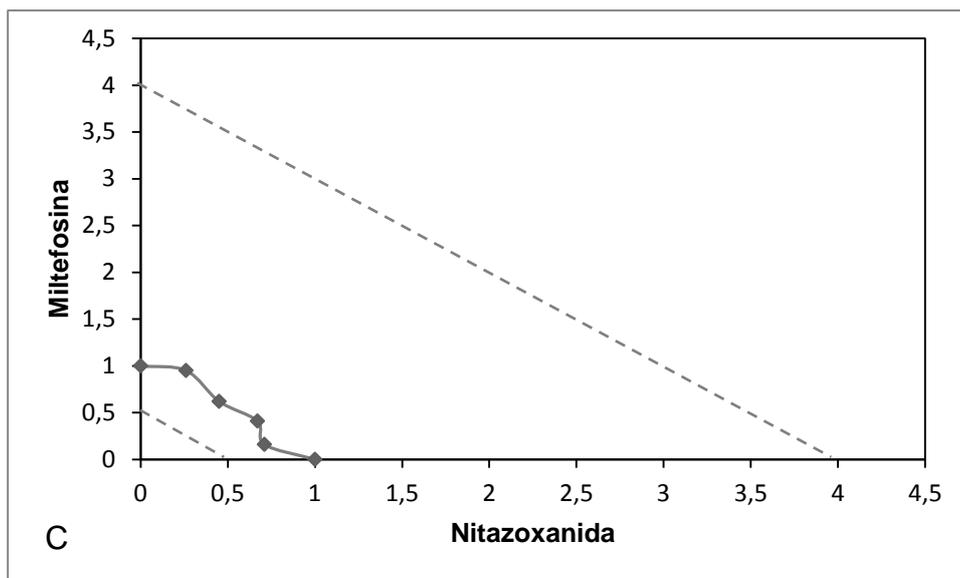


Figura 22 (continuação): Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação de nitazoxanida e fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. A) nitazoxanida e anfotericina B; B) nitazoxanida e Glucantime[®]; C) nitazoxanida e miltefosina; D) nitazoxanida e sitamaquina. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas.

5. Discussão

Doenças negligenciadas como a leishmaniose continuam a afetar milhões de pessoas, gerando sérios problemas para a saúde pública. Considerando ainda que a doença não dispõe de tratamento seguro e eficaz, a pesquisa por novos fármacos mais seletivos e acessíveis ao sistema público de saúde mostra-se inadiável. Desta forma, a busca por novos usos para os fármacos já disponíveis na clínica de outras doenças, estratégia esta conhecida como reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*), vem sendo uma abordagem amplamente utilizada para reduzir o tempo e o custo da pesquisa (Ekins et al., 2011). Considerando também a escassez de novas moléculas no mercado, em função da crise da indústria farmacêutica nos últimos anos, o reposicionamento também vem sendo utilizado pela indústria, possibilitando a extensão de patentes a um custo reduzido (Ekins et al., 2011).

No presente trabalho, realizou-se a triagem anti-*Leishmania* de oito fármacos nitrogenados, pertencentes a diferentes classes terapêuticas: i) anti-psicótico (quetiapina); ii) anti-histamínicos (loratadina, hidroxizina); iii) anti-helmíntico (nitazoxanida), antifúngicos (bifonazol, clotrimazol e econazol) e iv) ansiolítico (cloxazolam). Todos os fármacos testados apresentaram de forma inédita atividade contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, porém não demonstraram maior eficácia quando comparado aos fármacos padrões. Considerando que as formas amastigotas intracelulares são mais relevantes do ponto de vista clínico, e principalmente mais importantes para teste de novos fármacos, por se tratar de uma forma encontrada no hospedeiro vertebrado, os estudos foram conduzidos posteriormente em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*. Nossos estudos demonstraram que dentre os oito compostos testados, apenas a **nitazoxanida** e o **econazol** apresentaram atividade contra formas amastigotas intracelulares.

A **nitazoxanida** é um derivado nitrotiazólico, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 2002 para o tratamento de diarreia infecciosa causada por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* (Keeffe, 2009). No presente estudo, a atividade deste composto foi avaliada contra o agente etiológico da LV americana, *L. (L.) infantum*. As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* apresentaram suscetibilidade à nitazoxanida. Apesar da toxicidade para células de mamíferos, a nitazoxanida eliminou as formas amastigotas intracelulares com eficácia similar à miltefosina (fármaco padrão) e foi cerca de 3,3 vezes mais eficaz que o Glucantime[®]. A nitazoxanida vem sendo também investigada contra *L. (L.) donovani*. Nosso trabalho corrobora a atividade *in vitro* anti-*Leishmania* da nitazoxanida, com valores de CE₅₀ similares em promastigotas de *L. donovani* (Zhang et al., 2010). Este fármaco tem sido considerado um candidato promissor para leishmaniose. Zhang e colaboradores (2010), demonstraram que a nitazoxanida oral a 200 mg/kg reduziu cerca de 85% a carga parasitária de *L. (L.) donovani* em modelo murino. Novos derivados sintéticos também têm sido explorados, demonstrando que a nitazoxanida pode ser um interessante protótipo para o desenho e síntese de compostos mais seletivos (Navarrete-Vazquez et al, 2011).

Nossos dados descrevem pela primeira vez a atividade anti-*Leishmania* de um fármaco antipsicótico (**quetiapina**), assim como de fármacos anti-histamínicos (**hidroxizina** e **loratadina**). Estes três fármacos partilham uma mesma característica: são antagonistas de receptor H1 de histamina. Características comuns também se mostram presentes para os fármacos quetiapina e hidroxizina, como a ação depressora no sistema nervoso central e a presença do *anel piperazínico*. O *anel piperazínico* consiste em uma estrutura de seis átomos, contendo dois átomos de nitrogênio em posições opostas no anel e vem sendo bastante explorado como um protótipo promissor para a síntese de novos compostos anti-*Leishmania* (Mayence et al., 2004; Foroumadi et al., 2005; Nguewa et al., 2005; Huang et al., 2006; Gnoatto et al., 2008; Behrouzi-Fardmoghdam et al., 2008; Poorrajab et al., 2009). Além disso, a piperazina é a base de

muitos compostos anti-helmínticos, relatados desde a década de 50 (McGaughey, 1950; Dunn, 1955). Estudos realizados por nosso grupo demonstraram atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas e amastigotas do bloqueador de canal de cálcio lidoflazina, um derivado piperazínico (Reimão, 2011). Apesar das diferenças químicas entre a quetiapina e a hidroxizina, a presença do anel piperazínico pode ter sido um fator que contribuiu para a atividade anti-*Leishmania* observada em nossos estudos. Apesar de macrófagos expressarem receptores para os fármacos testados (receptores H1 de histamina) (Triggiani et al., 2007), os fármacos não eliminaram os amastigotas nos macrófagos, fator este que pode estar relacionado à maior resistência do parasita na forma amastigota devido às diferenças no metabolismo quando comparado à forma extracelular.

Anti-histamínicos antagonistas de receptores H1 são fármacos que se ligam seletivamente à receptores H1 de histamina, sem ativá-los, bloqueando assim, sua ação endógena. Têm ação nos brônquios, vasos capilares e alguns outros músculos lisos (Del Cuvillo et al., 2009). Nossos estudos, ainda que preliminares em relação ao número de fármacos testados demonstram pela primeira vez na literatura que fármacos com atividade anti-histamínica apresentam ação contra os promastigotas de *L. (L.) infantum*.

Apesar de não ter apresentado atividade contra formas amastigotas, a **loratadina** foi estudada em nosso trabalho como uma possível ferramenta para a descoberta de novos alvos terapêuticos na *Leishmania*. A **loratadina** é um fármaco da classe dos anti-histamínicos de nova geração, um antagonista de receptor H1 de histamina que não atua no sistema nervoso central nem cardiovascular (Papi et al., 2001). Nossos dados obtidos com o fluoróforo SYTOX[®] Green, demonstraram que a loratadina alterou rapidamente (20 minutos) a permeabilidade da membrana plasmática dos promastigotas, permitindo o influxo da sonda de forma contínua e tempo-dependente, sugerindo uma possível formação de poro na membrana. Com o objetivo de investigar esta possibilidade, parasitas tratados com loratadina foram analisados por microscopia eletrônica de

transmissão. Os dados da microscopia corroboram àqueles obtidos com SYTOX[®] Green, onde pudemos constatar a presença de vários poros na membrana plasmática após 1 hora de incubação, além de intensos danos ultraestruturais que levaram ao descolamento da bicamada da membrana plasmática e morte do parasita após até 6 horas de incubação. Os dados obtidos com o Mitotracker Red e H₂DCF-DA demonstraram que após 60 minutos de incubação, a loratadina induziu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, porém sem alterar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A rápida despolarização pode estar relacionada aos danos na homeostasia da célula, visto que a presença de poros poderia ter induzido um rápido extravazamento de íons. Além disso, devido à rápida morte celular, corroborada pelos severos danos ultraestruturais, não se verificou aumento na produção de ROS. Com isso, sugere-se que a loratadina deva ter afinidade pela membrana do parasita, perfurando a membrana e matando o parasita em curto período de tempo. Dados da literatura demonstram que a anfotericina B também induz a formação de poros na membrana de *Leishmania*, matando o parasita por extravazamento de íons (Ramos et al., 1996). Estes dados sugerem ainda que a loratadina pode ser utilizada como protótipo para o desenho de fármacos anti-*Leishmania*.

Dentre os fármacos ativos contra formas amastigotas, destaca-se pela primeira vez na literatura o **econazol**, com efetividade *in vitro* comparável à miltefosina e ao Glucantime em nosso modelo. O **econazol** é um medicamento antifúngico relacionado aos azóis como fluconazol, cetoconazol, itraconazol e clotrimazol, os quais atuam inibindo a enzima 14- α demetilase, inibindo a síntese da membrana plasmática e causando aumento da permeabilidade celular em células fúngicas (Gamberucci et al., 1998). Apesar do clotrimazol, bifonazol e econazol apresentarem o *anel imidazólico*, apenas o **econazol** foi capaz de eliminar as formas amastigotas no interior de macrófagos. O *anel imidazólico* é considerado um alcalóide, sendo uma estrutura composta por cinco átomos: três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio adjacentes (Walba, 1961). É também uma

estrutura presente na **histamina**, e suas similaridades permitem que anticorpos monoclonais possam se ligar a ambas estruturas (Morel et al., 1990). Considerando que os **imidazóis** (triazóis) são compostos ativos contra *Leishmania* (Berman, 2003; Rybniker et al., 2010), e sabendo-se da atividade anti-*Leishmania* da nitazoxanida que também apresenta o *anel imidazólico* (tiazol), estes dados fortalecem nossas sugestões anteriores sobre um possível “receptor de histamina-like” em *Leishmania*, que poderia ser explorado como alvo em futuros estudos farmacológicos. Nossos estudos sugerem ainda que tanto o econazol, como o clotrimazol e bifonazol podem ser estruturas protótipas que poderiam ser utilizadas para o desenho de novos fármacos anti-*Leishmania*.

Dentre os compostos menos ativos, destaca-se o **cloxazolam**, um derivado benzodiazepínico clorado que apresentou atividade somente para as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* em nossos ensaios. Apesar disso, compostos benzodiazepínicos vêm se destacando como protótipos para o desenho de novos agentes anti-*Leishmania*, demonstrando inclusive atividade contra formas amastigotas (Clark et al, 2007).

Considerando a *relação estrutura química-atividade biológica*, nota-se a presença marcante do átomo do **nitrogênio** em todos os fármacos testados neste trabalho, estando este sempre presente em anéis de cinco (nitazoxanida, econazol, clotrimazol, bifonazol), seis (hidroxizina, quetiapina e loratadina) ou sete (cloxazolam) átomos. Este dado sugere que a presença de **nitrogênio** nos anéis pode estar relacionada à atividade anti-*Leishmania* observada, visto que estes compostos mataram 100% dos promastigotas nas maiores concentrações testadas. Este fato pode ter relação com a necessidade de captação de heme pelo parasita, um composto orgânico altamente nitrogenado, conhecido como grupo prostético (co-fator de enzimas) que consiste em uma estrutura complexa constituída por Fe²⁺ no interior e ligada a quatro anéis pirrol (**derivados imidazólicos**) e contendo quatro átomos de **nitrogênio** (Rae e Goff, 1998). Dados da literatura demonstram que compostos sintéticos altamente nitrogenados vêm sendo estudados como protótipos de fármacos anti-*Leishmania*, explorando a

necessidade do grupo heme do parasita (Kelly et al., 2003). Uma abordagem racional na busca de novos antiparasitários é busca por diferenças bioquímicas entre o parasita e seu hospedeiro mamífero. Um exemplo específico, no caso de *Leishmania* refere-se à biossíntese do heme, um grupo prostético crítico para proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de elétrons. Como todos os Tripanosomatídeos, parasitas do gênero *Leishmania* requerem heme ou porfirinas pré-formados para a sobrevivência porque faltam várias enzimas chave na via biossintética do heme (Kelly et al., 2003). Com base em nossos estudos e em dados da literatura, os *compostos nitrogenados* na forma de *anéis imidazólicos* podem constituir protótipos para o desenho de novos fármacos, assim como para a escolha de fármacos a serem testados contra *Leishmania*, utilizando a estratégia de reposicionamento.

Levando em conta a necessidade de novos alvos bioquímicos em *Leishmania*, a pesquisa por fármacos que afetam o metabolismo mitocondrial poderia ser uma interessante estratégia para busca de novos compostos terapêuticos contra protozoários. Sabendo-se que a sobrevivência da *Leishmania* depende do adequado funcionamento da mitocôndria e, especialmente neste protozoário onde esta estrutura se apresenta como uma única organela, fármacos que afetam a mitocôndria poderiam explorar a capacidade reduzida de compensação de uma mitocôndria danificada. Considerando a efetividade da **nitazoxanida**, a sua ação letal foi investigada em *L. (L.) infantum*. Inicialmente os efeitos potenciais da nitazoxanida foram verificados na membrana plasmática do parasita. Utilizando-se a sonda fluorescente SYTOX[®] Green, foi possível verificar que a nitazoxanida não altera a permeabilidade da membrana plasmática, uma vez que houve penetração da sonda em tempos de incubação inferiores a 60 minutos. Porém, por meio do ensaio colorimétrico com metil-tetrazólio (MTT), foi possível observar a ausência de atividade de desidrogenases mitocondriais nos promastigota após 24 horas de incubação (dados não mostrados), sugerindo assim, um efeito leishmanicida do fármaco. A redução do

substrato MTT para a formazana insolúvel, tem sido considerado um marcador de viabilidade celular (Tada et al., 1986).

O estudo do **mecanismo de ação de fármacos** pode fornecer informações importantes sobre novos alvos bioquímicos. O potencial de membrana mitocondrial é essencial para manter a função fisiológica da cadeia respiratória gerando ATP e, na ausência de propriedades funcionais da mitocôndria, as células podem cessar a síntese de ATP levando à morte celular (Monteiro et al., 2003). Nossos dados demonstram que a **nitazoxanida** induziu uma despolarização significativa ($p < 0,05$) do potencial de membrana mitocondrial de *L. (L.) infatum*, reduzindo os níveis de fluorescência da sonda Mitotracker[®] Red para níveis não detectáveis. Considerando-se que uma perda significativa de potencial de membrana mitocondrial resulta em queda de energia e morte celular (Joshi e Bakowska, 2011), nossos dados sugerem que a nitazoxanida afeta mitocôndrias da *Leishmania*, contribuindo para a morte do parasita. Hoffman e colaboradores (2007) demonstraram que a nitazoxanida bloqueia a oxidação de piruvato, através da inibição da reação de transferência de elétrons dependente da enzima piruvato-ferredoxina oxireductase (PFOR) em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *H. pylori* e *Campylobacter jejuni*. Considerando que a oxidação do piruvato, durante a glicólise é essencial para gerar acetil-CoA e, por consequência a geração de ATP, poderíamos sugerir que a nitazoxanida afeta a produção de energia na *Leishmania*, porém, futuros ensaios devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

O potencial de membrana mitocondrial revela a transferência de de íons hidrogênio pela membrana interna durante o processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Sob condições fisiológicas, a fosforilação oxidativa libera entre 3 a 5% de espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre o total de oxigênio consumido (Boonstra e Post, 2004). Os nossos dados mostraram que nitazoxanida induziu um rápido aumento da regulação de ROS em *Leishmania*, resultando em uma fluorescência 36 vezes mais elevada do que o controle positivo com oligomicina. Tem sido verificado que

os fármacos que inibem a fosforilação oxidativa aumentam rapidamente a produção de ROS (Mattiuzzi et al., 2004). As ROS são importantes moléculas sinalizadoras, e sua acumulação em condições patológicas leva ao estresse oxidativo. Além disso, tem-se considerado que uma das causas da geração de ROS mitocondrial é uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial (Mehta e Shaha, 2004). Com base nos nossos estudos ultra-estruturais, a nitazoxanida induziu um forte dano mitocondrial, caracterizado por inchaço da mitocôndria. Este fato foi verificado no mesmo momento em que se observou a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e o aumento de ROS no parasita. Em vista do intenso inchaço mitocondrial induzido pela nitazoxanida na *Leishmania* (estudos ultra-estruturais), a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e ao aumento na produção de ROS, sugerimos que a ação letal deste fármaco em *Leishmania* esteja relacionada ao estresse oxidativo, contribuindo para a morte celular. Além disso, nossos dados sugerem que a mitocôndria da *Leishmania* possa ser alvo potencial do fármaco nitazoxanida, porém, ensaios futuros devem ainda confirmar esta hipótese.

Na busca por marcadores de apoptose, observou-se por citometria de fluxo que promastigotas de *Leishmania* tratados com **nitazoxanida** apresentaram um aumento na exteriorização de fosfatidilserina na membrana plasmática. Esta detecção mostrou-se tempo-dependente e pôde ser realizada por meio da ligação de anexina V marcada com fluoresceína, por se tratar de uma proteína com alta afinidade pela fosfatidilserina (Weingärtner et al., 2012). A externalização de fosfatidilserina pôde ser detectada logo após 12 horas de tratamento, culminando em mais de 97% de células marcadas com anexina V após 24 horas. A marcação simultânea de iodeto de propídio sugere a presença de células em estágio final de apoptose (Rieger et al., 2011). Estes dados demonstram que a nitazoxanida induz a permeabilização da membrana plasmática apenas após períodos longos de incubação (>12h), permitindo a entrada e ligação do fluoróforo ao DNA. O fármaco miltefosina foi utilizado como controle positivo do ensaio, visando a externalização de fosfatidilserina e após 24 horas de

incubação, observou-se que 99,4% das células estavam marcadas simultaneamente para anexina V e iodeto de propídio, corroborando os dados da literatura (Marinho et al., 2011; Khademvatan et al., 2011). A marcação de promastigotas por ambos fluoróforos (6,58%) também foi confirmada no grupo controle (não tratado), demonstrando que promastigotas provenientes de uma cultura em fase estacionária de crescimento expõe fosfatidilserina em sua superfície. Estes dados corroboram os dados descritos por Lee e colaboradores (2002), os quais demonstraram que promastigotas de *Leishmania* em fase estacionária apresentam um aumento da exposição de fosfatidilserina, resultando em uma morte celular programada (*apoptosis-like*).

A morte celular programada tem sido descrita em protistas unicelulares, incluindo *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Jiménez-Ruiz et al., 2010). Além disso, este processo em protistas partilha algumas características morfológicas com a apoptose de organismos multicelulares, incluindo condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear, encolhimento da célula, perda de potencial de membrana mitocondrial, formação de corpos apoptóticos e a externalização de fosfatidilserina (Kaczanowski et al, 2011). Além disso, mitocôndrias são o principal alvo de lesões após estresse celular, levando à morte celular programada e necrose. Estes eventos são ainda acompanhados pela perda do potencial de membrana mitocondrial, sendo este considerado um evento pré-apoptótico (Jiménez-Ruiz et al., 2010). Em nossas análises foi possível observar que a **nitazoxanida** induziu em *Leishmania*: i) despolarização do potencial de membrana mitocondrial; ii) aumento da produção de ROS; iii) aumento da exposição de fosfatidilserina; iv) inchaço da mitocôndria; v) condensação da cromatina; vi), formação de vesículas na membrana plasmática, vii) formação de vacúolos e, viii) picnoses. Desta forma, ainda que não possamos confirmar a morte celular programada, nossos dados demonstram a presença de marcadores deste processo em *Leishmania* tratada com nitazoxanida. Porém, estudos adicionais deverão ser realizados para confirmar esta observação.

A manipulação das vias de morte celular em *Leishmania* pode oferecer um novo caminho para o controle da doença. Considerando que a mitocôndria em *Leishmania* é uma organela única, e quando comparada às numerosas mitocôndrias presentes em células de mamíferos, constata-se que seu funcionamento apropriado é vital para o parasita (Kaczanowski, 2011). Desta forma, poderíamos sugerir que compostos que têm como alvo esta organela, seriam bastante úteis para o desenho de fármacos mais seletivos.

A nitazoxanida compartilha algumas semelhanças estruturais com o pirofosfato de tiamina (TPP) e exibe um espectro de atividade semelhante ao metronidazol e compostos nitrofuranos (Pankuch e Appelbaum, 2006). Apesar do largo espectro e ampla gama de atividade antiparasitária, pouco se sabe sobre o(s) mecanismo(s) de ação(ões) da nitazoxanida (Hoffman et al., 2007). Sabe-se que este fármaco não produz danos no DNA de *H. pylori* e não existe resistência cruzada com metronidazol, já que cepas metronidazol-resistentes de *T. vaginalis* e *H. pylori* permanecem vulneráveis à nitazoxanida. Além disso, resistência à nitazoxanida não foi observada clinicamente ou gerada por métodos *in vitro* geralmente usados para isolar mutantes de *H. pylori* (Hoffman et al., 2007).

No estudo realizado por Zhang e colaboradores (2010), a atividade anti-*Leishmania in vitro* da nitazoxanida foi avaliada pela incubação com promastigotas de *L. (L.) donovani*, indicando que este composto pode afetar a ultraestrutura do parasita e eficazmente inibir seu crescimento. A eficácia terapêutica de nitazoxanida foi verificada em camundongos infectados com *L. (L.) donovani* onde se observou uma redução significativa da carga parasitária no baço e no fígado nos animais tratados por via oral. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram os achados anteriores a respeito da atividade anti-*Leishmania* (Chan-Bacab et al. 2009; Navarrete-Vazquez et al., 2011) e confirmam que a nitazoxanida é um promissor candidato a medicamento para LV.

Diante do exposto, avaliou-se o efeito da associação de nitazoxanida e os fármacos padrões em amastigotas intracelulares de *L. (L.)*

infantum. A **associação de fármacos** traz benefícios relevantes na terapêutica de diversas doenças e possui muitas vantagens diante da monoterapia (Speich et al., 2012). Especialmente para o tratamento da LV, a terapia combinada tem sido preconizada visando aumentar a eficácia e a tolerância do tratamento, reduzir sua duração e seus custos e limitar o aparecimento de resistência (van Griensven e al., 2010).

A eficácia da associação de nitazoxanida com azitromicina e rifabutina em culturas de *C. parvum* foi comparada com a eficácia de cada fármaco administrado separadamente. Os resultados indicaram que a associação foi mais eficaz contra o protozoário, sugerindo um efeito aditivo entre os fármacos (Giacometti et al., 2000). Devido à resistência aos regimes de tratamento e às taxas de cura insatisfatórias, o estudo realizado por Basu e colaboradores (2011) avaliou a associação de quatro fármacos (nitazoxanida, levofloxacina, omeprazol e doxiciclina) no tratamento de *H. pylori*. Este estudo demonstrou que o regime de associação com nitazoxanida foi altamente efetivo e sugeriu um estudo em maior escala para confirmar a eficácia deste regime.

Para entendermos a natureza da interação entre nitazoxanida e os fármacos em estudo, é necessária a compreensão do mecanismo de ação de cada fármaco isolado. No entanto, o mecanismo de ação da maioria dos compostos testados permanece desconhecido. Diante disso, buscou-se no presente estudo a investigação dos possíveis mecanismos de ação, com especial ênfase na nitazoxanida, a qual foi eleita para os ensaios de associação. Tal escolha baseou-se no fato de que este composto apresenta segurança clínica bem estabelecida, eficácia clínica contra outras doenças parasitárias (Keeffe, 2009) e relatos de atividade *in vivo* contra *L. (L.) donovani* (Zhang et al., 2010).

Na literatura podem-se encontrar alguns indícios sobre o mecanismo de ação dos fármacos padrões testados. Foi descrito que a anfotericina B leva à formação de poros na membrana plasmática, devido à ligação ao ergosterol. Este efeito induz à perda de íons e dano oxidativo, com consequente morte celular (Mesa-Arango et al., 2012). O antimônio

pentavalente interfere no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a depleção dos níveis de ATP (Rath et al., 2003). A miltefosina atua na modulação de receptores de superfície celular, interferindo no metabolismo de inositol e fosfolipase, transdução de sinal e homeostase de Ca^{2+} , resultando em apoptose (Croft e Coombs, 2003; Mishra et al., 2007; Pandey et al., 2009). O mecanismo de ação da sitamaquina, por sua vez, envolve a inibição do complexo II da cadeia respiratória, que aciona o *stress* oxidativo e induz apoptose em *Leishmania* (Carvalho et al., 2011). Nós presumimos que o efeito aditivo observado entre nitazoxanida e anfotericina B, Glucantime[®], miltefosina e sitamaquina pode ser uma consequência do efeito inibitório acumulativo em vias metabólicas diferentes e essenciais do parasita.

O uso da politerapia pressupõe que dois fármacos com diferentes mecanismos de ação podem proporcionar melhor resposta do que quando apresentam mecanismos semelhantes. A associação entre metformina e glimepirida, por exemplo, usada no tratamento de diabetes do tipo 2, tem mostrado resultados promissores devido à diferença e complementaridade entre os mecanismos de ação destes fármacos (Zhao et al., 2011).

Em um paciente sob monoterapia, quando um segundo medicamento é adicionado, existem três possibilidades: os efeitos clínicos podem ser simplesmente a soma do efeito de cada fármaco isoladamente (aditivo), o efeito da adição do segundo fármaco pode ultrapassar o efeito individual de cada fármaco isoladamente (sinérgico), ou o efeito dos dois fármacos em conjunto pode ser menor do que o efeito de cada fármaco isoladamente (antagônicos). Da mesma forma, os efeitos adversos ou toxicidade da associação podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos. No que diz respeito à eficácia clínica, sinergia (ou, pelo menos, aditividade) é desejável, enquanto que do ponto de vista dos efeitos adversos, o antagonismo é preferível. Finalmente, em longo prazo, a farmacodinâmica dos compostos, assim como a influência de fatores relacionados à farmacogenômica também devem ser considerados (Stafstrom, 2010).

O objetivo da terapia da leishmaniose é alcançar a meta ambiciosa de “eliminar o parasita” ou pelo menos reduzir a carga parasitária. Para fins práticos, seria aceitável utilizar uma combinação de fármacos que exiba efeitos intermediários, tais como dois fármacos que são aditivos no que diz respeito ao seu efeito clínico, mas que exiba antagonismo de seus efeitos colaterais, ou que os dois fármacos sejam sinérgicos clinicamente, mas seus efeitos colaterais sejam apenas aditivos.

Nós observamos que as associações testadas foram capazes de inibir o crescimento de amastigotas de *L. (L.) infantum* em concentrações que não foram tóxicas aos macrófagos. Com base nos resultados obtidos, acreditamos que a associação de nitazoxanida e os fármacos usados na terapia da leishmaniose poderiam colaborar para o encontro de novas alternativas para o tratamento da LV. Além disso, seria útil explorar o efeito de associações de nitazoxanida com outros fármacos com atividade anti-*Leishmania*, como por exemplo, a paromomicina e os compostos azólicos.

Nossos resultados indicaram que todas as interações foram indiferentes ou aditivas de acordo com a classificação proposta por Odds (2003). Segundo este autor, a experimentação em interações medicamentosas pode levar a conclusões opostas por diferentes metodologias, conforme também relatado por Lewis e colaboradores (2002). Assim como todos os métodos disponíveis para o estudo de interações *in vitro*, os valores de CIF também são passíveis a erros devido à reprodutibilidade. Por esta razão, a análise destes dados requer certo cuidado. Se considerarmos “sinérgica” ou “antagônica” uma associação cujo CIF é menor ou maior que “1”, respectivamente, então os valores de CIF que forem ligeiramente acima ou abaixo do corte teórico de “1” parecem colocar um ponto positivo na constatação de que, dentro dos limites de erro experimental, estes valores poderiam indicar apenas “não interação” entre os agentes. Portanto, adotou-se uma classificação mais conservadora para os valores de CIF, onde se restringe a interpretações de “sinergia” (CIF ≤ 0,5), “antagonismo” (CIF > 4,0) e “interação indiferente” (CIF > 0,5 - 4,0). Desta forma, os resultados e as interpretações da CIF são mais facilmente

reprodutíveis, pois se encontram dentro de uma faixa que assegura que erros experimentais não conduzam a falsas conclusões.

Conforme discutido por Seifert e colaboradores (2011), os ensaios *in vitro* são capazes de medir a atividade antiparasitária direta das associações, mas ignoram fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos e, portanto, nem sempre são preditivos de interações *in vivo*. Além disso, não é possível avaliar os possíveis efeitos adversos da terapia associada. Neste contexto, por exemplo, a associação de nitazoxanida e pentamidina não parece clinicamente viável devido à toxicidade da pentamidina, que limita seu uso clínico mesmo como monoterapia (Seifert et al., 2011). Contudo, o conhecimento da natureza das interações de fármacos pode fornecer pistas para auxiliar a descoberta de novas terapias, justificando os estudos *in vitro*, com vistas à identificação de interações sinérgicas em nível celular. Com base nos dados obtidos das associações no presente trabalho, o próximo passo seria a avaliação das interações *in vivo*. Nossos resultados indicam que tais associações são promissoras e poderiam ser avaliadas em modelos animais, já que não se observou antagonismo em nenhum dos pares de fármacos estudados.

6. Conclusões

Com base nos dados apresentados neste trabalho, concluiu-se que:

- 1- Os fármacos estudados apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e somente nitazoxanida e econazol apresentaram atividade em amastigotas intracelulares.
- 2- A ação letal da loratadina em *Leishmania* envolve a alteração da permeabilidade da membrana plasmática, levando a formação de poros e consequente morte celular.
- 3- A ação letal da nitazoxanida em *Leishmania* sugere que o fármaco tenha como alvo a mitocôndria, considerando a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em estresse oxidativo e morte celular. Além disso, a presença de marcadores específicos sugere que o fármaco possa induzir a morte celular programada (*apoptosis-like*).
- 4- Os estudos por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com nitazoxanida e loratadina demonstram significativas alterações ultraestruturais e corroboraram os resultados obtidos nos ensaios fluorimétricos.
- 5- As associações entre nitazoxanida e os fármacos padrões apresentaram interação indiferente/aditiva, indicando que estas associações poderiam ser avaliadas em modelos animais, já que não se observou antagonismo em nenhum dos pares de fármacos estudados.
- 6- Os valores de Σ CIF obtidos a partir da associação de nitazoxanida e anfotericina B na proporção 1:4 (v/v), assim como de nitazoxanida e Glucantime[®] na proporção 2:3 (v/v) foram próximos do valor considerado como sinergismo.

7. Referências Bibliográficas

Aa E, Helland A, Spigset O. Quetiapine and the potential for abuse. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2012; 7: 1619-20.

Alberts B, Bray D, Johnson A. Fundamentos da biologia celular: uma introdução a biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes médicas sul; 1999.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *Plos One* 2012; 7:e35671.

Alves, WA. Leishmaniose visceral Americana: situação atual no Brasil. *Bepa* 2009; 6:25-29.

Amaral PA, Neves G, Farias F, Eifler-Lima VL. Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 39:4.

Andrade AC, Leite ICG, Vieira MT, Coimbra ES, Tibiriçá SHC, Rodrigues V O. Ensaio clínico randomizado controlado duplo-cego da nitazoxanida no tratamento do poliparasitismo intestinal. *Cad Saúde Colet* 2011; 19: 139-46.

Basu PP, Rayapudi K, Pacana T, Shah NJ, Krishnaswamy N, Flynn M. A randomized study comparing levofloxacin, omeprazole, nitazoxanide, and doxycycline versus triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2011;11:1970-5.

Behrouzi-Fardmoghdam M, Poorrajab F, Ardestani SK, Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuranyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. *Bioorg Med Chem* 2008; 8:4509-15.

Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 5:397-401.

Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 4;337:1-13.

Carvalho L, Luque-Ortega JR, López-Martín C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; 9: 4204-4210.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Global Health. Division of Parasitic Disease and Malaria. Parasites – Leishmaniasis. [acesso em 30 de julho de 2012]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Chan-Bacab MJ, Hernández-Núñez E, Navarrete-Vázquez G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide;NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 6:1292-3.

Clark RL, Carter KC, Mullen AB, Coxon GD, Owusu-Dapaah G, McFarlane E et al. Identification of the benzodiazepines as a new class of antileishmanial agent. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 3:624-7.

Cota GF, Gomes LI, Pinto BF, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM, Pedrosa MS et al. Dyarrheal syndrome in a patient co-infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni*. *Case Report Med* 2012; 2012:240512.

Coura JR. Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

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

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. FEBS Lett 2000; 476:118-23.

Del Cuvillo A, Sastre J, Montoro J, Jáuregui I, Dávila I, Ferrer M et al. Allergic conjunctivitis and H1 antihistamines. J Investig Allergol Clin Immunol 2009; 1:11-8.

De Oliveira MP, Lima MC, Calheiros AS, Martins MA, Antas PR, De Luca PM et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. Exp Parasitol 2005; 2:72-9.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. Trends Cell Biol 2000; 10:369-77.

Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. Antimicrob Chemother 2012; 11:2576-97.

Dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha IC, da Silva TA, Oliveira E, Morais MH et al. Low parasite load estimated by qpcr in a Cohort of children living in urban area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2012; 12:e1955.

DrugBank. [acesso em 10 de agosto de 2012]. Disponível em <http://www.drugbank.ca/>.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative. Visceral Leishmaniasis: estratégia da DNDi para na America Latina. [acesso em 08 de agosto de 2012]. Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmaniose-visceral/estrategia-da-dndi.html>.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative. Visceral Leishmaniasis: Tratamentos atuais. [acesso em 07 de agosto de 2012].

Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmaniose-visceral/tratamentos-atuais.html>.

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.

Dunn TL. Effect of piperazine derivatives on certain intestinal helminths. *Lancet* 1955; 6864:592-3.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today* 2011;7-8:298-310.

Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* 2011; 11:2758-70.

Fivelman QL, Adagu SI, 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*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 11: 4097–4102.

Foroumadi A, Emami S, Pournourmohammadi S, Kharazmi A, Shafiee A. Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activity of 2-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2005; 12:1346-50.

Frézard F, Demichelli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 2009; 14:2317-2336.

Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 2004; 9:77-82.

Gamberucci A, Fulceri R, Benedetti A, Bygrave FL. On the mechanism of action of econazole, the capacitative calcium inflow blocker. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 1:75-7.

Gannavaram S, Debrabant A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:95.

Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Ancarani F, Scalise G. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J Antimicrob Chemother* 2000; 4:453-6.

Gnoatto SC, Dalla Vecchia L, Lencina CL, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Mossalayi D et al. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008; 5:604-10.

Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N et al. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 3:868-76.

Huang TL, Vanden Eynde JJ, Mayence A, Donkor IO, Khan SI, Tekwani BL. Anti-plasmodial and anti-leishmanial activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J Pharm Pharmacol* 2006; 8:1033-42.

Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Lüder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010; 3:104.

Joshi DC, Bakowska JC. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *J Vis Exp* 2011; 23:51.

Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2011; 25:4:44.

Keeffe EB. Advances in Hepatology: Current Research on nitazoxanide in the treatment of chronic hepatitis c. *Gastroenterol Hepatol* 2009; 5: 620-622.

Kelly JX, Ignatushchenko MV, Bouwer HG, Peyton DH, Hinrichs DJ, Winter RW et al. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 1:43-9.

Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L. tropica* strains. *Korean J Parasitol* 2011; 1:17-23.

Kimura N, Fujii T, Miyajima T, Kumada T, Mikuni T, Ito M. Initial and long-term effects of cloxazolam with intractable epilepsy. *Pediatr Neurol* 2010; 43:403-6.

Koefeler HC, Fauler G, Windischhofer W, Leis HJ. Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoïd formation. *British Journal of Pharmacology* 2000; 130:1241-1246.

Korolkovas A. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W; MCGwire B S. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:15496-15504.

Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ* 2002; 1:53-64.

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1065-89.

Letari O, Miozzo A, Folco G, Belloni PA, Sala A, Rovati GE et al. Effects of loratadine on cytosolic Ca²⁺ levels and leukotriene release: novel

mechanisms of action independent of the anti-histamine activity. *Eur J Pharmacol* 1994; 3:219-27.

Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2002; 2:345-51.

Lindoso JA, Cotrim PC, Goto H. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2004; 3:1-4.

Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256:19-26.

Loiseau PM, Cojean S, Schrével J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite* 2011; 2:115-9.

LHSC, London Health Sciences Centre. All about mitochondria. [acesso em 11 de agosto de 2012]. Disponível em http://www.lhsc.on.ca/Patients_Families_Visitors/Genetics/Inherited_Metabolic/Mitochondria/AllAboutMitochondria.htm.

López-Martín C, Pérez-Victoria JM, Carvalho L, Castanys S, Gamarro F. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52: 4030-4036.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths. *Hepatology* 2006; 43:31-44.

Marieb, E. Human anatomy & physiology. San Francisco: Benjamin Cummings. 2001; pp.414.

Marinho FA, Gonçalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM et al. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 4:507-9.

Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M et al. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. Hum Mol Genet 2004; 13:869-879

Maurício I. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 1999; 119: 237-246.

Maurício I. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology Today 2000; 16:188-189.

Mayence A, Vanden Eynde JJ, LeCour L Jr, Walker LA, Tekwani BL, Huang TL. Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents. Eur J Med Chem 2004; 6:547-53.

McGAUGHEY CA. Preliminary note on the treatment of spirocercosis in dogs with a piperazine compound, caricide (Lederle). Vet Rec 1950; 51:814-5.

Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. J Biol Chem 2004; 12:11798-813.

Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. Front Microbiol 2012; 3:286.

Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. Parasitol Int 2000; 3:265-9.

MS Ministério da Saúde. Nota Técnica Nº 110/2012/CONJUR-MS/CODAJUD/NÚCLEO TÉCNICO. [acesso em 10 de agosto de 2012].

Disponível em
<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Jul/04/Cloxazolam.pdf>.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmanioses. [acesso em 26 de julho de 2012]. Disponível em http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1258562831/6365_crmv-pr_manual-zoonoses_leishmanioses.pdf.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Epidemiológica. Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília; 2011.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a Coinfecção de *Leishmania*- HIV. Brasília; 2011.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília; 2006.

MS. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Situação Epidemiológica. Leishmaniose Visceral. Letalidade. [Acesso em 30 de novembro de 2012]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_letalidade_por_lv_entr_e_1990_e_2011.pdf.

MS. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Situação Epidemiológica. Leishmaniose Visceral. Óbitos. [Acesso em 30 de novembro de 2012]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_obitos_por_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.

MSF, Médicos sem fronteira. Leishmanioses. [acesso em 10 de agosto de 2012]. Disponível em <http://www.msf.org.br/conteudo/31/leishmaniose/>.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007; 14:1153-69.

Monteiro P, Oliveira PJ, Gonçalves L, Providencia LA. Mitocôndrias: que papel na isquemia, reperfusão e morte celular. *Rev Port Cardiol* 2003; 22: 233-254.

Morel A, Darmon M, Delaage M. Recognition of imidazole and histamine derivatives by monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 1990; 10:995-1000.

Navarrete-Vazquez G, Chaves-Silva F, Argotte-Ramos R, Rodriguez-Gutierrez MC, Chan-Bacab M J, Cedillo-Rivera R et al. Synthesis of benzologues of nitazoxanide and tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 10:3168–3171.

Neves DN. *Parasitologia Humana*. 11ªed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Nguewa PA, Fuertes MA, Iborra S, Najajreh Y, Gibson D, Martínez E et al. Water soluble cationic trans-platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem* 2005; 3:727-36.

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

Olliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 595-602.

Oprea TI, Mestres J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *AAPS J* 2012; 4:759-63.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis. [acesso em 26 de julho de 2012]. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552-65.

Pandey K, Sinha PK, Das VR, Bimal S, Singh SK, Das P. Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis—current scenario. *Clinical Medicine: Pathology* 2009; 2:1–4.

Pankuch GA, Appelbaum PC. Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1112–1117.

Papi A, Papadopoulos NG, Stanciu LA, Degitz K, Holgate ST, Johnston SL. Effect of desloratadine and loratadine on rhinovirus-induced intercellular adhesion molecule 1 upregulation and promoter activation in respiratory epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 2:221-8.

Parone P A, James D, Martinou J C. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 2002; 84:105-11.

Pedersen PL. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 4:291-304.

Poorrajab F, Ardestani SK, Emami S, Behrouzi-Fardmoghdam M, Shafiee A, Foroumadi A. Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: synthesis and in vitro biological evaluation. *Eur J Med Chem* 2009; 4:1758-62.

PubChem Compound. [acesso em 10 de agosto de 2012]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>.

Rae T, Goff H. The heme prosthetic group of lactoperoxidase. Structural characteristics of heme I and heme I-peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 43:27968–27977.

Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol* 1996; 1:65-75.

Rang, H P, Dale M M, Ritter J M. *Farmacologia*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC et al. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quim Nova* 2003; 26:550-555.

Reimão JQ. 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]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.

Reimão JQ, Tempone AG. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:1032-8.

Rey L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp* 2011; 24:50.

Rybniker J, Goede V, Mertens J, Ortmann M, Kulas W, Kochanek M et al. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral

fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure--a case report and brief review of the literature. *Int J Infect Dis* 2010; 6:522-5.

Saha P, Sen R, Hariharan C, Kumar D, Das P, Chatterjee M. Berberine chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Free Radic Res* 2009; 11:1101-10.

Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL. In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 4:850-4.

Sen R, Saha P, Sarkar A, Ganguly S, Chatterjee M. Iron enhances generation of free radicals by artemisinin causing a caspase-independent, apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Free Radic Res* 2010; 11:1289-95.

Shi Y, Sheng R, Zhong T, Xu Y, Chen X, Yang D et al. Identification and characterization of zel-h16 as a novel agonist of the histamine h(3) receptor. *PLoS One* 2012; 7: e42185.

Speich B, Ame SM, Ali SM, Alles R, Hattendorf J, Utzinger J et al. Efficacy and safety of nitazoxanide, albendazole, and nitazoxanide-albendazole against *Trichuris trichiura* infection: a randomized controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1685.

Stafstrom CE. Mechanisms of action of antiepileptic drugs: the search for synergy. *Curr Opin Neurol* 2010; 2:157-63.

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

Sundar S, Rosenkaimer F, Lesser ML, Murray HW. Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1995; 4:992-6.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986; 2:157-65.

Tallarida R J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 319: 1-7.

Tempone A G, Oliveira C M, Berlinck R G S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med* 2011; 77: 572-85.

Tempone A G, Silva A C, Brandt C A, Martinez F S, Borborema S E, Silveira M A et al. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1076-1080.

Triggiani M, Petraroli A, Loffredo S, Frattini A, Granata F, Morabito P et al. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 2:472-81.

Van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2010; 3:184-94.

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

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

Walba H, Isensee, R. W. Acidity constants of some arylimidazoles and their cations. *J Org Chem* 1961; 26:2789-2791.

Weingärtner A, Kemmer G, Müller FD, Zampieri RA, Gonzaga dos Santos M, Schiller J et al. *Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. PLoS One 2012; 8:e42070.

Werneck G L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad Saúde Pública 2010; 26:644-645.

Wiwanitkit V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). Ther Clin Risk Manag 2012; 8:323-328.

Zhang R, Shang L, Jin H, Ma C, Wu Y, Liu Q et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial efficacy of nitazoxanide against *Leishmania donovani*. Parasitol Res 2010; 107:475–479.

Zhao XM, Iskar M, Zeller G, Kuhn M, van Noort V, Bork P. Prediction of drug combinations by integrating molecular and pharmacological data. PLoS Comput Biol 2011; 12:e1002323.

8. Anexos



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



Projeto nº 0085D-2010 (Protocolo 176797/2010)

Estudo do mecanismo de ação de fármacos sintéticos e suas combinações terapêuticas em *Leishmania (L.) chagasi*

Coordenação: André Gustavo Tempone Cardoso

Senhor Coordenador,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 27 de Setembro de 2011

1ª via: CTC/IAL
2ª via: Coordenador



São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 05/2011

Prezada Senhora,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa "**Estudo do Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e suas combinações terapêuticas em *Leishmania (L.) chagasi***", sob coordenação do Pesquisador Científico André Gustavo Temponi Cardoso, foi considerado **APROVADO SEM RESTRIÇÕES**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O projeto supracitado apresenta justificativa para a utilização de animais pautada em metodologia que contribuirá para a formação em pós-graduação, assim como prevê resultados que poderão ser de grande importância à Saúde Pública, apresentando, ainda, análise estatística adequada para o cálculo da quantidade de modelos utilizados.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e para que esta Comissão remeta as informações pertinentes ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,



Adriano Abbud
Coordenador
CEUA-IAL/Pasteur

Ilma. Sra.
Dra. Adriana Bugno
Presidente do Conselho Técnico Científico
Instituto Adolfo Lutz

C/C
Dr. André Gustavo Temponi Cardoso
Pesquisador Científico
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
10º Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3065-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br