

Juliana Tonini Mesquita

Terapias alternativas e combinadas para o tratamento da
Leishmaniose Cutânea Americana: uma abordagem
experimental *in vitro* e *in vivo*

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

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Quero Reimão.

SÃO PAULO

2018

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

Terapias alternativas e combinadas para o tratamento da Leishmaniose Cutânea Americana: uma abordagem experimental *in vitro* e *in vivo*/Juliana Tonini Mesquita. – 2018.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

Co-orientação: Profa Dra. Juliana Quero Reimão.

1. Leishmaniose cutânea/terapia. 2. Reposicionamento de medicamentos/métodos. 3. Terapia combinada/ métodos. 4. Leishmania/parasitologia. 5. Camundongos/lesões.

SES/CCD/CD-366/2018

“O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculos”.

(Lao Tsé).

Dedico este trabalho aos meus queridos pais e irmão, por acreditarem em meus sonhos e aos milhões de pacientes com leishmaniose pelo mundo.

AGRADECIMENTOS

Tão desafiador quanto desenvolver uma tese, é lembrar-se de todas as pessoas que fizeram parte dela.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por permitir desenvolver este trabalho ao longo desses anos.

Gostaria de agradecer especialmente aos meus queridos pais Bernardete e Armando por acreditarem e incentivarem meus sonhos, sempre com imenso amor, amizade, dedicação, conselhos, confiança, apoio, paciência, carinho e compreensão ao longo desses 29 anos.

Ao meu querido irmão Rafael, agradeço pela inspiração, oportunidade, confiança, paciência, apoio e incentivo no início de tudo.

Agradeço aos meus queridos familiares, que de forma direta ou indireta contribuíram para esse trabalho, em especial: Alice, Ângela, Célia, Dirce, Fernando, José, Juliana, Mariana, Pedro, Renata e Ricardo.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu querido orientador professor doutor André Gustavo Tempone Cardoso. É difícil resumir em poucas palavras, oito anos de convivência, mas só tenho a agradecer pela oportunidade, confiança, apoio, amizade, aprendizado, troca de experiência, momentos de descontração, “puxões de orelha”, carinho e compreensão nos diversos obstáculos encontrados ao longo desse trabalho. Confesso que evolui profissionalmente e me tornei mais crítica ao longo desses anos. Muito obrigada!

Agradeço também à minha querida co-orientadora professora doutora Juliana Quero Reimão pela dedicação, amizade, paciência, compreensão, atenção, por compartilhar seus conhecimentos e experiências, principalmente com leishmaniose cutânea e pela disposição mesmo durante as gestações e posterior distância, muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo agradeço pela oportunidade concedida e ao Instituto Adolfo Lutz sou grata pela infraestrutura fornecida.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agradeço pela bolsa de doutorado concedida.

Gostaria de agradecer à professora doutora Silvia Reni Bortolin Uliana (USP-SP) pela oferta de seu laboratório para desenvolver parte do doutorado, além do fornecimento de materiais, conhecimento e cepas utilizadas nesse trabalho. Agradeço imensamente pela oportunidade, confiança, compreensão e aprendizado adquiridos em seu laboratório.

Gostaria de agradecer também o pessoal do laboratório da professora Silvia (USP), em especial a Cris, o Adriano, a Carol e a Jê pelo apoio, paciência, aprendizado, companheirismo, chocolates e momentos de descontração no período que passei por lá.

Gostaria de agradecer também ao professor doutor Humberto Gomes Ferraz (USP-SP), seus alunos e funcionários, pelos fármacos e pelas formulações tópicas fornecidas para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora doutora Noemi Nosomi Taniwaki agradeço pela Microscopia Eletrônica de Transmissão e à mestre Juliana Mariotti Guerra sou grata pela análise histopatológica.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, sou grata pelo convívio.

Agradeço à professora doutora Vera Chioccola e doutora Cristina Meira pelo uso de equipamentos. Sou grata também ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular Cida, Jeferson, Lilian, Luís, Margarete, Marta, Ricardo e Valéria.

Agradeço aos técnicos de laboratório Vicente e em especial a Matília pela assistência e ajuda laboratorial prestada, além do companheirismo e amizade ao longo desta jornada, principalmente nos finais de semana e idas ao bioimageamento.

Às minhas colegas de laboratório Aline, Daniela, Érika, Lígia, Maiara Amaral, Mariana, Marta, Melissa, Samanta, Tatiana, Thaís e Viviane, agradeço pelos momentos de descontração, companheirismo, convivência, troca de conhecimento e ajuda durante esse trabalho.

Em especial, agradeço às colegas Daiane e Maiara Romaneli, que me ajudaram incansavelmente nos experimentos *in vivo*, principalmente nos finais de semana, feriados e idas ao bioimageamento. Só tenho a agradecer pela ajuda, paciência, compreensão, companheirismo, convivência, troca de experiência, momentos de descontração e amizade ao longo deste trabalho.

Às funcionárias do biotério de experimentação Cleide e Fátima, muito obrigada.

Em especial, gostaria de agradecer às “ratinhas” utilizadas neste trabalho, que sempre foram tão colaborativas durante longos períodos de tratamento. Obrigada!

Enfim, sou grata a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte dessa tese.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical causada por protozoários do gênero *Leishmania* que afeta 12 milhões de pessoas em 98 países. Seu tratamento conta com um restrito arsenal terapêutico e exige a administração de fármacos tóxicos por longos períodos. Na busca por novas terapias, o reposicionamento de fármacos e a associação terapêutica têm sido aplicados com sucesso para doenças negligenciadas. O presente estudo teve como objetivo a avaliação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* do potencial anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* dos fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan, bem como o estudo de associações terapêuticas *in vitro* e/ou *ex vivo* e mecanismo de ação *in vitro* dos fármacos amitriptilina e triclosan. Os resultados demonstraram que todos os fármacos estudados apresentaram atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, com valores de Concentração Efetiva 50% que variam de 1,50 a 51,48 μM . Os resultados obtidos a partir das associações entre os fármacos estudados e fármacos padrões foram classificados como aditivos ou indiferentes. Por meio da investigação do mecanismo de ação leishmanicida, foi possível concluir que a mitocôndria é uma organela alvo do fármaco amitriptilina, enquanto que o fármaco triclosan induz danos à membrana plasmática parasitária. Quando tratados com econazol por via oral (10 mg/kg/dia por 28 dias consecutivos) ou triclosan por via tópica (creme 1% por 14 dias consecutivos), houve uma redução de 75 a 89% da carga parasitária dos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os resultados obtidos contribuem para a investigação de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose cutânea e sugerem que novos estudos utilizando associação ou coadministração desses fármacos com fármacos padrões podem ser promissores em modelos animais.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea, reposicionamento de medicamentos, terapia combinada, *Leishmania*, camundongos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* that affects 12 million people in 98 countries. There is a limited therapeutic arsenal and the treatment requires the administration of toxic drugs for long periods. In the search for new therapies, the drug repositioning and therapeutic association have been successfully applied to neglected diseases. The aim of the present study was to evaluate *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* potential of the drugs amitriptyline, econazole, sertraline and triclosan, as well as the study of *in vitro* and / or *ex vivo* therapeutic associations and mechanism of action of the drugs amitriptyline and triclosan. The results showed that all studied drugs have activity against *L. (L.) amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, with 50% Effective Concentration values ranging from 1.50 to 51.48 μ M. The results obtained from the combination between the studied drugs and standard drugs were classified as additives or indifferent. Through the investigation of the leishmanial mechanism of action, it was possible to conclude that the mitochondria is a target organelle of the drug amitriptyline, whereas the drug triclosan induces damage to the parasitic plasma membrane. When treated with oral econazole (10 mg/kg/day for 28 consecutive days) or triclosan topically (1% cream for 14 consecutive days), there was a 75 - 89% reduction in the parasite load of the mice infected with *L. (L.) amazonensis*. The results obtained contribute to the investigation of new alternatives for the treatment of cutaneous leishmaniasis and suggest that new studies using association or coadministration of these drugs with standard drugs may be promising in animal models.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, drug repositioning, combination therapy, *Leishmania*, mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMT	Amitriptilina
ATP	Adenosine triphosphate
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNDi	Drug for Neglected Diseases Initiative
DP	Desvio Padrão
ECO	Econazol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FDA	Food and Drug Administration
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
IVIS	International Veterinary Information Service
La	<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> cepa selvagem
LaLuci	<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> expressora de luciferase
LC	Leishmaniose cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
M-199	Meio 199
MS	Ministério da Saúde
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest

RPMI 1640Meio Roswell Park Memorial Institute
SDSSodiumdodecyl sulfate
SERSertralina
SFBSoro fetal bovino
TRITriclosan
VOVia oral
XΣCIFMédia do Somatório da Concentração Inibitória Fracionária
ΣCIFSomatório da Concentração Inibitória Fracionária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da endemicidade da leishmaniose cutânea em 2015.	24
Figura 2: Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil no período de 1980 a 2014.	25
Figura 3: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	27
Figura 4: Morfologia e ultraestrutura da forma promastigota (a) e amastigota intracelular (b) de <i>Leishmania</i> sp.	28
Figura 5: Fluxograma do diagnóstico da leishmaniose cutânea.	30
Figura 6: Estrutura química dos fármacos empregados no tratamento da leishmaniose.	31
Figura 7: Estrutura química do fármaco amitriptilina.	40
Figura 8: Estrutura química do fármaco econazol.	41
Figura 9: Estrutura química do fármaco sertralina.	42
Figura 10: Estrutura química do fármaco triclosan.	43
Figura 11: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após o tratamento com amitriptilina, utilizando iodeto de propídeo. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina na concentração correspondente à CE ₅₀ do fármaco. Controles contendo células não tratadas e células tratadas com Triton-X 100 foram utilizados. O valor de p é representado por *** (p < 0,0001) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. As barras representam a média e o desvio padrão das duplicatas de um ensaio representativo.	66
Figura 12: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial utilizando rodamina 123 por citometria de fluxo. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina na concentração correspondente ao CE ₅₀ do fármaco por 30 e 60 minutos. Controles contendo parasitas não tratados e parasitos tratados com FCCP foram utilizados. Histograma mostrando em preto a fluorescência das células não tratadas e não marcadas; na cor verde as células não tratadas e marcadas; na cor vinho as células tratadas com FCCP	

e marcadas; na cor rosa as células tratadas com amitriptilina e marcadas, no período de 30 e 60 minutos (A). Gráfico representando a média das unidades de fluorescência e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. O valor de p é representado por ** ($p < 0,002$) e *** ($p < 0,0004$) e indica diferença significativa em relação ao controle não tratado de 30 e 60 minutos (B). AMT: amitriptilina. 67

Figura 13: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda H₂DCF-DA. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina no valor de CE₅₀ por 60 minutos. Controles com células não tratadas e células tratadas com azida sódica também foram utilizados. O valor de p é representado por *** ($p < 0,0001$) e indica diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. AMT: amitriptilina. 69

Figura 14: Análise ultraestrutural de promastigotas tratados com amitriptilina na concentração correspondente ao valor da CE₅₀ por 15, 30 e 60 minutos. Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas não tratados (A: barra 1 μ m). Promastigotas tratados com amitriptilina por 15 minutos (B: barra 1 μ m), 30 minutos (C: barra 1 μ m) e 60 minutos (D: barra 1 μ m). k: kinetoplasto, n: núcleo e mp: membrana plasmática. Aumento 15.000X. 70

Figura 15: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo. 72

Figura 16: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre amitriptilina e fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo. 73

Figura 17: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF da associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. 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. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. 76

Figura 18: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF da associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. 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. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. 77

Figura 19: Evolução clínica do tamanho das lesões de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados ou não com 15 mg/kg/dia de amitriptilina (VO). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. O tratamento foi realizado por 14 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos (n = 4/grupo). 79

Figura 20: Determinação da carga parasitária no grupo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com amitriptilina 15 mg/kg/dia (VO) após 14 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. 79

Figura 21: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com amitriptilina 15 mg/kg/dia (VO) após 14 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. 80

Figura 22: Curvas de dose-resposta geradas pela associação entre econazol e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultado de um experimento representativo. 81

- Figura 23:** Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação entre econazol e miltefosina em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. 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. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. 83
- Figura 24:** Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com econazol 2,5, 5 e 10 mg/kg/dia (VO). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. (n = 4/grupo)..... 84
- Figura 25:** Determinação da carga parasitária nos grupos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com econazol 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO) após 28 dias de tratamento e no grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. ... 85
- Figura 26:** Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com econazol 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO) após 28 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. 86
- Figura 27:** Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre sertralina e fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo. 88
- Figura 28:** Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre sertralina e fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo..... 89

Figura 29: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF das associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo de 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes..... 92

Figura 30: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF das associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo de 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. 93

Figura 31: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina em comparação com o grupo não tratado. O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. * $p < 0,01$ em relação ao grupo não tratado. (n = 4/grupo). Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO), representado em (A) e intraperitoneal (IP), representado em (B). 95

Figura 32: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina após 28 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. * $p < 0,02$ em relação ao grupo não tratado. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO) e intraperitoneal (IP).... 96

Figura 33: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com sertralina após 28

dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO) e intraperitoneal (IP)..... 97

Figura 34: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina em comparação com o grupo não tratado (controle). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos e barras indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. * p < 0,05 em relação ao grupo não tratado (n = 5/grupo). Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO). 98

Figura 35: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina após 14 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência de lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano (média e desvio padrão). *p < 0,05 em relação ao grupo não tratado. Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO). 99

Figura 36: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com sertralina após 14 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO). 100

Figura 37: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme contendo miristato e creme contendo miristato e sertralina 1% em comparação com o grupo não tratado (controle). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos e barras indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. **p < 0,005 em relação ao grupo não tratado. (n = 4/grupo)..... 101

Figura 38: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme contendo miristato e creme contendo miristato e sertralina 1% após 28 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano (média e desvio padrão). **p < 0,005 em relação ao grupo não tratado. 102

Figura 39: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle), tratados com creme contendo miristato (controle de veículo) e tratados com creme contendo miristato e sertralina 1% após 28 dias de tratamento. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano..... 103

Figura 40: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com triclosan, utilizando iodeto de propídeo. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan na concentração correspondente à CE₅₀ do fármaco. Controles contendo parasitas não tratados e parasitas tratados com Triton-X 100 também foram utilizados. O valor de p é representado por *** (p < 0,0001) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um ensaio representativo. 105

Figura 41: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial utilizando rodamina 123 por citometria de fluxo. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan na concentração correspondente ao CE₅₀ do fármaco por 30 minutos. Controles contendo células não tratadas e células tratadas com FCCP foram utilizados. Histograma mostrando em preto a fluorescência dos parasitas não tratados e não marcados; na cor verde os parasitas não tratados e marcados; na cor vinho os parasitas tratados com FCCP e marcados; na cor azul os parasitas tratados com triclosan por 30 minutos e marcados (A). Gráfico representando a média das unidades de fluorescência e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. O valor

de p é representado por ** ($p < 0,002$) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado (B)..... 106

Figura 42: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com triclosan utilizando a sonda $H_2DCF-DA$. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan no valor de CE_{50} por 30 minutos. Controles contendo parasitos não tratados e parasitos tratados com azida sódica também foram utilizados. O valor de p é representado por ** ($p < 0,002$) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo..... 107

Figura 43: Análise ultraestrutural de promastigotas tratados com triclosan na concentração correspondente ao valor da CE_{50} por 15 minutos. Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas não tratados (A: barra $1\mu m$) e promastigotas tratados com triclosan por 15 minutos (B: barra $2\mu m$). K: kinetoplasto, n: núcleo e mp: membrana plasmática. As setas (B) indicam ruptura na membrana plasmática e destruição das organelas. Aumento 15.000X. 108

Figura 44: Curvas de dose-resposta geradas pela associação entre triclosan e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo..... 109

Figura 45: Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação entre triclosan e miltefosina em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. 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. Os valores representam a média de dois experimentos independentes..... 111

Figura 46: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. O tratamento foi realizado por 14 dias consecutivos. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. ($n = 4/\text{grupo}$)..... 112

Figura 47: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme e creme contendo triclosan 1% após 14 dias de tratamento e o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões de cada grupo. O valor de p é representado por * ($p < 0,02$) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. 113

Figura 48: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle), tratados com creme (controle de veículo) e tratados com creme e triclosan 1% após 14 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. 114

Figura 49: Secções histológicas de pele de animais sadios não tratados (A), tratados com creme base sem agente permeante (B) e tratados com creme base sem agente permeante contendo triclosan 1% (C). Fotografias de coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 100X. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de CE_{50} e IS dos fármacos estudados e fármacos padrões contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e células de mamíferos NCTC clone 929.....	64
Tabela 2: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	74
Tabela 3: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	75
Tabela 4: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre econazol e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	82
Tabela 5: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	90
Tabela 6: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pelas associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	91
Tabela 7: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre triclosan e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i>	110

ÍNDICE

1. Introdução.....	23
1.1 Leishmaniose tegumentar.....	23
1.1.1 Ciclo de transmissão e biologia	26
1.1.2 Patogenia e diagnóstico.....	29
1.1.3 Tratamento.....	30
1.1.3.1 Antimônio pentavalente	31
1.1.3.2 Anfotericina B	33
1.1.3.3 Pentamidina.....	34
1.1.3.4 Pentoxifilina (coadjuvante).....	34
1.1.3.5 Miltefosina	35
1.1.3.6 Paromomicina.....	36
1.1.3.7 Tratamentos alternativos	37
1.1.4 Pesquisa de fármacos e alternativas terapêuticas	37
1.1.4.1 Fármacos estudados	39
1.1.4.1.1 Amitriptilina.....	39
1.1.4.1.2 Econazol	40
1.1.4.1.3 Sertralina.....	41
1.1.4.1.4 Triclosan.....	43
1.2 Justificativa e relevância	45
2. Objetivos.....	46
2.1 Gerais	46
2.2 Específicos.....	46
3. Material e métodos	48
3.1 Reagentes e compostos sintéticos	48
3.2 Parasitos, células de mamífero e animais de experimentação	48
3.2.1 <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	48
3.2.2 Células de mamíferos	49
3.2.3 Animais de experimentação.....	49

3.3	Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos estudados	50
3.4	Determinação <i>ex vivo</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos estudados	51
3.5	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	52
3.6	Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	53
3.6.1	Alteração da integridade da membrana plasmática	53
3.6.2	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	54
3.6.3	Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	55
3.6.4	Estudo das alterações ultraestruturais	55
3.7	Determinação <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> das associações entre os fármacos estudados e os fármacos padrões.....	56
3.8	Avaliação da eficácia dos fármacos em camundongos infectados.....	57
3.8.1	Esquema de tratamento com amitriptilina	58
3.8.2	Esquemas de tratamento com econazol	59
3.8.3	Esquemas de tratamento com sertralina.....	59
3.8.4	Esquemas de tratamento com triclosan	61
3.9	Análises estatísticas	62
4.	Resultados.....	63
4.1	Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> (<i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>) e citotoxicidade	63
4.2	Amitriptilina	64
4.2.1	Avaliação do mecanismo de ação em <i>L. (L.) amazonensis</i>	64
4.2.1.1	Alteração da integridade da membrana plasmática	65
4.2.1.2	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	66
4.2.1.3	Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio.....	68
4.2.1.4	Alterações ultraestruturais	69

4.2.2	Associações entre amitriptilina e fármacos padrões	71
4.2.3	Avaliação da eficácia da amitriptilina no tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	78
4.3	Econazol	80
4.3.1	Associação entre econazol e miltefosina	80
4.3.2	Eficácia do econazol no tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	83
4.4	Sertralina.....	87
4.4.1	Associações entre sertralina e os fármacos padrões....	87
4.4.2	Avaliação da eficácia da sertralina no tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	94
4.5	Triclosan	104
4.5.1	Avaliação do mecanismo de ação em <i>L. (L.) amazonensis</i>	104
4.5.1.1	Alteração da integridade da membrana plasmática.....	104
4.5.1.2	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	105
4.5.1.3	Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio.....	107
4.5.1.4	Alterações ultraestruturais	108
4.5.2	Associação entre triclosan e miltefosina	109
4.5.3	Eficácia do triclosan no tratamento de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	111
5.	Discussão	116
6.	Conclusões	135
7.	Referências Bibliográficas.....	137
8.	Anexo.....	158

1. Introdução

A leishmaniose é classificada como uma doença tropical negligenciada que acompanha a humanidade desde os tempos mais antigos (PAHO, 2017). É endêmica em 98 países e cerca de 350 milhões de pessoas estão em situação de risco de adquirir a infecção (Stockdale e Newton, 2013).

As manifestações clínicas da leishmaniose variam desde úlceras localizadas na pele a uma doença sistêmica letal, e está associada à pobreza, desnutrição, deficiência imune, deslocamento populacional e mudanças ambientais e climáticas (Alves et al., 2013, WHO, 2017).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e leva a morte quase invariavelmente, se não for tratada. Já a leishmaniose tegumentar pode ser categorizada como localizada, mucocutânea, difusa e disseminada, sendo que a forma localizada pode evoluir para cura espontaneamente, após uma progressão crônica, porém, todas as outras formas são severas, mutilam e respondem mal às opções terapêuticas disponíveis (Uliana et al., 2017). No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea tende a curar espontaneamente, mas as formas do Novo Mundo geralmente exigem tratamento sistêmico (Zulfiqar et al., 2017).

1.1 Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das seis mais importantes doenças infecciosas (MS, 2017). A forma mais comum delas é a leishmaniose cutânea, com 0,7 a 1,3 milhões de novos casos por ano em todo o mundo (Steverding, 2017).

A leishmaniose cutânea é endêmica em mais de 70 países em todo o mundo e a maioria dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (**Figura 1**) (Reithinger et al., 2007; WHO, 2017).

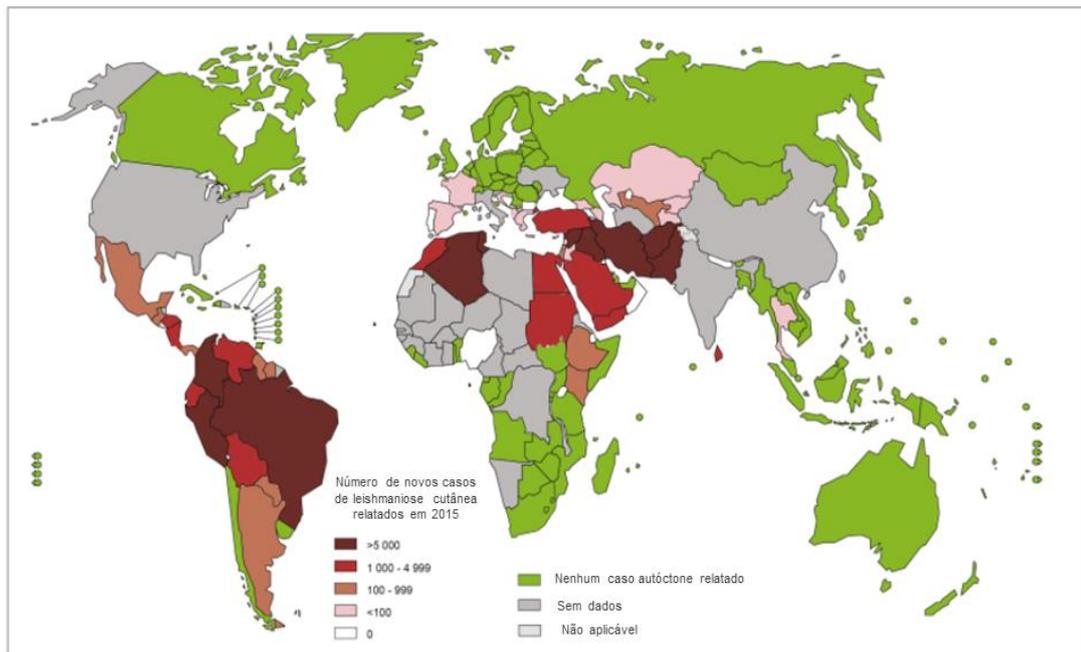


Figura 1: Distribuição geográfica da endemicidade da leishmaniose cutânea em 2015.

Fonte: WHO, 2017 (modificado).

Além de alta incidência e ampla distribuição geográfica, sua importância também se deve à possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo e Carvalho, 2003).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção devido à sua magnitude, pois apresenta ampla distribuição no território nacional, com registro de casos em todas as regiões brasileiras. A partir da década de 1980 (**Figura 2**), nota-se o aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). No período de 1995 a 2014, verifica-se uma média anual de 25.763 novos casos (MS, 2017).

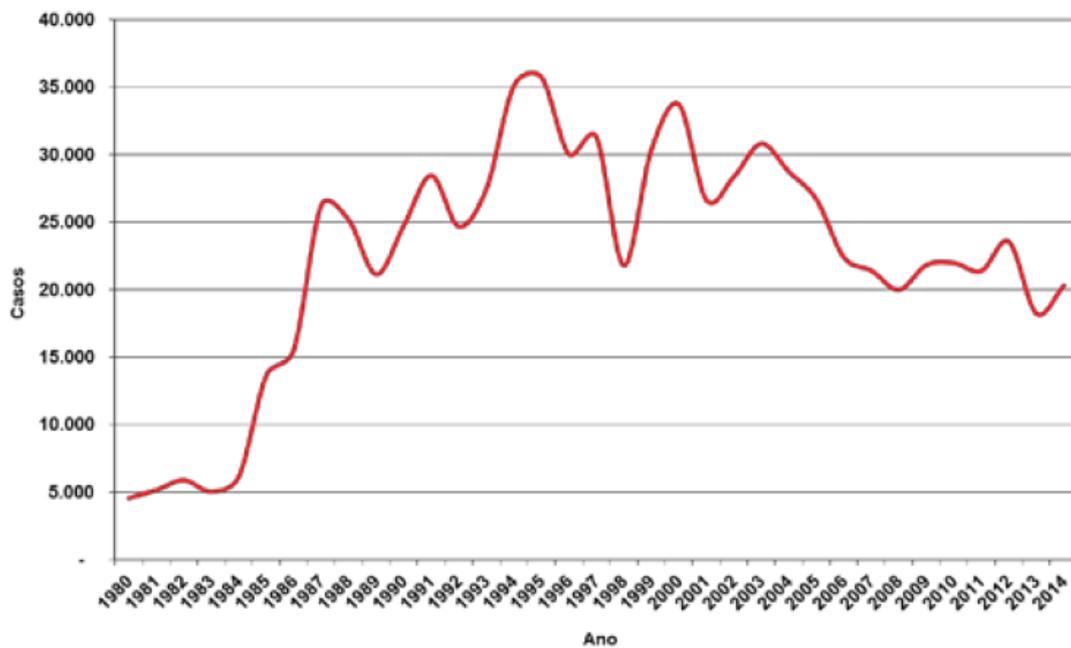


Figura 2: Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil no período de 1980 a 2014.

Fonte: MS, 2017.

No Brasil, três principais espécies são responsáveis por essa parasitose: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (Alves et al., 2013).

Leishmania (V.) braziliensis foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da leishmaniose tegumentar (PS, 2017). A doença humana é caracterizada pela presença de úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase e que levam à forma mucosa da doença. Está presente não só no Brasil, mas em toda América Latina, desde a América Central até o norte da Argentina (MS, 2017).

A *Leishmania (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são consequência de picadas simultâneas de vários flebótomos infectados ou metástases linfáticas secundárias. É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie (MS, 2017). Aparentemente está limitada à Região Norte do

país (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Para), estendendo-se para as Guianas (PS, 2017).

Leishmania (L.) *amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas, e ocasionalmente, podem desenvolver o quadro clássico de leishmaniose cutânea difusa, que se caracteriza por lesões nodulares (Mears et al., 2015; MS, 2017). Está distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e se amplia para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (PS, 2017). Seu principal vetor é o *Lutzomyia flaviscutellata*, que apresenta ampla distribuição geográfica (MS, 2017).

A interação entre patógeno e hospedeiro é considerada um sistema complexo, uma vez que pode estar em constante mudança em função de alterações no meio ambiente. São considerados reservatórios os animais que garantem a circulação do parasito na natureza dentro de curto tempo e espaço, como animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos e felídeos) (MS, 2017; PS, 2017).

1.1.1 Ciclo de transmissão e biologia

Leishmania é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: forma promastigota e forma amastigota intracelular (MS, 2017).

Parasitas do gênero *Leishmania* são heteroxenos, sendo assim, alternam o ciclo biológico entre hospedeiros distintos: invertebrado (fêmeas de flebotomíneos) e vertebrado (diversas classes de mamíferos e alguns répteis) (Miguel, 2011).

A transmissão de protozoários do gênero *Leishmania* (**Figura 3**) ocorre quando a fêmea do flebotomíneo (infectada com *Leishmania* sp.) ao fazer o repasto sanguíneo, regurgita formas promastigotas na pele do hospedeiro, que invadem ou são fagocitadas por células hospedeiras locais

ou recrutadas, principalmente macrófagos, onde no interior de fagolisossomos terão de subverter aos mecanismos de defesa inatos (Reithinger et al., 2007). Sinais como o aumento da temperatura e a diminuição do pH são cruciais para a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, que se dividirão até a ruptura da célula hospedeira, infectando principalmente outros macrófagos do local ou em tecidos distantes após a disseminação, se manifestando em diferentes formas clínicas (Reithinger et al., 2007; Miguel, 2011). Quando o inseto vetor (não infectado) faz o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, este ingere macrófagos infectados com amastigotas, que ao atingirem o seu tubo digestivo, se transformam em promastigotas e permanecem aderidos às microvilosidades do intestino médio (dependendo da espécie de *Leishmania*, diferentes regiões do intestino serão parasitadas). Esses parasitos migram para probóscida do inseto (aparelho bucal) completando assim seu ciclo de vida, conforme ilustrado na **Figura 3** (Reithinger et al., 2007).

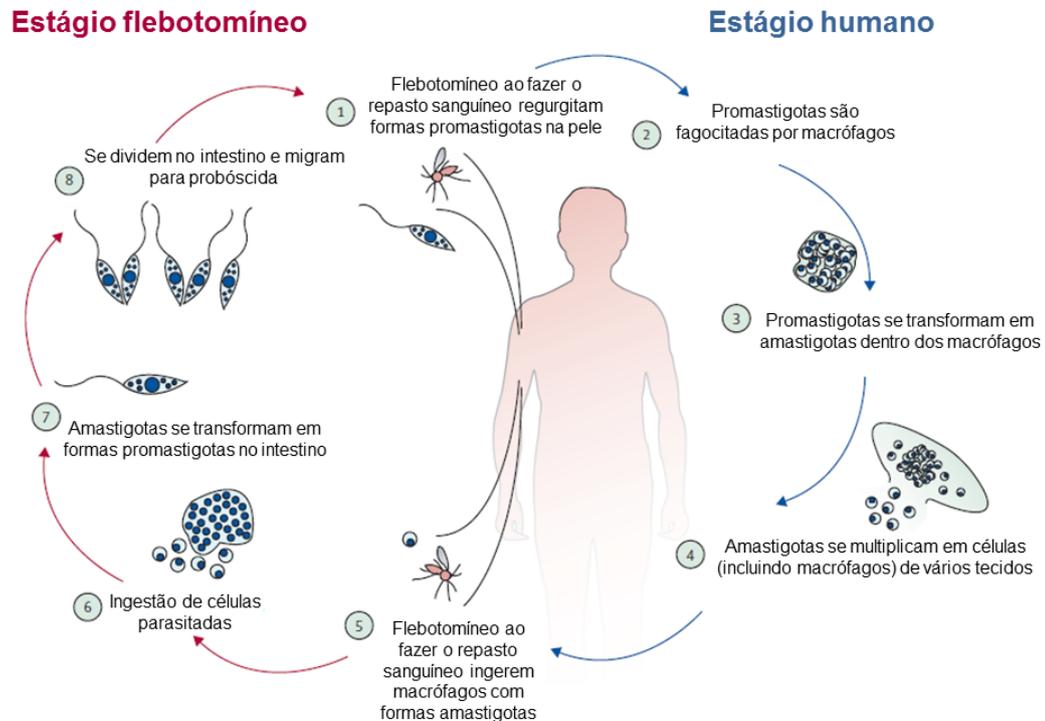


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

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

Os promastigotas (**Figura 4 a**) são morfologicamente distintos dos amastigotas intracelulares e subclassificados em cinco tipos: procíclico, nectomona, leptomona, haptomona e metacíclico, este último considerado o estágio infectante para o hospedeiro mamífero (Kamhawi, 2006; Zulfiqar et al., 2017). As formas promastigotas possuem flagelo, usado para propulsão do parasito e é encontrado no tubo digestivo do inseto vetor (MS, 2017).

Os amastigotas intracelulares (**Figura 4 b**) são arredondados e residem dentro de macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear. Essas formas se dividem, rompendo as células do hospedeiro, quando então são fagocitadas por outros macrófagos (Zulfiqar et al., 2017).

Ao longo do seu ciclo de vida, os parasitos sofrem importantes alterações morfológicas e bioquímicas, mas ainda assim conservam uma típica estrutura flagelar proeminente (promastigota) ou reduzida (amastigota), cinetoplasto terminal, o qual possui uma rede entrelaçada de DNA circular dentro da grande mitocôndria, conhecido como kDNA, núcleo, retículo endoplasmático, entre outros, observados na **Figura 4** (Miguel, 2011; Kaufer et al., 2017; Zulfiqar et al., 2017).

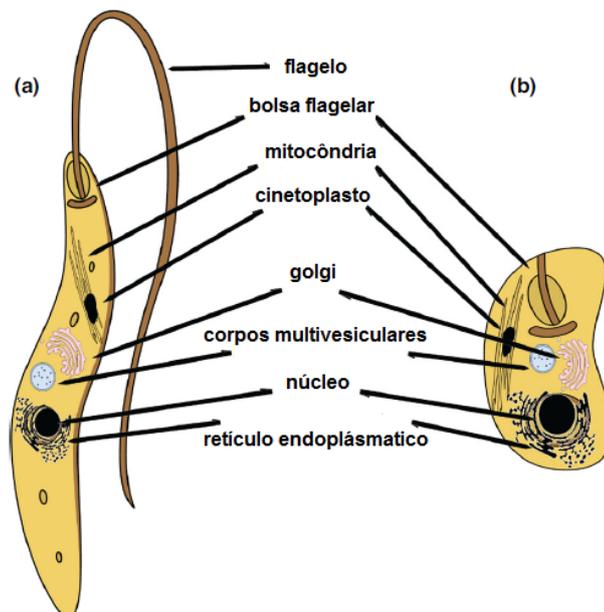


Figura 4: Morfologia e ultraestrutura da forma promastigota (a) e amastigota intracelular (b) de *Leishmania* sp.

Fonte: Zulfiqar et al., 2017 (modificado).

1.1.2 Patogenia e diagnóstico

Várias espécies de *Leishmania* podem causar leishmaniose cutânea em humanos (Reithinger et al., 2007). Os sintomas se desenvolvem em uma estimativa de 2-8 semanas pós-infecção, dependendo da espécie inoculada. Após incubação assintomática, um único ou pequeno número de lesões nodulares ou papulares que aumentam em tamanho acompanhado de vermelhidão se desenvolvem no local da inoculação da *Leishmania* (Scorza et al., 2017; Zulfiqar et al., 2017).

O tamanho da lesão pode variar de alguns milímetros a centímetros de diâmetro e às vezes podem ser múltiplas no mesmo indivíduo (Zulfiqar et al., 2017). A linfadenopatia pode desenvolver-se como primeira indicação de doença causada por algumas espécies e pode preceder a formação da lesão (Scorza et al., 2017).

A resolução da lesão não corresponde à cura estéril, pois parasitos ou DNA parasitário podem ser encontrados nas cicatrizes de pacientes curados há vários anos. Isso pode explicar o fenômeno de aparecimento de recidivas tardias e o surgimento dessa doença em pacientes imunocomprometidos (Scorza et al., 2017). A perda da eficiência da resposta imune leva a um desequilíbrio entre parasito e hospedeiro, facilitando a multiplicação dos parasitos e produzindo as lesões (MS, 2017; Scorza et al., 2017).

Na presença de lesões sugestivas de leishmaniose, o diagnóstico presuntivo pode ser baseado em critérios clínicos e epidemiológicos, mas deve ser complementado pela pesquisa direta de parasitos na lesão ou pela Intradermoreação de Montenegro (IDRM) e, eventualmente, pela prova terapêutica ou outras técnicas como mostrado no fluxograma do diagnóstico da leishmaniose cutânea (**Figura 5**) (MS, 2017).

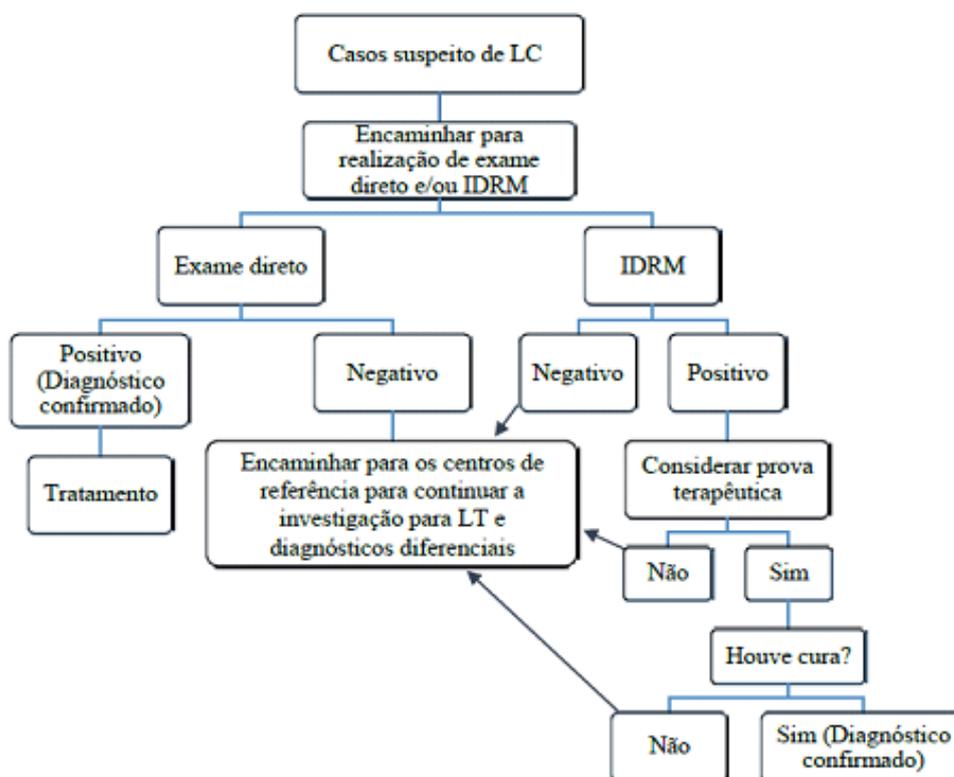


Figura 5: Fluxograma do diagnóstico da leishmaniose cutânea.

Fonte: MS, 2017.

1.1.3 Tratamento

O tratamento da leishmaniose é desafiador e atualmente não há vacinas ou fármacos para prevenir a infecção humana (Charlton et al., 2017). A terapia da leishmaniose é problemática principalmente pela complexidade da doença nas suas diferentes formas (Zulfiqar et al., 2017). O tratamento da leishmaniose está longe de ser ideal principalmente pela elevada toxicidade, falta de eficácia, via de administração parenteral, custo elevado, resistência aos fármacos e falta de acesso em algumas áreas endêmicas (Reimão et al., 2014; Zulfiqar et al., 2017).

Os antimoniais pentavalentes foram os primeiros fármacos aplicados ao tratamento das leishmanioses, e juntos com anfotericina B, pentamidina,

miltefosina e paromomicina, constituem os recursos disponíveis para a quimioterapia das leishmanioses (**Figura 6**) (Uliana et al., 2017).

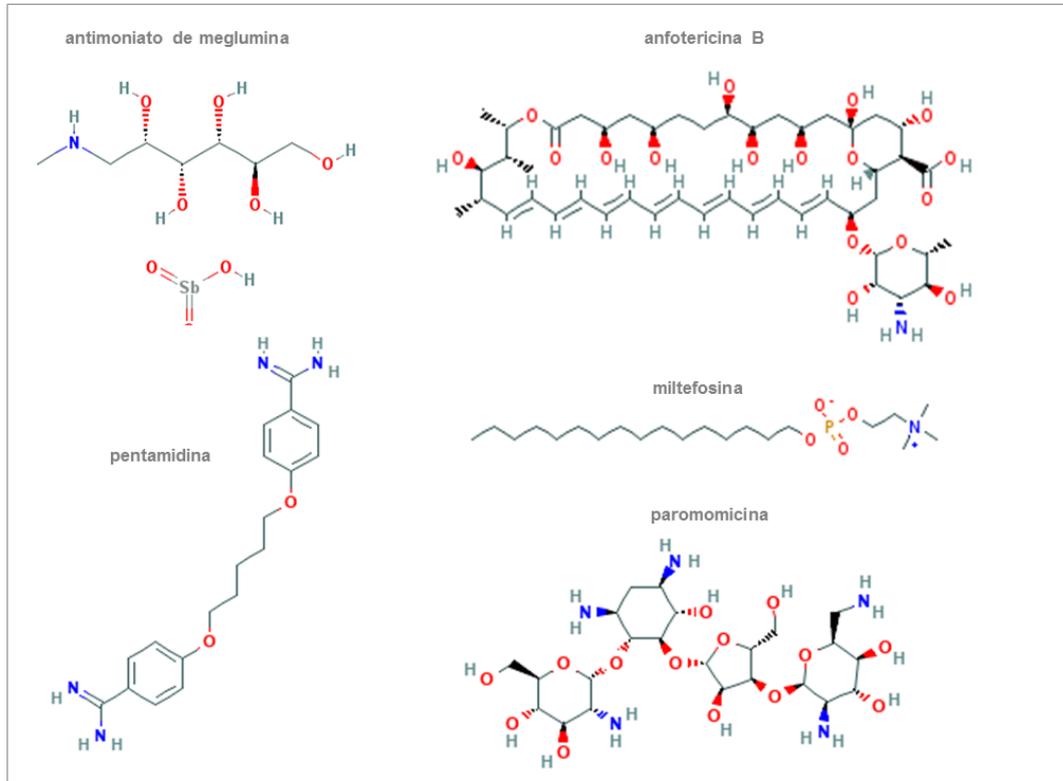


Figura 6: Estrutura química dos fármacos empregados no tratamento da leishmaniose.

Fonte: PubChem Compound, 2017.

A leishmaniose cutânea, embora não seja fatal, é tratada com o objetivo de acelerar a cura, reduzir cicatrizes e prevenir a disseminação do parasito (Reithinger et al., 2007).

1.1.3.1 Antimônio pentavalente

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido antes da era cristã, para outros fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana (Rath et al., 2003). Os antimoniais

pentavalentes são usados desde a década de 40 por via intramuscular ou intravenosa e permanecem como fármacos de primeira escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar americana (MS, 2006; Charlton et al., 2017).

Atualmente, existem duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado internacional: o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo o primeiro comercializado no Brasil (MS, 2017).

A Organização Mundial da Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, devido à sua elevada toxicidade (Rath et al., 2003). Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso desse fármaco e requer avaliação clínica durante o tratamento, como eletrocardiograma, hemograma e exames bioquímicos (Rath et al., 2003; MS, 2017).

Além da via parenteral, outra opção para administração do antimoniato de meglumina é por via intralesional. A via intralesional (via subcutânea) tem sido usada na clínica e é restrita à forma cutânea localizada e recidiva cútis (MS, 2017). Em um estudo realizado por Silva e colaboradores (2016), a maioria dos pacientes relataram desconforto durante a aplicação, não se observou efeitos adversos graves e os resultados mostraram taxa de eficácia muito semelhante ao tratamento sistêmico.

O modo de ação do antimônio pentavalente não é totalmente compreendido, mas uma hipótese sugere a possibilidade da redução biológica do antimônio pentavalente a antimônio trivalente pelo parasito ou pelas células infectadas para criar um agente ativo (No, 2016). Isso sugere que o antimônio pentavalente possa ser um pró-fármaco, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração, e assim possa interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (Rath et al., 2003). A segunda

hipótese sugere que o antimônio pentavalente age diretamente no parasito (No, 2016).

No Brasil, quando ocorre falência no tratamento da leishmaniose tegumentar com antimoniais pentavalentes ou não se obtêm resultados satisfatórios, empregam-se os fármacos de segunda escolha, anfotericina B e/ou anfotericina B lipossomal (via intravenosa) ou pentamidina (via intramuscular ou intravenosa) (Ferreira et al., 2012; MS, 2017).

1.1.3.2 Anfotericina B

O fármaco anfotericina B é um antibiótico e antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada como fármaco de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses (Rath et al., 2003). Seu uso é limitado, devido aos efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade e hematotoxicidade (No, 2016).

No Brasil, estão disponíveis o desoxicolato de anfotericina B e as formulações lipídicas de anfotericina B. A infusão deve ser realizada via intravenosa lenta, durante um período de quatro a seis horas, quando se recomenda a monitorização da função renal e hepática, dos eletrólitos séricos e dos componentes sanguíneos (MS, 2017).

Anfotericina B lipossomal é utilizada em pacientes com insuficiência renal, cardíaca, hepática, gestantes, transplantados renais e em pacientes com idade superior a 50 anos (MS, 2017). Também é considerada menos tóxica do que anfotericina B na sua forma livre (Rath et al., 2003, López-Velez et al., 2004). Mesmo com alta taxa de cura, seu custo ainda é proibitivo em várias regiões endêmicas (No, 2016; Uliana et al., 2017).

O mecanismo de ação da anfotericina B consiste na formação de poros na membrana do parasito, devido à ligação ao ergosterol (Cabezas et al., 2015). Este efeito induz à perda de íons e dano oxidativo, com consequente morte celular (Mesa-Arango et al., 2012). Uma nova hipótese sobre seu mecanismo de ação propõe que o efeito do tratamento com anfotericina B poderia ser devido a uma combinação da sua interação com

ambos os esteróis, isto é, ergosterol de *Leishmania* e colesterol de macrófagos hospedeiros (Chattopadhyay e Jafurulla, 2011).

1.1.3.3 Pentamidina

O fármaco pentamidina é relativamente eficaz na terapia da leishmaniose e seu uso é reservado apenas aos casos de falha terapêutica com antimoniais e anfotericina B (Miguel, 2011). As pentamidinas são diamidinas aromáticas que podem ser usadas no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americanos, asiático e africano (MS, 2017).

O fármaco é apresentado como isetionato de pentamidina, e suas vias de administração são intramuscular ou intravenosa, não ultrapassando a dose de 2 g (MS, 2017). A alta toxicidade deste fármaco também é fator limitante para seu uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina já foram descritas (Rath et al., 2003). Faz-se necessário monitorar a função renal e pancreática, assim como realizar eletrocardiograma e glicemia antes, durante e ao final do tratamento com este fármaco (MS, 2017).

A ação primária da pentamidina em *Leishmania* não é bem compreendida (No, 2016). A absorção de pentamidina está envolvida em dois sistemas de transporte dependentes de energia, a arginina e os transportadores de poliaminas. O fármaco pentamidina parece promover a morte celular programada atuando nas mitocôndrias, afetando o complexo da cadeia respiratória e/ou inibindo o processo de replicação parasitária (No, 2016).

1.1.3.4 Pentoxifilina (coadjuvante)

O fármaco pentoxifilina é um vasodilatador empregado no tratamento de doença vascular periférica e seu efeito tem sido investigado

experimentalmente no tratamento de algumas doenças inflamatórias, uma vez que possui efeito inibitório sobre TNF- α (Almeida e Santos, 2011). No Brasil, este fármaco tem sido usado na clínica e demonstrado sucesso como coadjuvante (imunomodulador) no tratamento da leishmaniose tegumentar, com desfecho de cura em menor tempo quando comparado ao tratamento convencional (MS, 2017). O seu papel é atuar como um adjuvante, pois não possui eficácia como medicamento isolado. Quando é administrado em altas doses, podem ocorrer distúrbios gastrintestinais, náusea, vômito ou diarreia, arritmia cardíaca, vertigem, entre outros (MS, 2017).

Segundo um estudo realizado por Machado e colaboradores (2007) a adição de pentoxifilina ao antimônio reduz significativamente o tempo de cicatrização e impede a necessidade de mais antimônio no tratamento da leishmaniose mucosa.

1.1.3.5 Miltefosina

O fármaco miltefosina foi originalmente desenvolvido como agente antineoplásico (Almeida e Santos, 2011). Este fármaco de administração oral é usado na Índia para tratar a forma visceral da doença (Soto et al., 2004). Em 2014, o FDA aprovou este fármaco para o tratamento da leishmaniose cutânea em adultos e adolescentes que não estão grávidas ou que amamentam (CDC, 2017). Tem sido utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea causada por diferentes espécies, com eficácia variável (Chrusciak-Talhari et al., 2011).

Estudos mostram que as taxas de cura com miltefosina variam muito entre as leishmanioses causadas por diferentes espécies de *Leishmania* (Soto et al., 2004). Um estudo realizado por Chrusciak-Talhari e colaboradores (2011) mostrou evidências da eficácia clínica da miltefosina contra *Leishmania (V.) guyanensis*, mostrando-se segura e relativamente bem tolerada, com taxa de cura superior ao antimônio. Outro estudo realizado por Machado e colaboradores (2010) mostra que a terapia com miltefosina é mais eficaz e segura do que a terapia com antimônio em

pacientes do estado da Bahia infectados com *Leishmania (V.) braziliensis*. Outro estudo mostra que a miltefosina mostrou eficácia semelhante, senão superior ao antimônio no tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos (Costa Filho et al., 2008).

Seu mecanismo de ação está relacionado à modulação da composição lipídica, permeabilidade e fluidez da membrana plasmática. Além disso, este fármaco interfere no metabolismo de fosfolipídeos, na transdução de sinal, na homeostase de cálcio, na síntese de fosfatidilcolina e RNA, induzindo a morte celular (Costa Filho et al., 2008; Miguel, 2011). Também parece afetar a função mitocondrial mediante a despolarização da membrana e a inibição da citocromo c oxidase (No, 2016).

1.1.3.6 Paromomicina

Outro medicamento que tem se mostrado efetivo no tratamento da leishmaniose é a paromomicina, que é um antibiótico aminoglicosídeo. Estudos clínicos para testar a eficácia da paromomicina injetável no tratamento da leishmaniose visceral têm sido realizados na Índia, onde o tratamento com antimonial padrão não é efetivo e as taxas de mortalidade são altas (Rath et al., 2003).

Este fármaco foi proposto como um agente tópico para tratamento da leishmaniose cutânea e mais tarde surgiu como alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, porém, não apresentou a mesma resposta na África Oriental, onde os ensaios demonstraram taxas de cura menores que os antimoniais (Uliana et al., 2017). Por outro lado, a associação de paromomicina com o antimonial mostrou ser tão eficaz quanto o antimonial sozinho, representando um avanço em termos de opções terapêuticas (Uliana et al., 2017). São descritos como principais efeitos colaterais nefrotoxicidade e ototoxicidade (Pandey et al, 2009; Wiwanitkit, 2012). Sua ação leishmanicida envolve a inibição da atividade mitocondrial (Almeida e Santos, 2011).

1.1.3.7 Tratamentos alternativos

Outros fármacos têm sido utilizados como alternativa no tratamento da leishmaniose, como os azóis, que são moléculas capazes de interferir na biossíntese de ergosterol, o alopurinol, um análogo de purinas, o imiquimod, um agente imunomodulador capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados e a sitamaquina, uma 8-aminoquinolina capaz de se acumular no parasita e interagir com a membrana plasmática (Miguel, 2011; Mesquita, 2013; CDC, 2017).

Alguns casos de leishmaniose cutânea sem risco de disseminação ou doença da mucosa podem ser candidatos à terapia tópica (CDC, 2017). As lesões são difíceis de tratar e abordagens alternativas têm sido utilizadas aos fármacos convencionais, incluindo crioterapia, termoterapia, laser de dióxido de carbono, fototerapia dinâmica e eletroterapia, com resultados variáveis (Zulfiqar et al., 2017).

1.1.4 Pesquisa de fármacos e alternativas terapêuticas

O tratamento da leishmaniose ainda constitui um desafio com grandes limitações, pois a maioria dos medicamentos possui elevada toxicidade, são injetáveis e geram despesas indiretas com insumos hospitalares, internações, afastamento do trabalho, entre outros (DNDi, 2012; Neves et al., 2011; Penna et al., 2011).

Em geral, por acometer populações com baixo nível socioeconômico, a pesquisa de alternativas terapêuticas para a leishmaniose é pouco atraente para a indústria farmacêutica (Penna et al., 2011). Tendo em vista a problemática descrita, é evidente a necessidade de se investigar novas opções terapêuticas para esta enfermidade, já que o arsenal terapêutico disponível carece de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos (Gil et al., 2007).

O caminho do desenvolvimento de fármacos está repleto de

obstáculos. Obter uma compreensão clara de como um fármaco funciona antes de iniciar ensaios clínicos é a rota racional para a descoberta de novos fármacos e pode aumentar a probabilidade de sucesso na obtenção de um fármaco (NM, 2010).

O desenvolvimento de fármacos é um negócio arriscado. De acordo com FDA, apenas oito por cento dos fármacos que são avaliados em ensaios clínicos são aprovados, já que para que um fármaco seja aprovado, este deve apresentar segurança e eficácia clínica (NM, 2010).

Neste contexto, a estratégia de reposicionamento de fármacos vem sendo empregada de forma promissora na introdução de novas terapias. Esta estratégia é conhecida por encontrar novas indicações para medicamentos já aprovados, como por exemplo, a utilização de acetato de zinco para tratar a doença de Wilson, a talidomida para tratar mieloma e a anfotericina B para tratar leishmaniose (Chiang e Butte, 2009; Palomino e Martin, 2013).

O reposicionamento de fármacos tem muitas vantagens, uma vez que a farmacocinética e a farmacodinâmica destes medicamentos já são conhecidas (Chiang e Butte, 2009). A descoberta de novas aplicações clínicas para fármacos já aprovados é uma estratégia para reduzir o custo e o tempo da descoberta de medicamentos, já que os ensaios de toxicidade humana já foram previamente realizados (Chiang e Butte, 2009; Andrade-Neto et al., 2018).

Outra estratégia aplicada à terapia da leishmaniose é a associação de fármacos, que traz benefícios relevantes diante da monoterapia (Speich et al., 2012). Especialmente para o tratamento das leishmanioses, a terapia combinada tem sido preconizada visando o aumento da eficácia e tolerância, encurtando a duração e o custo do tratamento e prevenindo o aparecimento de resistência (Aguiar et al., 2010; Van Griensven et al., 2010).

Estudos em modelos experimentais de leishmanioses têm mostrado resultados promissores no uso da terapia combinada. Um deles demonstrou que a associação de gel de paramomicina tópica e mitelfosina oral reduziu o tamanho da lesão e a carga parasitária em camundongos infectados com *L.*

(L.) *amazonensis* (Aguiar et al., 2010).

A busca por tratamentos tópicos mais eficazes, de baixo custo, bem absorvidos, de reduzida toxicidade, que possam ser utilizados por pacientes em áreas remotas e que curem as lesões sem deixar cicatrizes profundas, é uma abordagem racional para a terapia da leishmaniose cutânea (Garnier e Croft, 2002; DNDi, 2013).

O desenvolvimento de formulações tópicas é uma estratégia interessante para diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de alguns fármacos (Silva et al., 2010).

Algumas vantagens são apresentadas para essa via de administração, como a diminuição das variações plasmáticas, redução na frequência de administração do fármaco, facilidade imediata de interrupção do tratamento, além de ser uma boa alternativa à via intravenosa por não ser invasivo (Martins e Veiga, 2002).

1.1.4.1 Fármacos estudados

1.1.4.1.1 Amitriptilina

Amitriptilina (**Figura 7**) é um antidepressivo tricíclico com efeitos sedativos que inibe o mecanismo de transporte de membrana responsável pela captação de norepinefrina e serotonina em neurônios adrenérgicos e serotoninérgicos, embora seu mecanismo não seja totalmente conhecido (Drugs, 2017; DrugBank, 2017). Em indivíduos deprimidos, exerce um efeito positivo sobre o humor (DrugBank, 2017).

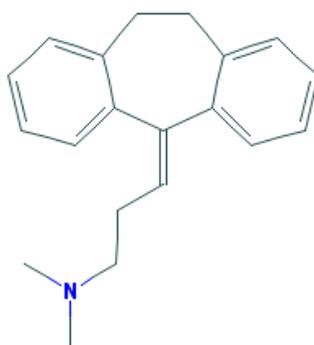


Figura 7: Estrutura química do fármaco amitriptilina.

Fonte: PubChem Compound, 2017.

É também relatado que este fármaco exerce propriedades antimicrobianas *in vitro* e *in vivo* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Mandal et al., 2010). Outros estudos relatam sua atividade contra fungos (Mandal et al., 2010), *Trypanosoma cruzi* (Planer et al., 2014) e *Leishmania* sp. (Zilberstein et al., 1990; Evans e Croft, 1994).

Segundo Zilberstein e colaboradores (1990), os compostos tricíclicos têm sido sugeridos como potenciais fármacos anti-*Leishmania*. Os autores demonstraram a atividade *in vitro* da amitriptilina pela redução no transporte de prolina e depleção de ATP em promastigotas de *L. (L.) donovani*. Outro estudo de Evans e Croft (1994) demonstrou a atividade anti-*Leishmania* de compostos tricíclicos, entre eles o fármaco amitriptilina, testados em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani*.

1.1.4.1.2 Econazol

O fármaco econazol (**Figura 8**) é um derivado de imidazol comumente usado como agente antifúngico tópico. Sua ação compromete a integridade da parede celular fúngica, aumentando a permeabilidade celular, resultando assim em extravasamento do conteúdo celular (PubChem Compound, 2017).

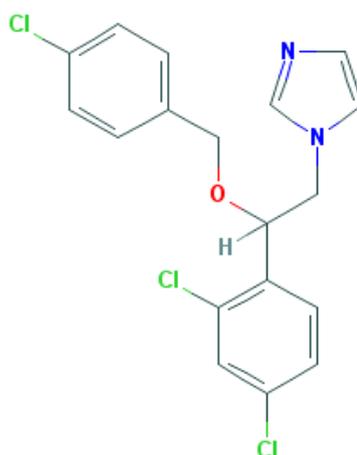


Figura 8: Estrutura química do fármaco econazol.

Fonte: PubChem Compound, 2017.

Os antifúngicos azólicos constituem uma classe importante de agentes quimioterapêuticos com amplo espectro de atividade contra leveduras e fungos filamentosos. Eles atuam na via biossintética do ergosterol através da inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase (Emani et al., 2017). São usados no tratamento de dermatomicoses por via tópica, oral e parenteral (PubChem Compound, 2017).

Estudos mostraram o potencial bactericida do econazol e do clotrimazol contra *Mycobacterium tuberculosis in vitro* e *ex vivo* e seu sinergismo com fármacos convencionais usados no tratamento da tuberculose (Gupta et al., 2015).

Um estudo realizado por nosso grupo (Mesquita et al., 2014) demonstrou a atividade do fármaco econazol contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*, bem como seu mecanismo de ação, o qual envolve a permeabilização da membrana plasmática em formas promastigotas.

1.1.4.1.3 Sertralina

O fármaco sertralina (**Figura 9**) é um antidepressivo inibidor seletivo da reabsorção de serotonina que possui atividade ansiolítica. Oferece várias

vantagens em relação a outros antidepressivos, incluindo tolerância melhorada do paciente, baixo risco de letalidade em sobredosagem e nenhum potencial de dependência (McRae e Brady, 2001). Sua atividade também se estende ao tratamento de outros transtornos, como: transtornos alimentares, obsessivo compulsivo, disfórico pré-menstrual, estresse pós-traumático, pânico, ansiedade social e dependência química (McRae e Brady, 2001; Muijsers et al., 2002; Sarkar e Manna, 2015).

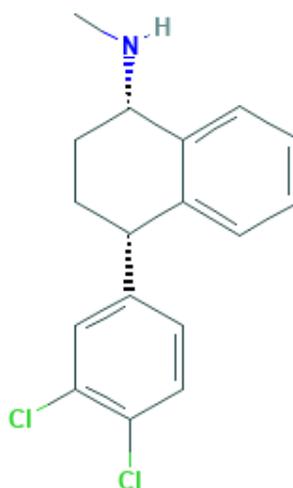


Figura 9: Estrutura química do fármaco sertralina.

Fonte: PubChem Compound, 2017.

Esse fármaco também possui atividade antifúngica, antimicrobiana, antiviral, espermicida, anti-*Trichomonas*, anticancerígena, anti-*T. cruzi* e leishmanicida contra *L. (L.) donovani* (Palit e Ali, 2008; Zhai et al., 2012; Planer et al., 2014; Johansen et al., 2015; Sarkar e Manna, 2015).

Um estudo realizado por Palit e Ali (2008) mostrou que sertralina foi ativa *in vitro* contra formas promastigotas e *ex vivo* contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*, apresentando valores de CE₅₀ próximos de 2 µg/mL. Sertralina também foi eficaz *in vivo* no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani*, levando à redução em cerca de 70% da carga parasitária no fígado e baço. Segundo os

autores, sertralina induziu uma queda nos níveis de ATP citoplasmáticos e na taxa de consumo de oxigênio em promastigotas. Esses dados sugerem que sertralina pode ser promissora no tratamento oral da leishmaniose visceral (Palit e Ali, 2008).

Estudos preliminares *in vitro* e *ex vivo* realizados por nosso grupo (dados não publicados) demonstraram atividade da sertralina contra *L. (L.) infantum* e *T. cruzi*. Esses estudos também sugerem que a mitocôndria seja o alvo da ação desse fármaco contra esses parasitos.

1.1.4.1.4 Triclosan

Triclosan (**Figura 10**) é um derivado de éter usado em cosméticos como antisséptico, com conhecida atividade antibacteriana e antifúngica (PubChem Compound, 2017). Também é amplamente utilizado como agente conservante e antimicrobiano em produtos de higiene pessoal, como sabões, cremes para a pele, creme dental e desodorante (DrugBank, 2017). Em creme dental, triclosan é utilizado para prevenir gengivite (PubChem Compound, 2017).

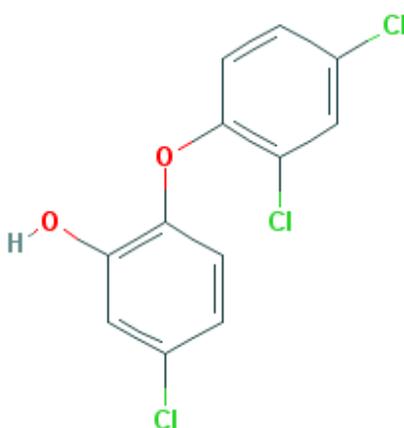


Figura 10: Estrutura química do fármaco triclosan.

Fonte: PubChem Compound, 2017.

Nas concentrações usadas em cosméticos, o triclosan atua como biocida, com múltiplos alvos citoplasmáticos e de membrana. Em concentrações mais baixas, no entanto, triclosan parece bacteriostático principalmente devido à inibição da síntese de ácidos graxos (PubChem Compound, 2017).

Um estudo realizado por Arango e colaboradores (2012) mostrou a atividade do triclosan e seus derivados contra formas amastigotas axênicas de *L. (V.) panamensis*.

1.2 Justificativa e relevância

Atualmente o arsenal terapêutico disponível para tratamento da leishmaniose tegumentar, assim como para outras parasitoses tropicais carece de medicamentos. Isso pode ser atribuído à heterogeneidade da doença, que é resultado da diversidade de espécies e da variação das respostas imunes no hospedeiro (Gil et al., 2007; OMS, 2010; Bastos et al., 2012), somado ao reduzido interesse do setor farmacêutico privado em desenvolver novos fármacos para essas doenças.

O tratamento da leishmaniose tegumentar exige a administração de fármacos tóxicos por via sistêmica por longos períodos (OMS, 2010). Devido aos efeitos adversos, muitos pacientes abandonam o tratamento gerando, recidivas. Em geral, a busca por alternativas terapêuticas é de grande relevância, pois pode contribuir para o aumento da qualidade de vida dos pacientes, possibilitando a regeneração dos tecidos lesados de forma mais rápida e eficiente e reduzindo o período de internação hospitalar (Penna et al., 2011; Veiga, 2012).

Com base na atividade anti-*Leishmania* já apresentada por amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan, estes foram selecionados no presente estudo para avaliar o potencial anti-*L. (L.) amazonensis* (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*), bem como as associações terapêuticas e possível modo de ação leishmanicida destes fármacos.

2. Objetivos

2.1 Gerais

Avaliar a atividade anti-*L. (L.) amazonensis* dos fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, bem como estudar o efeito *in vitro* e/ou *ex vivo* da associação destes fármacos com os fármacos padrões usados na terapia da leishmaniose e investigar *in vitro* os mecanismos de ação leishmanicida dos fármacos amitriptilina e triclosan.

2.2 Específicos

- Avaliar *in vitro* e *ex vivo* a atividade anti-*L. (L.) amazonensis* dos fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan, determinando-se a Concentração Efetiva 50% em formas promastigotas e amastigotas intracelulares.
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade em células de mamíferos e determinar o Índice de Seletividade dos fármacos já mencionados frente à *L. (L.) amazonensis*.
- Avaliar *in vitro* os mecanismos de ação dos fármacos amitriptilina e triclosan em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por meio da investigação dos seguintes parâmetros: i) integridade da membrana plasmática, ii) potencial de membrana mitocondrial, iii) produção de espécies reativas de oxigênio e iv) alterações ultraestruturais.

- Avaliar o efeito da associação *in vitro* e/ou *ex vivo* dos fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan com os fármacos anfotericina B e/ou miltefosina em promastigotas e/ou amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.
- Avaliar a eficácia dos fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan frente ao tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, utilizando diferentes doses e/ou vias de administração, como via tópica e/ou via sistêmica.

3. Material e métodos

3.1 Reagentes e compostos sintéticos

Dimetilsulfóxido (DMSO) e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck. Anfotericina B e isofluorano foram adquiridos da Cristália. Soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Gibco. Higromicina B, iodeto de propídeo, rodamina 123 e H₂DCF-DA foram adquiridos da Molecular Probes® (Invitrogen). VivoGlo™ Luciferin e One-Glo Luciferase foram adquiridos da Promega. Meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640), meio 199 (M-199), salina tamponada com fosfato (PBS), Solução Balanceada de Hank's (HBSS), brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazólio (MTT), cianeto de carbonil-4- (trifluorometoxi) fenil-hidrazona (FCCP), amitriptilina e miltefosina foram adquiridos da Sigma. Nitrato de econazol foi doado pela farmacêutica Bayer (Brasil). Os fármacos sertralina e triclosan foram fornecidos gentilmente pelo prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz (Universidade de São Paulo, SP), bem como as formulações tópicas. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma.

3.2 Parasitos, células de mamífero e animais de experimentação

3.2.1 *Leishmania (L.) amazonensis*

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de linhagem selvagem (La) (MHOM/BR/1973/M2269) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de SFB e 0,25% de hemina, sob temperatura de 24 °C. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de linhagem mutante expressora de luciferase (LaLuci) foram cultivados sob a mesma temperatura em meio M-199 suplementado com 32 µg/mL de higromicina B. As cepas utilizadas neste estudo foram fornecidas gentilmente pela profa. Dra. Silvia R. B. Uliana (Universidade de São Paulo, SP). A manutenção das cepas foi

realizada mensalmente em fêmeas de camundongos BALB/c (*Mus musculus*) com infecção de 1×10^6 promastigotas por animal, via intradérmica no coxim plantar da pata esquerda traseira ou base da cauda. Após o estabelecimento das lesões, a recuperação da cepa foi realizada através do aspirado da lesão para obtenção de amastigotas purificados (Reimão et al., 2014).

3.2.2 Células de mamíferos

Monócitos provenientes de medula óssea (fêmures) foram coletados de camundongos BALB/c fêmeas, após eutanásia. Com o auxílio de uma seringa com meio R2030 (50% de RPMI, 30% de sobrenadante de cultura de NCTC clone L929 e 20% SFB) e agulha, foram realizadas as lavagens do canal medular dos fêmures. Em seguida, as células foram acondicionadas em placa de Petri com meio R2030 por sete dias a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Ao final de sete dias, as células foram lavadas, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas (Reimão et al., 2014).

A linhagem de células utilizadas no teste de citotoxicidade foi a de fibroblastos de mamíferos, NCTC clone 929, proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC CCL1), fornecida gentilmente pela Seção de Culturas Celulares (Instituto Adolfo Lutz, SP), foram armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer -70 °C e posteriormente mantidas em meio RPMI suplementado com 10% SFB, sob a temperatura de 37 °C em estufa com 5% de CO₂.

3.2.3 Animais de experimentação

Camundongos com idade de 3 a 4 semanas foram obtidos do Biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e do Biotério de Experimentação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad*

libitum. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos, manutenção das cepas e nos estudos experimentais. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL 04-2016).

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

Os fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan foram dissolvidos em DMSO e os fármacos anfotericina B e miltefosina foram dissolvidos em água mili-Q estéril. Posteriormente foram diluídos em meio de cultura e incubados com parasitos em diferentes concentrações (concentrações iniciais de 60 µM para amitriptilina e econazol, 10 µM para sertralina e 200 µM para triclosan) com o objetivo de determinar as respectivas Concentrações Efetiva 50% (CE₅₀). A CE₅₀ dos fármacos foi determinada utilizando promastigotas de *La* na concentração de 1×10⁶ parasitos/poço em placas de 96 poços contendo os fármacos diluídos seriadamente (base 2), utilizando meio M-199 suplementado com 10% SFB e 0,25% de hemina. Após um período de 48 horas, a leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de 570 nm, e a viabilidade dos promastigotas foi verificada através da atividade mitocondrial pelo ensaio com MTT (Tada et al., 1986). Os fármacos anfotericina B (concentração inicial de 1 µM) e miltefosina (concentração inicial de 100 µM) foram utilizados como controle positivo do ensaio (100% morte) (Mesquita et al., 2013). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos, calculando a média e o desvio padrão entre os experimentos.

3.4 Determinação *ex vivo* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos estudados

Também foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* dos fármacos em macrófagos infectados com amastigotas intracelulares através da quantificação da produção de luz e contagem microscópica (i) ou apenas da contagem microscópica (ii), conforme descrito a seguir:

(i) Os macrófagos derivados de medula óssea, foram semeados na concentração de 4×10^5 macrófagos/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis por 24 horas e infectados com LaLuci na proporção 20:1 promastigotas/macrófago por 4 horas. Posteriormente foram lavados e tratados com os fármacos anfotericina B (concentração inicial de 0,2 μ M), amitriptilina (concentração inicial de 120 μ M), miltefosina (concentração inicial de 100 μ M) e sertralina (concentração inicial de 20 μ M) por 48h em estufa a 33 °C e 5% CO₂. A CE₅₀ foi determinada pela contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando o número de macrófagos tratados e infectados, mantendo como controles macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com os fármacos padrão. Concomitantemente a este experimento, macrófagos também foram cultivados na concentração de 1×10^5 macrófagos/poço em microplacas de 96 poços, infectados com LaLuci na proporção de 20:1 promastigotas/macrófago por 4 horas, lavados e tratados com os fármacos por 48h nas mesmas condições. A CE₅₀ foi determinada pela detecção enzimática por meio do ensaio One-Glo Luciferase (Reimão et al., 2013). O meio de cultura foi cuidadosamente removido e substituído por 80 μ L de PBS e 20 μ L do reagente One-Glo Luciferase à temperatura ambiente sob constante homogeneização circular. As unidades de luminescência foram determinadas imediatamente após adição do substrato em um leitor POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). A leitura da luminescência de macrófagos não infectados foi utilizada como basal. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com os fármacos padrão foram usados como controle. Os ensaios foram

realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos, calculando a média e desvio padrão entre os experimentos.

(ii) 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. Os macrófagos de peritônio foram semeados 1×10^5 macrófagos/poço em placas de 16 poços (NUNC®) e foram incubados por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram infectados com promastigotas na proporção de 10:1 promastigotas (LaLuci)/macrófago por 3 horas em estufa 33° com 5% de CO₂. Posteriormente, os macrófagos infectados foram lavados e tratados com os fármacos econazol (concentração inicial de 40 µM), triclosan (concentração inicial de 60 µM) e miltefosina (concentração inicial de 100 µM) que foram seriadamente diluídos e incubados por 48 horas sob as mesmas condições. Ao final do ensaio, os poços foram retirados e a lâmina foi fixada em metanol por 6 minutos, corada com Giemsa por um minuto e observada em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 200 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 anfotericina B (100% de morte dos amastigotas). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.5 Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade dos fármacos foi avaliada utilizando células NCTC clone L929. As células foram semeadas utilizando 6×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas com os fármacos (concentração inicial de 300 µM para todos os fármacos) por 48 horas (Oliveira et al., 2012). A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (Tada et al., 1986). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos, calculando a média e desvio padrão entre os

experimentos. Como controle do ensaio, foram utilizadas células não tratadas; e como controle positivo do ensaio, foram utilizadas células tratadas com fármaco padrão.

O Índice de Seletividade (IS) foi avaliado por meio da seguinte razão: IS: CE₅₀ em células de mamíferos / CE₅₀ em amastigotas intracelulares.

3.6 Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas *L. (L.) amazonensis*

Os possíveis danos causados pelos fármacos amitriptilina e triclosan em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram avaliados por meio de diferentes métodos, como descritos a seguir:

3.6.1 Alteração da integridade da membrana plasmática

Para avaliar a integridade da membrana plasmática, foi utilizado iodeto de propídeo, uma sonda que ao se ligar aos ácidos nucleicos, tem sua fluorescência aumentada. Isso acontece quando ocorre a ruptura da membrana da célula, que permite a entrada do iodeto de propídeo e sua ligação ao DNA (Scariot et al., 2017).

O possível efeito dos fármacos amitriptilina e triclosan sobre a membrana plasmática dos parasitos foi avaliado utilizando seus respectivos valores de CE₅₀. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram lavadas e incubadas (2×10^6 parasitos/poço) em HBSS contendo 5 µg/mL de iodeto de propídeo em placa preta por 15 minutos no escuro a 24 °C (Tempone et al., 2017). Em seguida, os fármacos e os controles foram adicionados à placa. O aumento da fluorescência foi mensurado a cada 10 minutos, durante um total de 30 minutos (triclosan) e 60 minutos (amitriptilina), utilizando um espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 MultiMode Microplate Read) com filtro de excitação de 525 nm e emissão de 625 nm (Machado, 2017). A fluorescência obtida a partir de parasitos não

tratados foi utilizado como basal. Como controle positivo utilizou-se o detergente Triton-X 0,5%, para obtenção da permeabilização máxima (Kulkarni et al., 2009). Além disso, controles internos contendo apenas os fármacos em estudo foram testados para verificar possível fluorescência dos fármacos. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.6.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando a rodamina 123, que é uma sonda catiônica sem efeitos citotóxicos, permeável à célula, e que é facilmente sequestrada por mitocôndrias ativas. Esta sonda tem sido amplamente utilizada para avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Angrimani et al., 2015).

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram lavadas e incubadas (2×10^6 parasitos/poço) em HBSS com os fármacos amitriptilina e triclosan utilizando seus respectivos valores de CE_{50} durante 30 (amitriptilina e triclosan) e 60 minutos (amitriptilina) a 24 °C. Após esse período de incubação com os fármacos, os parasitos foram marcados com rodamina 123 na concentração de 0,3 µg/mL e foram incubados por mais 10 minutos no escuro a 37 °C (Tempone et al., 2017). Em seguida, os parasitos foram lavados com HBSS e a leitura foi realizada utilizando citometria de fluxo (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer ThermoFisher Scientific) com filtro de excitação de 488 nm, analisando 10.000 eventos por meio do software Attune Nxt®. Como controle do experimento, utilizou-se parasitos não marcados com rodamina 123 e não tratados. Como controle positivo de despolarização do potencial de membrana mitocondrial, utilizou-se parasitos tratados com FCCP 20 µM e como controle de despolarização mitocondrial basal, utilizou-se parasitos não tratados (Fonseca-Silva et al., 2011; Tempone et al., 2017). Além disso, controles internos apenas com os fármacos em estudo foram testados para verificar possível fluorescência dos fármacos. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo

menos dois ensaios distintos, calculando a média e desvio padrão entre as duplicatas.

3.6.3 Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, uma sonda não fluorescente H₂DCF-DA foi utilizada. Esta sonda se torna fluorescente após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação.

Formas promastigotas foram lavadas e incubadas (2×10^6 parasitos/poço) em HBSS com os fármacos amitriptilina e triclosan utilizando seus respectivos CE₅₀ durante 30 (triclosan) e 60 minutos (amitriptilina) a 24 °C. Após esse período de incubação com os fármacos, os parasitos foram marcados com a sonda H₂DCF-DA na concentração de 5 µM e foram incubados por mais 15 minutos no escuro a 24 °C. Posteriormente, a leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (Mesquita, 2013). Como controle negativo, parasitos não tratados foram utilizados. Como controle positivo, foram utilizadas promastigotas tratadas com azida sódica (10 mM) (Duarte et al., 2016). Além disso, controles internos contendo apenas os fármacos em estudo, foram testados para verificar possível fluorescência dos fármacos. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos.

3.6.4 Estudo das alterações ultraestruturais

Para avaliar as alterações ultraestruturais causadas pelos fármacos amitriptilina e triclosan, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram lavadas em meio M-199 e incubadas (2×10^7 promastigotas/poço) com os fármacos na concentração dos respectivos valores de CE₅₀ à 24 °C. Para avaliar os danos causados pelo fármaco triclosan, o tempo de incubação foi de 15 minutos, já os tempos de incubação com o fármaco amitriptilina foram de 15,

30 e 60 minutos. Em seguida, os parasitos foram lavados e fixados em solução de glutaraldeído 4%, pós-fixados em tetróxido de ósmio por 30 minutos, gradualmente desidratados em etanol e incluídos em resina Epon 812 (Duarte et al., 1992). O material foi analisado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL) no Instituto Adolfo Lutz. Os controles utilizados neste experimento constituíram-se de parasitos não tratados e parasitos tratados com DMSO (Mesquita, 2013).

3.7 Determinação *in vitro* e *ex vivo* das associações entre os fármacos estudados e os fármacos padrões

Os fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan foram associados *in vitro* e/ou *ex vivo* com fármacos padrões anfotericina B e/ou miltefosina e a natureza das associações foi avaliada em formas promastigotas e/ou amastigotas intracelulares utilizando-se o método de isoblograma de proporções fixas modificado (Fivelman et al., 2004, Reimão e Tempone, 2011). Para cada associação, os valores de CE_{50} de cada fármaco isolado foram previamente determinados, como descritos anteriormente. As CE_{50} foram usadas para determinar as concentrações máximas dos fármacos individuais, assegurando que a CE_{50} estivesse no ponto médio da diluição seriada (base 2). Os fármacos estudados foram dissolvidos em seus respectivos solventes e diluídos em meios de cultura. As concentrações foram preparadas nas seguintes proporções de fármaco estudado e fármaco padrão: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, em placas de 96 poços e/ou 16 poços, em duplicata. Como controles, foram usados dois poços ao final de cada placa contendo parasitos não tratados.

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; Somatório da Concentração Inibitória Fracionária ($\sum CIF$) = CIF do fármaco A + CIF do fármaco B; Média do Somatório da Concentração Inibitória Fracionária ($X\sum CIF$) = somatório das $\sum CIF$ / 4; sendo que a $X\sum CIF$ foi utilizada para classificar as

associações dos fármacos avaliados. Quando a $X\Sigma$ CIF foi menor ou igual a 0,5, a associação foi considerada sinérgica; quando foi maior que 0,5 e menor ou igual a 4, a associação foi considerada aditiva ou indiferente e quando foi maior que 4, a associação foi considerada antagônica (Odds, 2003). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram feitos pelo menos dois ensaios distintos, calculando a média e o desvio padrão entre os experimentos.

3.8 Avaliação da eficácia dos fármacos em camundongos infectados

Para avaliar a eficácia dos fármacos *in vivo* foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c (pesando de 18-22 g) previamente infectadas com LaLuci. Para isso, 1×10^6 promastigotas em fase estacionária foram inoculados via intradérmica na base da cauda ou no coxim plantar (volume final 20 μ L), utilizando quatro ou cinco animais por grupo. Após cinco semanas do inóculo, quando já havia se estabelecido endurecimento da lesão ou presença de tumor da lesão ou pequena úlcera, as lesões foram medidas, os animais foram distribuídos em grupos de forma homogênea e o tratamento foi iniciado (Miguel, 2011; Trinconi et al., 2016). Os fármacos testados neste estudo foram amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan, por via tópica e/ou via sistêmica.

A progressão da doença foi avaliada a cada sete dias, com medidas em mm utilizando um paquímetro (MARBERG). O tamanho da lesão foi mensurado através da diferença entre a medida da espessura do coxim plantar da pata infectada e da pata sadia (quando infectados na pata), e através do volume da lesão da cauda (quando infectados na cauda). O peso corpóreo de cada animal também foi avaliado semanalmente, para controle interno dos experimentos.

A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da quantificação da carga parasitária obtida por bioimageamento (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences). Para a produção de luz, os animais receberam 75 mg/kg de luciferina (IP) (VivoGlo Luciferin, Promega) e foram anestesiados com

isofluorano 2,5 % (via inalatória). Em seguida, foram transferidos para a câmara de imagem sob anestesia de isofluorano 1,5 %. Após 20 minutos de administração de luciferina, os animais foram submetidos ao bioimageamento. A emissão de fótons foi registrada usando o modo de alta resolução e a emissão total de fótons foi estabelecida em uma região de interesse (ROI) definida no local da lesão. O mesmo ROI foi estabelecido para todos os animais (Reimão et al., 2013). Os valores foram expressos em número de fótons por segundo por centímetro quadrado por esterradiano (fótons/s/cm²/sr), utilizando o software Living Image, Versão 4.3.1 (Caliper Life Sciences) (Reimão et al., 2013).

3.8.1 Esquema de tratamento com amitriptilina

Os animais foram inoculados na base da cauda com LaLuci, conforme descrito anteriormente e distribuídos em dois grupos contendo quatro animais por grupo. Os animais foram tratados com amitriptilina na dose de 15 mg/kg/dia por via oral (VO), administrados uma vez ao dia por 14 dias consecutivos. A dose escolhida foi baseada na dose já utilizada na clínica para tratar depressão, que varia de 75 a 150 mg/kg/dia (via oral) dependendo da necessidade do paciente; já a escolha do esquema de administração teve como base a meia vida plasmática, que varia de 10 a 50 horas, com média de 15 horas (Drugs, 2017; DrugBank, 2017). Com base nesses dados encontrados na literatura, usou-se um cálculo de conversão de doses, de acordo com Reagan-Shaw e colaboradores (2008), para converter a dose usada em humanos para a dose equivalente em animais. O fármaco foi solubilizado em água filtrada e a administração do fármaco foi realizada com o auxílio de uma agulha de gavagem curva em aço inox para camundongos, utilizando volume final de 100 µL. Um grupo que não recebeu tratamento foi utilizado como controle do experimento. Um grupo tratado apenas com o veículo (água filtrada), já havia sido testado anteriormente e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo não tratado. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 14 dias do

início do tratamento e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

3.8.2 Esquemas de tratamento com econazol

No experimento utilizando econazol, os animais foram inoculados na base da cauda, distribuídos em quatro grupos contendo cinco animais por grupo e o fármaco foi solubilizado em uma solução (veículo) composta por 15% de cremofor, 10% de etanol e 75% de PBS como descrito por Ferreira (2014). Testes com animais infectados e tratados apenas com veículo já haviam sido realizados anteriormente, sem nenhuma diferença estatística em relação ao grupo não tratado. A escolha das doses foi baseada no estudo realizado por Gupta e colaboradores (2015). Um grupo que não recebeu tratamento foi utilizado como controle do experimento. Os demais grupos foram tratados com 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO), administrados uma vez ao dia por 28 dias. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 28 dias do início do tratamento e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

3.8.3 Esquemas de tratamento com sertralina

Três experimentos foram realizados utilizando sertralina por diferentes vias e doses. A dose de sertralina usada na clínica para tratar depressão pode variar de 50 a 200 mg/kg/dia (via oral) dependendo da necessidade do paciente e sua meia vida plasmática é de aproximadamente 25 horas (Drugs, 2017; DrugBank, 2017). Com base nesses dados optou-se por converter a dose humana para a dose equivalente no modelo animal, utilizando os cálculos de conversão de acordo com Reagan-Shaw e colaboradores (2008). No primeiro experimento, os animais foram inoculados com LaLuci no coxim plantar da pata esquerda traseira e o fármaco foi solubilizado em água estéril. Testes com animais infectados e tratados

apenas com veículo já haviam sido realizados anteriormente, sem nenhuma diferença em relação ao grupo não tratado. Os animais foram tratados com 20 doses, administrados uma vez ao dia durante 28 dias, com intervalos de dois dias a cada cinco dias de tratamento. Os animais foram distribuídos em cinco grupos, com quatro animais em cada grupo e receberam as seguintes doses: 30 mg/kg/dia (VO), 30 mg/kg/dia (IP), 10 mg/kg/dia (VO) e 10 mg/kg/dia (IP). Um grupo sem tratamento também foi utilizado como controle. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 28 dias do início do tratamento e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

No segundo experimento, os animais também foram inoculados com LaLUC no coxim plantar da pata esquerda traseira e o fármaco sertralina foi solubilizado em água estéril. Os animais foram tratados por 14 dias consecutivo, distribuídos em três grupos, com cinco animais em cada grupo e receberam as seguintes doses: sertralina 40 mg/kg/dia (VO) e sertralina 30 mg/kg/dia (VO). Um grupo sem tratamento foi utilizado como controle. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 14 dias do início do tratamento e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

No terceiro experimento, este utilizando formulações tópicas, os animais foram inoculados na base da cauda com a finalidade de facilitar a administração da formulação e dificultar sua retirada pelos animais. Os animais foram distribuídos em três grupos contendo quatro animais por grupo e acondicionados individualmente em caixas contendo papel absorvente estéril. Em relação às formulações, um creme base (polawax 4%, propilenoglicol 4%, EDTA 0,05%, metilparabeno 0,015%, propilparabeno 0,05%, ácido caprílico 1%, e água miliQ QSP) foi preparado contendo miristato de isopropila 5%, agente que favorece a permeação do fármaco na pele, ou seja, uma formulação creme base com agente permeante. Estas formulações foram preparadas e fornecidas pelo prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz (Universidade de São Paulo, SP). Os animais foram tratados duas vezes ao dia por 28 dias consecutivos. Um grupo sem tratamento foi

utilizado como controle do experimento e outro grupo recebeu apenas tratamento com creme base com agente permeante, como controle de veículo. Outro grupo recebeu tratamento com creme base com agente permeante contendo sertralina 1%. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 28 dias do início do tratamento e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

3.8.4 Esquemas de tratamento com triclosan

Dois experimentos foram realizados utilizando formulações com triclosan.

No primeiro experimento, o esquema de tratamento foi realizado com as mesmas formulações creme base descritas anteriormente, porém as formulações não continham o agente permeante (miristato). Duas formulações foram testadas neste experimento: i) uma formulação creme base sem agente permeante (utilizada como controle de veículo) e ii) uma formulação creme base sem agente permeante contendo triclosan 1%. Os animais foram infectados com *L. (L.) amazonensis*, na base da cauda e distribuídos em três grupos contendo quatro animais por grupo, onde foram acondicionados individualmente, como já descrito. Na literatura, encontram-se formulações utilizando triclosan até 1%, por isso essa porcentagem foi escolhida (DrugBank, 2017). Os animais foram tratados uma vez ao dia por 14 dias consecutivos. Um grupo não tratado foi utilizado como controle do experimento. A eficácia do tratamento foi avaliada por bioimageamento após 14 dias e a progressão da doença foi avaliada semanalmente, utilizando paquímetro.

No segundo experimento, foram utilizados animais sadios para avaliar possível dano causado pela formulação creme base sem agente permeante contendo triclosan 1%. Como controles, um grupo não tratado e um grupo tratado apenas com formulação creme base sem agente permeante (controle de veículo) foram utilizados. Os animais receberam tratamento uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. O peso corpóreo

de cada animal também foi avaliado semanalmente, para correlacionar à possível toxicidade da formulação. Após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados e foi realizada necropsia e colheita de fragmentos de baço, fígado, rim, pulmão, coração e cauda. Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas e encaminhados ao Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz para realização dos exames anatomopatológicos (Tempone et al., 2017). Primeiramente, foi feita a macroscopia, com relato dos fragmentos recebidos e suas medidas, e posicionamento dos mesmos em cassetes histológicos. Posteriormente, o material foi processado histologicamente, em concentrações crescentes de álcool e xilol, para posterior inclusão em bloco de parafina. Os blocos passaram por microtomia para obtenção de cortes com 3 μm de espessura, que foram colocados em lâminas de vidro e corados por hematoxilina-eosina. Realizou-se a avaliação histopatológica, com descrição das principais lesões, caracterização dos processos inflamatórios por tipo celular envolvido e intensidade.

3.9 Análises estatísticas

A CE_{50} dos fármacos testados foi determinada por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5.0. Diferenças entre amostras foram comparadas com controles e estatisticamente avaliadas através do teste t de Student (*Mann Whitney test*) ou One-way ANOVA (*Tukey's Multiple Comparison Test*) para determinação do valor de p. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. Resultados

4.1 Determinação da atividade anti-*Leishmania* (*in vitro* e *ex vivo*) e citotoxicidade

A atividade dos fármacos testados contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi determinada pelo método colorimétrico de MTT. Após 48 horas de incubação, todos os fármacos testados apresentaram 100% de morte dos parasitos na concentração máxima testada e apresentaram valores de CE_{50} que variaram 0,11 a 51,48 μM , sendo anfotericina B (fármaco padrão) e sertralina os fármacos mais ativos, enquanto que triclosan foi o fármaco menos ativo contra promastigotas (**Tabela 1**).

Todos os fármacos testados apresentaram atividade contra formas amastigotas intracelulares. Duas metodologias foram aplicadas para determinar a CE_{50} dos fármacos anfotericina B, amitriptilina, miltefosina e sertralina: contagem de macrófagos tratados e infectados sob microscopia óptica e método de detecção de luminescência utilizando parasitas que expressam luciferase. Ambas as metodologias mostraram resultados semelhantes, conforme apresentado na **Tabela 1**. Dentre os fármacos testados, anfotericina B e sertralina se apresentaram mais ativos, com valores próximos de 0,02 e 4 μM , respectivamente, enquanto triclosan e amitriptilina se mostraram menos ativos, com valores próximos de 16 e 24 μM (**Tabela 1**).

A citotoxicidade dos fármacos frente às células NCTC foi determinada após 48 horas de tratamento pelo método de MTT. Todos os fármacos apresentaram citotoxicidade, sendo sertralina o fármaco que apresentou o menor valor de CE_{50} 18,79 μM (maior citotoxicidade) e anfotericina B o maior valor CE_{50} 248,75 μM (menor citotoxicidade). Considerando a relação entre atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade em células de mamífero, pode-se observar que amitriptilina apresentou o maior Índice de Seletividade dentre os fármacos testados, com valor superior a 5. Os fármacos padrões (anfotericina B e miltefosina) também foram incluídos

nos ensaios de citotoxicidade, sendo que anfotericina B e miltefosina mostraram Índice de Seletividade superior aos demais fármacos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores de CE₅₀ e IS dos fármacos estudados e fármacos padrões contra *Leishmania (L.) amazonensis* e células de mamíferos NCTC clone 929.

fármacos	CE ₅₀ (µM) ± DP				
	promastigotas	amastigotas ^a	amastigotas ^b	NCTC	IS
amitriptilina	7,30 ± 1,22	24,80 ± 0,84	21,93 ± 5,81	130,25 ± 2,47	5,25
econazol	8,86 ± 0,38	14,39 ± 3,57	ND	31,17 ± 8,33	2,17
sertralina	1,50 ± 0,42	4,55 ± 0,27	3,17 ± 0,77	18,79 ± 5,51	4,13
triclosan	51,48 ± 5,98	16,58 ± 5,75	ND	57,04 ± 5,40	3,44
anfotericina B	0,11 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	248,75 ± 7,71	14214,29
miltefosina	12,38 ± 3,96	6,01 ± 1,46	4,33 ± 0,86	157,45 ± 24,11	26,20

CE₅₀: concentração efetiva 50%; DP: desvio padrão; IS: Índice de seletividade (razão entre CE₅₀ em células NCTC e CE₅₀ em amastigotas intracelulares determinado por contagem de macrófagos tratados e infectados); ND: não determinado; ^aensaio de amastigotas intracelulares determinado por contagem de macrófagos tratados e infectados; ^bensaio de amastigotas intracelulares determinado por luminescência.

4.2 Amitriptilina

Com base nos resultados mostrados na **Tabela 1**, pode-se observar que o fármaco amitriptilina foi o fármaco que apresentou maior índice de seletividade dentre os fármacos avaliados neste trabalho. Diante disso este fármaco foi selecionado para realização de outros estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

4.2.1 Avaliação do mecanismo de ação em *L. (L.) amazonensis*

4.2.1.1 Alteração da integridade da membrana plasmática

A avaliação da integridade da membrana plasmática foi realizada por meio da sonda iodeto de propídeo, visando avaliar se amitriptilina é capaz de induzir alterações na membrana plasmática parasitária durante os primeiros 60 minutos de incubação com o fármaco, uma vez que esta sonda se torna mais fluorescente quando é ligada ao DNA, indicando ruptura, poro ou alteração na integridade da membrana plasmática das células. A permeabilização máxima desse experimento foi obtida utilizando o detergente Triton-X 100, mostrando alteração significativa na membrana plasmática (**p < 0,0001) quando comparado às células não tratadas. Promastigotas não tratados foram usados como controle para obtenção da fluorescência basal. Durante as leituras realizadas a cada dez minutos, pode-se observar que o fármaco amitriptilina não apresentou aumento no influxo da sonda. Ocorreu um aumento não significativo de 3% na fluorescência após 60 minutos de incubação com amitriptilina quando comparado ao controle não tratado, mostrando que não houve alteração na integridade da membrana plasmática no período e nas condições avaliadas (**Figura 11**).

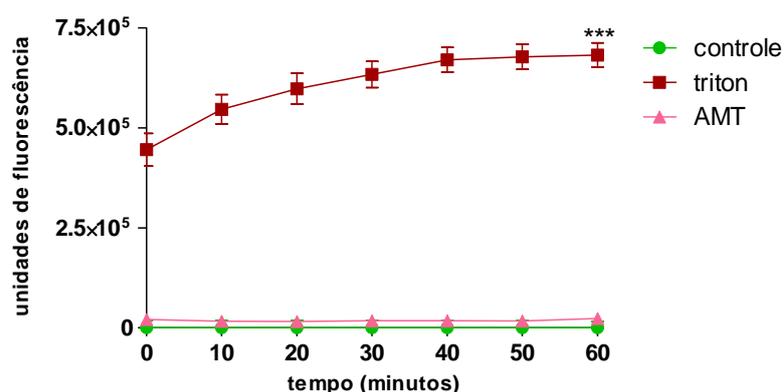


Figura 11: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento com amitriptilina, utilizando iodeto de propídeo. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina na concentração correspondente à CE₅₀ do fármaco. Controles contendo células não tratadas e células tratadas com Triton-X 100 foram utilizados. O valor de p é representado por *** (p < 0,0001) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. As barras representam a média e o desvio padrão das duplicatas de um ensaio representativo.

4.2.1.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foi utilizada a sonda rodamina 123 por meio de citometria de fluxo. Promastigotas tratados com amitriptilina na concentração correspondente ao seu CE₅₀ por 30 e 60 minutos foram avaliados, bem como parasitos não tratados (controle de mitocôndrias ativas, polarizadas) e parasitos tratados com FCCP (controle de despolarização do potencial de membrana mitocondrial). Parasitos não marcados também foram utilizados como controle interno do experimento. O fármaco amitriptilina mostrou redução de aproximadamente 90% de unidades de fluorescência nos dois períodos avaliados em relação aos parasitos não tratados (**p < 0,002; ***p < 0,0004), indicando que houve

despolarização do potencial de membrana mitocondrial após 30 e 60 minutos de incubação com amitriptilina. O controle positivo tratado com FCCP mostrou uma redução significativa de aproximadamente 85% em relação às células não tratadas (** $p < 0,002$; *** $p < 0,0004$) (**Figura 12**).

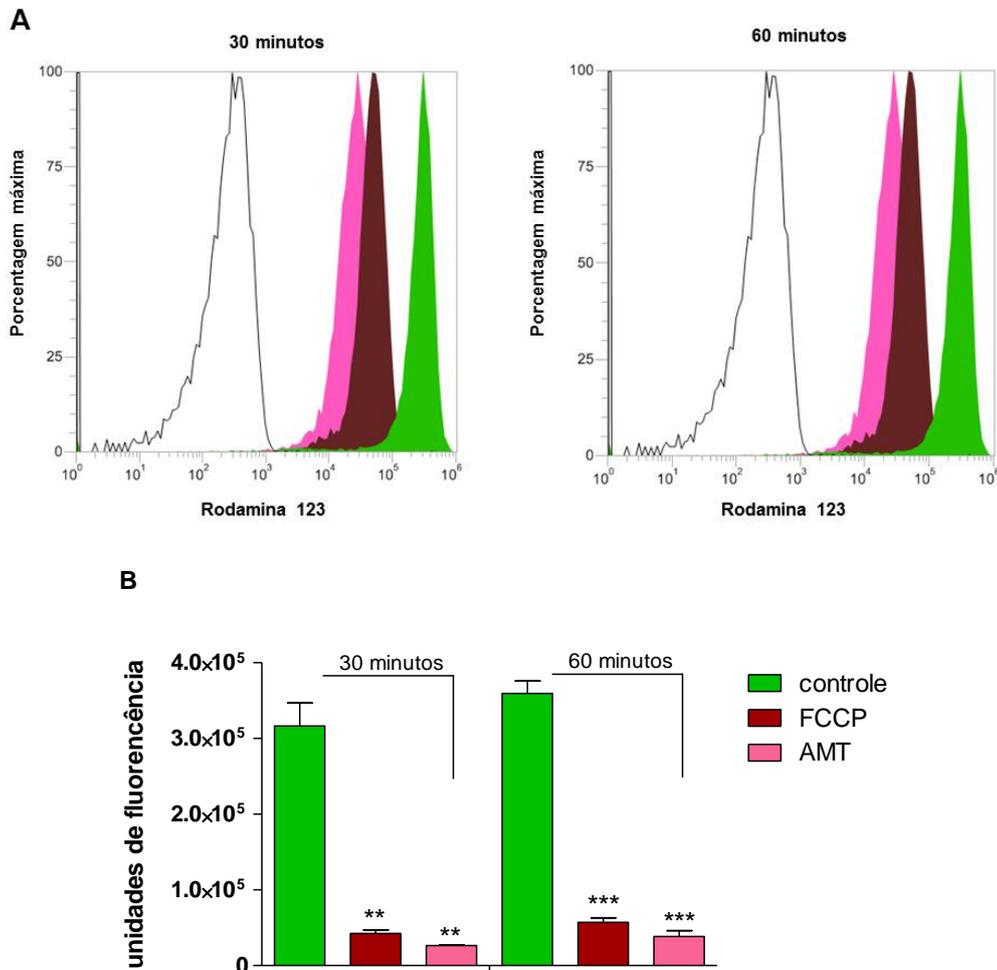


Figura 12: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial utilizando rodamina 123 por citometria de fluxo. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina na concentração correspondente ao CE₅₀ do fármaco por 30 e 60 minutos. Controles contendo parasitas não tratados e parasitos tratados com FCCP foram utilizados. Histograma mostrando em preto a fluorescência das células não tratadas e não marcadas; na cor verde as células não tratadas e marcadas; na cor vinho as células tratadas com FCCP e marcadas; na cor rosa as células tratadas com amitriptilina e marcadas, no

período de 30 e 60 minutos (A). Gráfico representando a média das unidades de fluorescência e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. O valor de p é representado por ** ($p < 0,002$) e *** ($p < 0,0004$) e indica diferença significativa em relação ao controle não tratado de 30 e 60 minutos (B). AMT: amitriptilina.

4.2.1.3 Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio foi usado a sonda H₂DCF-DA. Parasitos não tratados e parasitos tratados com azida sódica por 60 minutos foram usados como controles. O controle contendo parasitos não tratados foi usado para indicar a produção basal de espécies reativas de oxigênio. Já os parasitos tratados com azida sódica foram usados para representar as células com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, com aumento significativo em relação ao grupo controle (** $p < 0,0001$). Após a incubação com amitriptilina por 60 minutos, nota-se que as unidades de fluorescência permaneceram semelhantes às unidades de fluorescência das células não tratadas, ou seja, mostra que não houve aumento ou redução na produção de espécies reativas de oxigênio (**Figura 13**).

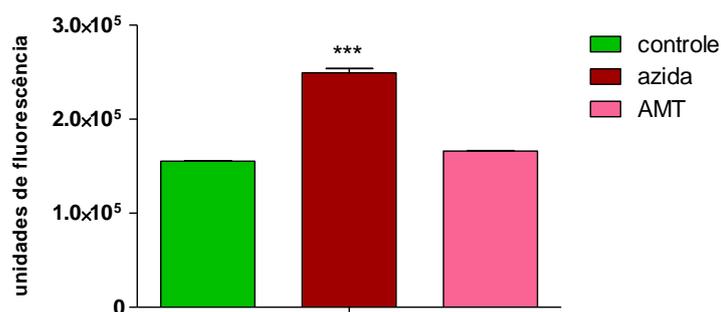


Figura 13: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda H₂DCF-DA. Formas promastigotas foram tratadas com amitriptilina no valor de CE₅₀ por 60 minutos. Controles com células não tratadas e células tratadas com azida sódica também foram utilizados. O valor de p é representado por *** (p<0,0001) e indica diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. AMT: amitriptilina.

4.2.1.4 Alterações ultraestruturais

Para avaliar as alterações ultraestruturais foram usadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com amitriptilina na concentração correspondente ao valor da CE₅₀ por 15, 30 e 60 minutos. Promastigotas não tratados foram utilizados como controle do experimento (**Figura 14 A**). Nota-se que as células não tratadas possuem núcleo (n), membrana plasmática (mp) e kinetoplasto (k) preservado. Na **Figura 14 B** são mostradas imagens representativas de promastigotas tratados com amitriptilina por 15 minutos. Pode-se observar que a mitocôndria e cristas do parasita estão alteradas, indicada pelas setas, a membrana plasmática parece não estar alterada e o formato celular encontra-se alterado, assemelhando-se ao formato ovóide característico de formas amastigotas. Na **Figura 14 C** e **D** são mostradas imagens de parasitos tratados com amitriptilina por 30 e 60 minutos, respectivamente, onde se nota que as

mitocôndrias estão aumentadas e que há aumento de restos de organelas dentro e fora das células.

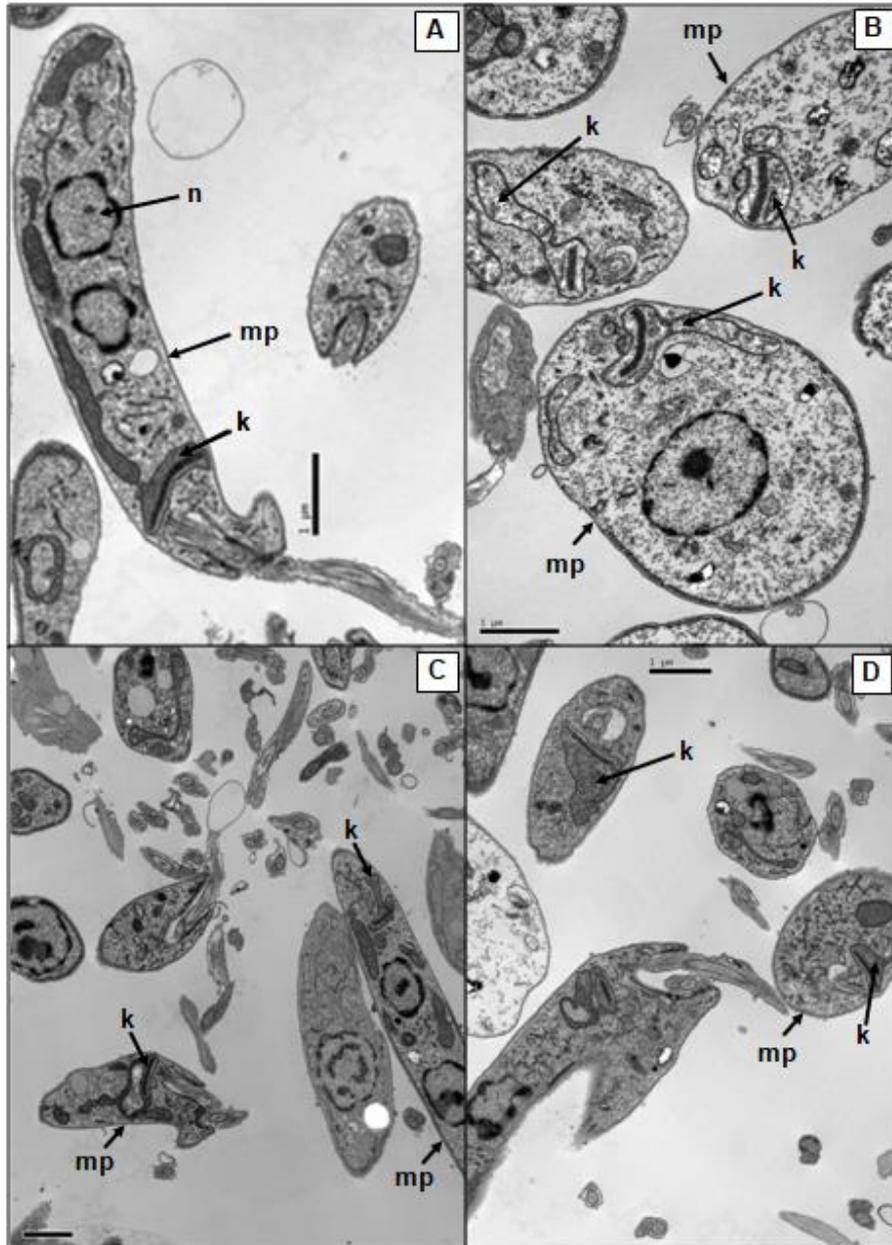


Figura 14: Análise ultraestrutural de promastigotas tratados com amitriptilina na concentração correspondente ao valor da CE_{50} por 15, 30 e 60 minutos. Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas não tratados (A: barra 1µm). Promastigotas tratados com amitriptilina por 15 minutos (B: barra 1µm), 30 minutos (C: barra 1µm) e 60 minutos (D: barra 1µm). k: kinetoplasto, n: núcleo e mp: membrana plasmática. Aumento 15.000X.

4.2.2 Associações entre amitriptilina e fármacos padrões

Após determinar a atividade *in vitro* e *ex vivo* de amitriptilina, e estudar o possível mecanismo de ação leishmanicida, foram realizados ensaios de associações terapêuticas com a finalidade de investigar a possibilidade de existência de sinergismo ou aditismo, antes de iniciar estudos experimentais em camundongos. As associações *in vitro* entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina foram avaliadas em formas promastigotas e amastigotas intracelulares utilizando o método do isoblograma de proporções fixas modificado, após 48 horas de incubação. Ao final de cada experimento de associação, foram geradas curvas dose-resposta, correspondendo às diferentes proporções em que os fármacos foram testados (5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5). As curvas obtidas a partir das associações entre os fármacos mencionados em formas promastigotas e amastigotas são mostrados nas **Figuras 15 e 16**, respectivamente.

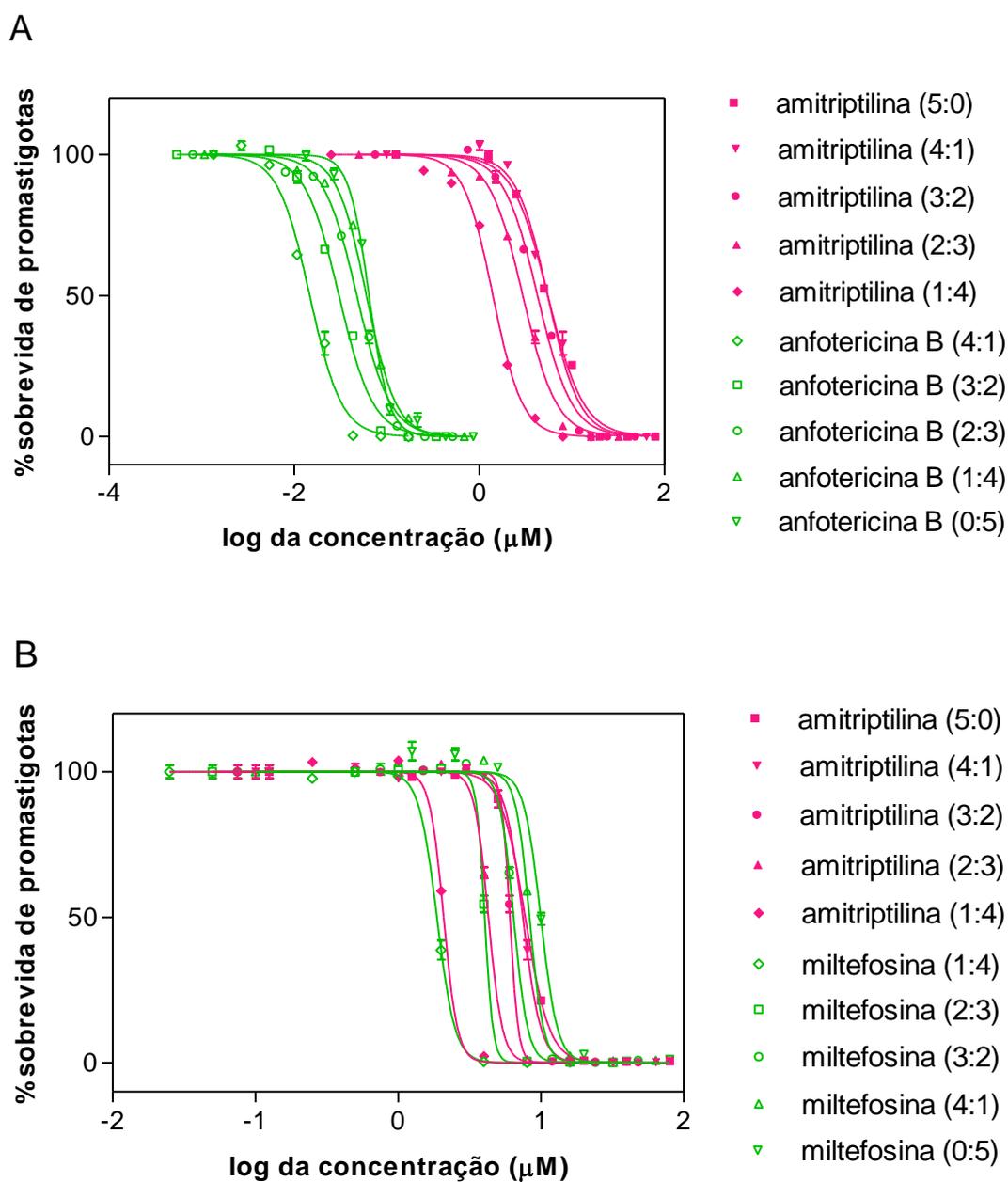


Figura 15: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre amitriptilina e os fármacos padrões anferocina B (A) e miltefosina (B) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo.

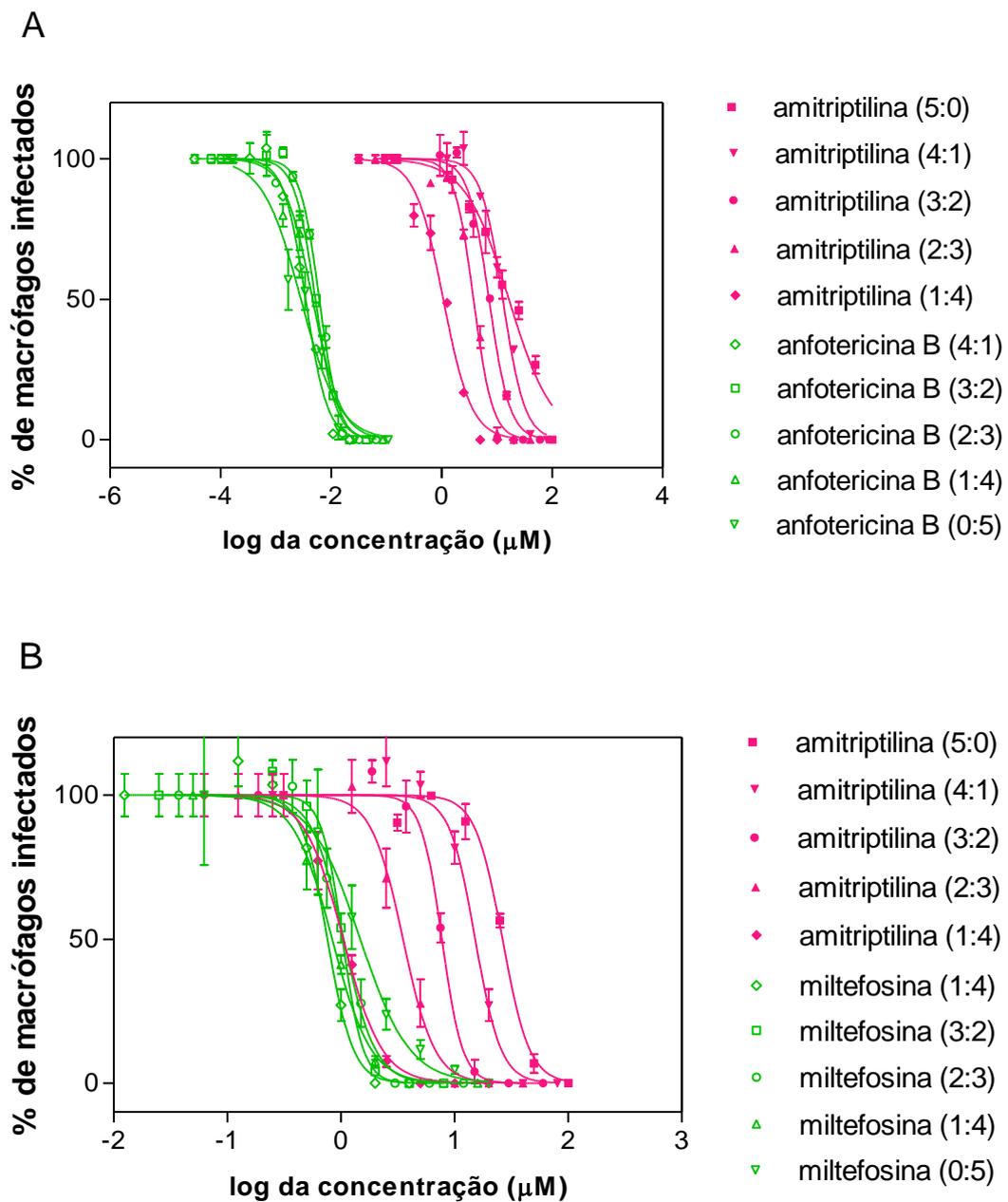


Figura 16: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre amitriptilina e fármacos padrões anferotricina B (A) e miltefosina (B) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo.

Na **Tabela 2** e **3**, pode-se observar que os valores de CE_{50} do fármaco “A” (amitriptilina) diminuíram conforme se aumentou a dose do fármaco “B” (anfotericina B e miltefosina) e vice-versa, sendo esse comportamento característico de interações classificadas como aditivas ou indiferentes. Baseando-se ainda nesses valores, foi possível calcular as CIF das associações, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF (**Tabelas 2** e **3**). Os valores de Σ CIF variaram de 1,01 a 2,29 e os valores de $X\Sigma$ CIF variaram de 1,03 a 1,78. De acordo com os valores de $X\Sigma$ CIF, que representam o comportamento geral da associação, as interações foram classificadas como aditivas ou indiferentes, mostrando valores entre 0,5 e 4 (**Tabelas 2** e **3**).

Tabela 2: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos associados		proporção		CE_{50} da associação (μ M) (\pm DP)		CIF da associação		Σ CIF	$X\Sigma$ CIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
amitriptilina	anfotericina B	5	0	6,73 \pm 1,73	-	-	-	-	
		4	1	5,98 \pm 0,69	0,02 \pm 0,01	0,89	0,33	1,22	
		3	2	4,36 \pm 0,15	0,03 \pm 0,00	0,65	0,50	1,15	
		2	3	2,82 \pm 0,19	0,05 \pm 0,01	0,42	0,83	1,25	
		1	4	1,29 \pm 0,17	0,06 \pm 0,01	0,19	1,00	1,19	
		0	5	-	0,06 \pm 0,00	-	-	-	1,20
amitriptilina	miltefosina	5	0	6,82 \pm 1,34	-	-	-	-	
		4	1	6,28 \pm 1,70	1,57 \pm 0,42	0,92	0,12	1,04	
		3	2	5,14 \pm 1,32	3,43 \pm 0,88	0,75	0,27	1,02	
		2	3	3,99 \pm 0,45	5,98 \pm 0,66	0,58	0,46	1,04	
		1	4	2,21 \pm 0,18	8,86 \pm 0,74	0,32	0,69	1,01	
		0	5	-	12,91 \pm 4,14	-	-	-	1,03

CE_{50} : Concentração Efetiva 50%; CIF: concentração inibitória fracionária; Σ CIF: somatório da concentração inibitória fracionária; $X\Sigma$ CIF: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP: desvio padrão.

Tabela 3: Valores de CE₅₀, CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos associados		proporção		CE ₅₀ da associação (µM) (±DP)		CIF da associação		Σ CIF	$X\Sigma$ CIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
amitriptilina	anfotericina B	5	0	21,26 ± 6,70	-	-	-	-	
		4	1	23,18 ± 14,59	0,01 ± 0,00	1,09	0,50	1,59	
		3	2	20,00 ± 18,05	0,01 ± 0,01	0,94	0,50	1,44	
		2	3	16,72 ± 18,28	0,03 ± 0,03	0,79	1,50	2,29	
		1	4	6,42 ± 7,56	0,03 ± 0,03	0,30	1,50	1,80	
		0	5	-	0,02 ± 0,03	-	-	-	1,78
amitriptilina	miltefosina	5	0	28,50 ± 2,93	-	-	-	-	
		4	1	27,78 ± 17,73	1,39 ± 0,89	0,97	0,64	1,61	
		3	2	17,58 ± 13,91	2,34 ± 1,85	0,62	1,07	1,69	
		2	3	9,57 ± 8,55	2,87 ± 2,56	0,34	1,32	1,66	
		1	4	3,32 ± 3,21	2,66 ± 2,57	0,12	1,22	1,34	
		0	5	-	2,18 ± 0,99	-	-	-	1,58

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CIF: concentração inibitória fracionária; Σ CIF: somatório da concentração inibitória fracionária; $X\Sigma$ CIF: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP: desvio padrão.

Os isobogramas obtidos a partir da associação entre amitriptilina e os fármacos padrões são apresentados nas **Figuras 17 e 18**. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4 (linha pontilhada), mostrando que valores menores ou iguais a 0,5 são considerados sinérgicos, enquanto que valores entre 0,5 e 4 são considerados aditivos ou indiferentes e valores maiores do que 4 são considerados antagônicos. Considerando essa classificação mais conservadora, não foi observado sinergismo em nenhuma das associações.

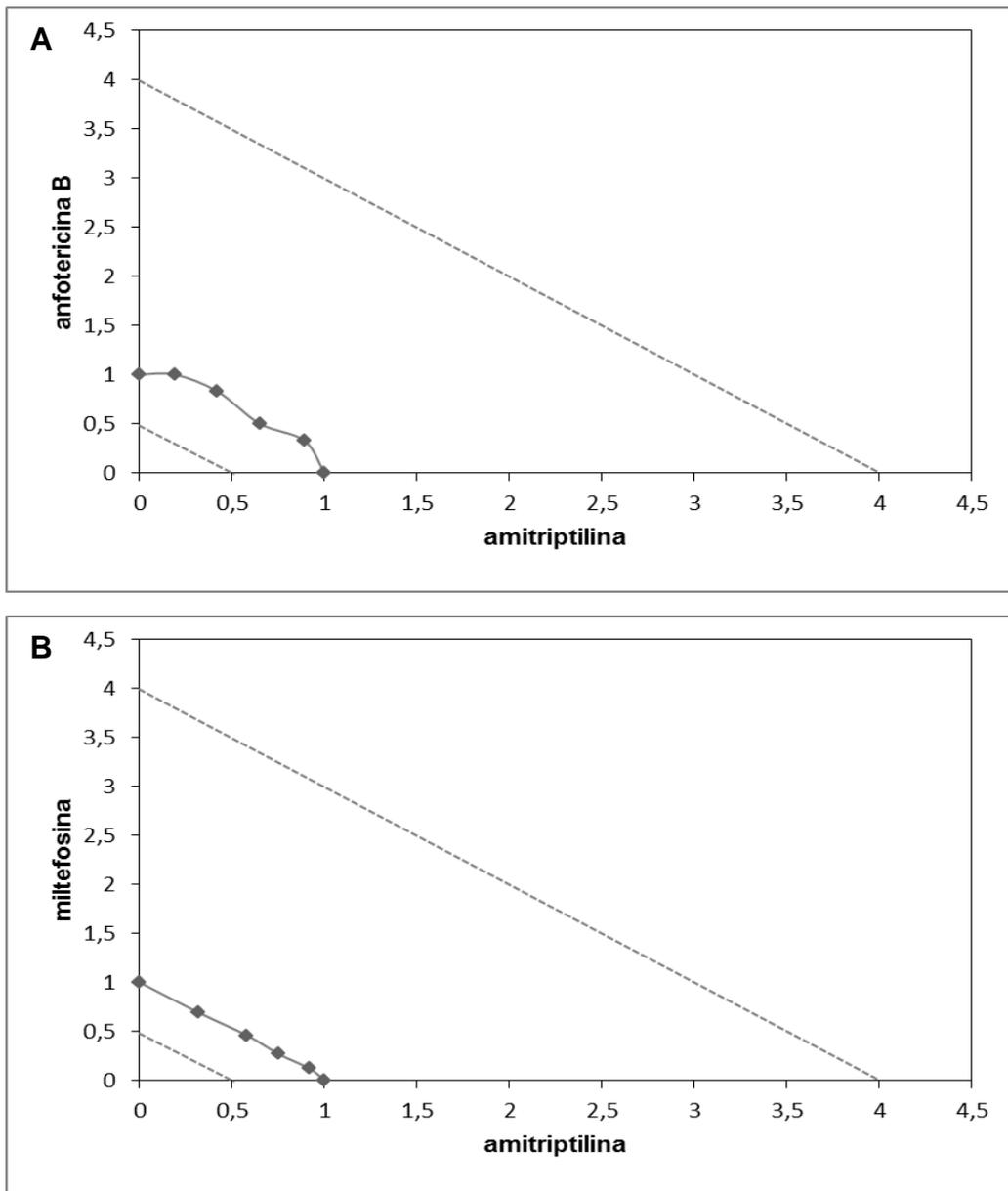


Figura 17: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF da associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfolericina B (A) e miltefosina (B) em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

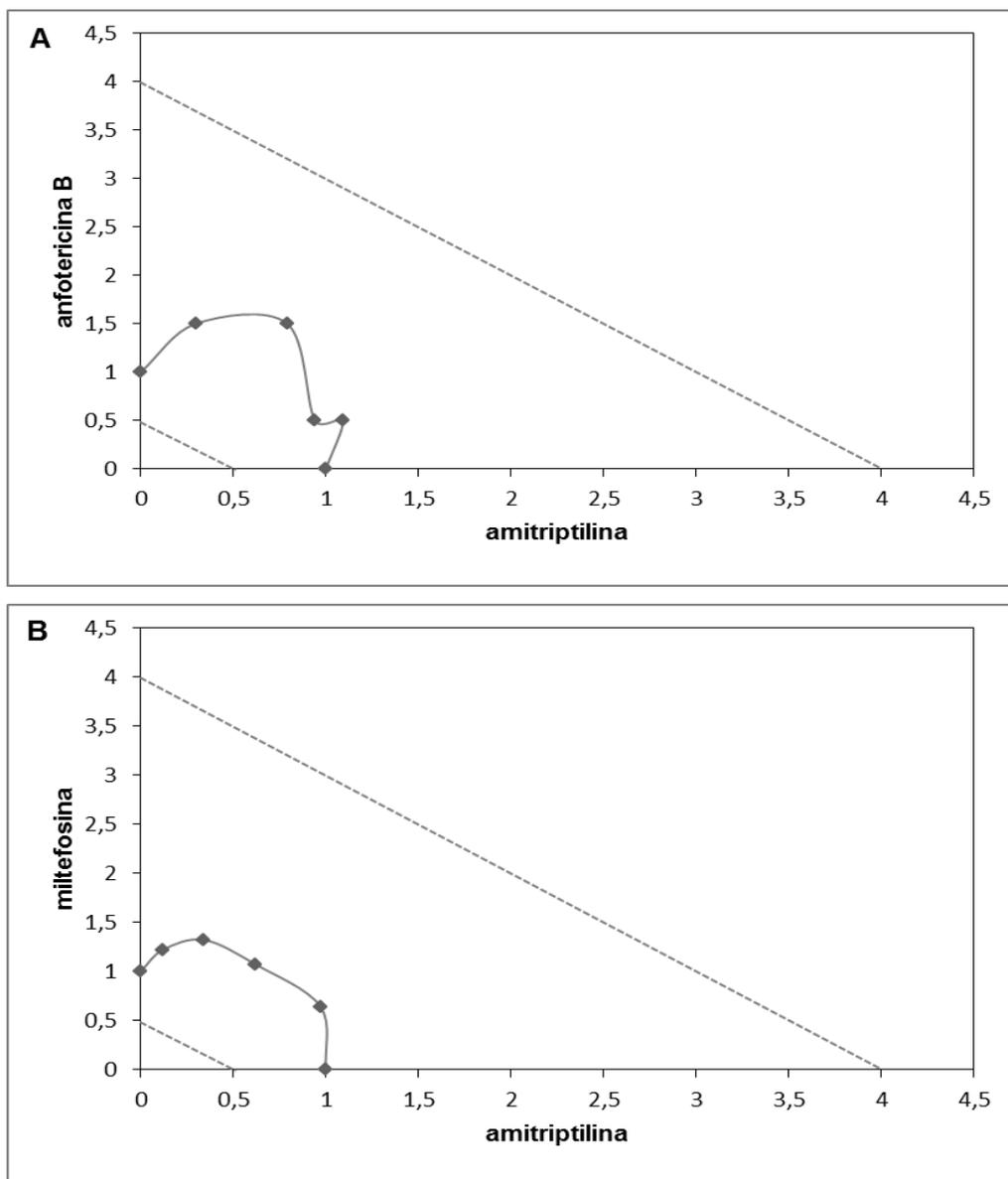


Figura 18: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF da associação entre amitriptilina e os fármacos padrões anfotericina B (A) e miltefosina (B) em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

4.2.3 Avaliação da eficácia da amitriptilina no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*

Foram realizadas infecções experimentais de camundongos BALB/c com *L. (L.) amazonensis* visando verificar a eficácia da amitriptilina *in vivo*. Após cinco semanas de infecção, os animais foram tratados com amitriptilina na dose de 15 mg/kg/dia (VO) por 14 dias consecutivos e estes foram comparados com um grupo não tratado, o qual foi utilizado como controle do experimento. A progressão da infecção e a carga parasitária nos grupos experimentais foram registradas por meio da medida da lesão e da bioluminescência *in vivo*, respectivamente. Com relação ao tamanho da lesão, no grupo tratado com amitriptilina houve uma redução de 5% no 14º dia de tratamento e de 9% no 28º dia (14 dias após o término do tratamento), quando comparado com o grupo não tratado (**Figura 19**). Já em relação à carga parasitária, esta foi mensurada no 14º dia de tratamento por bioimageamento, onde observou-se uma redução de 4% no grupo tratado com amitriptilina em relação ao grupo não tratado (**Figuras 20 e 21**). No entanto, não houve diferença estatística entre o grupo tratado e o grupo não tratado em relação ao tamanho da lesão e à carga parasitária.

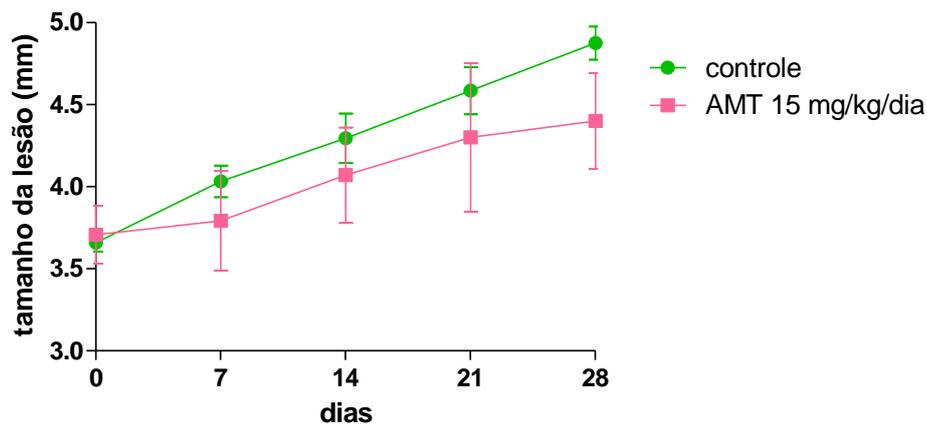


Figura 19: Evolução clínica do tamanho das lesões de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados ou não com 15 mg/kg/dia de amitriptilina (VO). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. O tratamento foi realizado por 14 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos (n = 4/grupo).

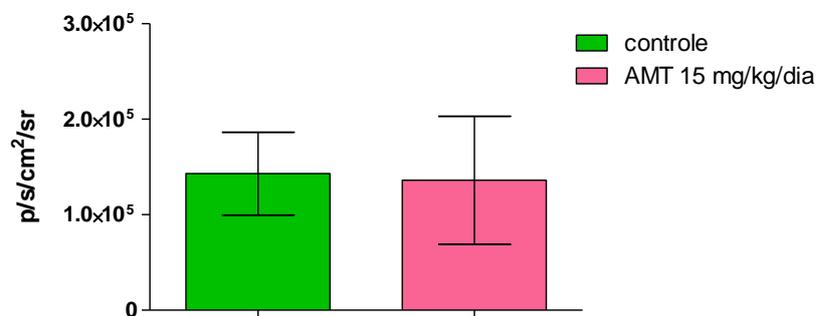


Figura 20: Determinação da carga parasitária no grupo de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com amitriptilina 15 mg/kg/dia (VO) após 14 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

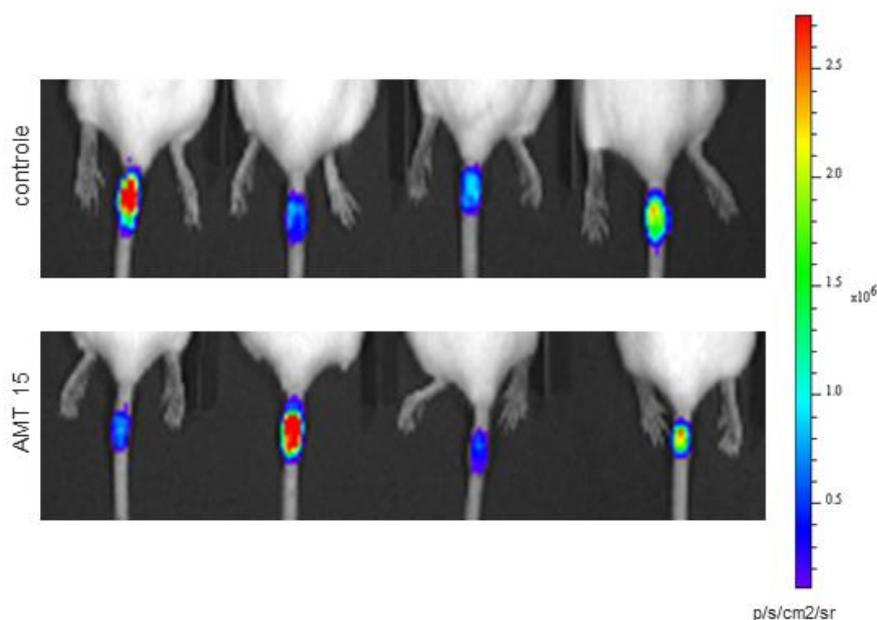


Figura 21: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com amitriptilina 15 mg/kg/dia (VO) após 14 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

4.3 Econazol

Diante dos resultados apresentados na **Tabela 1**, realizou-se a associação de fármacos e testes em animais com o fármaco econazol.

4.3.1 Associação entre econazol e miltefosina

Realizou-se a associação terapêutica entre os fármacos econazol e miltefosina em formas amastigotas intracelulares, através do método do isoblograma de proporções fixas modificado, após 48 horas de incubação. Ao final do experimento, foram geradas curvas dose-resposta, correspondendo às diferentes proporções em que os fármacos foram testados (5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5). As curvas obtidas na associação entre econazol e miltefosina em formas amastigotas são mostradas na **Figura 22**.

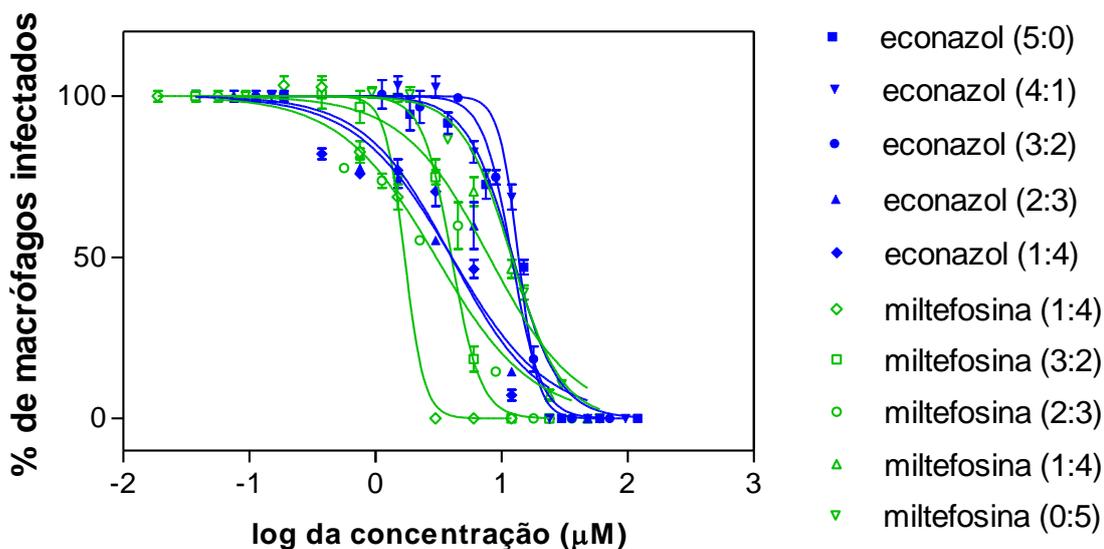


Figura 22: Curvas de dose-resposta geradas pela associação entre econazol e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultado de um experimento representativo.

Na **Tabela 4**, observa-se que os valores de CE_{50} do fármaco econazol e miltefosina vão reduzindo, conforme se aumenta a dose do outro fármaco, sendo este comportamento característico em interações aditivas ou indiferentes. Com base ainda nos valores apresentados na **Tabela 4**, pode-se notar que a associação de econazol e miltefosina na proporção de 2:3 ficou próximo ao valor sinérgico, apresentando o valor de 0,56. Os valores de ΣCIF variaram de 0,56 a 1,23 e o valor da $X\Sigma CIF$ foi de 0,95. De acordo com o valor da $X\Sigma CIF$, essa associação foi classificada como aditiva ou indiferente, mostrando valor maior que 0,5 e menor ou igual a 4.

Tabela 4: Valores de CE₅₀, CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre econazol e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos		proporção		CE ₅₀ da associação (µM)		CIF da associação		Σ CIF	$X\Sigma$ CIF
associados				(±DP)					
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
econazol	miltefosina	5	0	13,36 ± 1,46	-	-	-	-	
		4	1	13,31 ± 0,49	1,67 ± 0,06	1,00	0,13	1,13	
		3	2	12,24 ± 0,23	4,08 ± 0,08	0,92	0,31	1,23	
		2	3	4,24 ± 0,30	3,19 ± 0,22	0,32	0,24	0,56	
		1	4	3,89 ± 0,17	7,79 ± 0,33	0,29	0,59	0,88	
		0	5	-	13,13 ± 1,51	-	-	-	0,95

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CIF: concentração inibitória fracionária; Σ CIF: somatório da concentração inibitória fracionária; $X\Sigma$ CIF: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP: desvio padrão.

O isoblograma gerado a partir da associação entre econazol e miltefosina indicou uma interação do tipo aditiva ou indiferente (**Figura 23**). Os pontos correspondentes ao Σ CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4 (linha pontilhada).

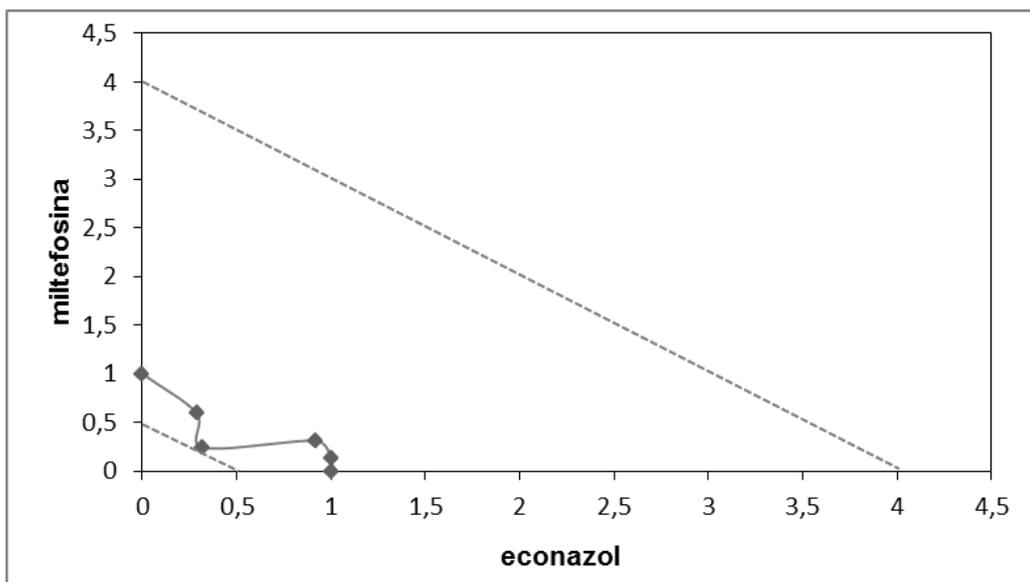


Figura 23: Isobolograma gerado com base nos valores de CIF da associação entre econazol e miltefosina em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

4.3.2 Eficácia do econazol no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*

Um estudo visando avaliar a eficácia do econazol no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi realizado e os resultados foram avaliados por meio da medida da lesão e da carga parasitária. Os animais foram inoculados na base da cauda e após cinco semanas de infecção, os animais foram distribuídos em 4 grupos, sendo que três grupos foram tratados com econazol nas doses de 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO) uma vez ao dia por 28 dias consecutivos e um grupo não recebeu tratamento (controle). Os resultados obtidos em relação à medida de lesão indicaram que no 14º dia de tratamento, houve redução de 4%, 11% e 18% nos grupos tratados com econazol 2,5

mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia, respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado. Já no 28º dia de tratamento, a redução da medida foi de 8% e 20% nos grupos tratados com econazol 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia, respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 24**). Quando se observa os resultados obtidos na avaliação da carga parasitária por bioimageamento no 28º dia de tratamento, a redução foi de 14%, 34% e 75% nos grupos tratados com econazol 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia, respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 25 e 26**). Não houve diferença estatística significativa entre grupos tratados e grupo controle considerando a medida da lesão e a carga parasitária.

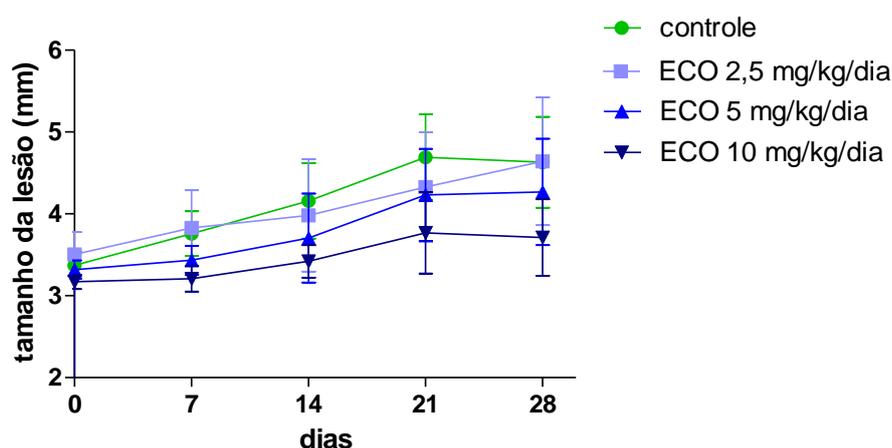


Figura 24: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com econazol 2,5, 5 e 10 mg/kg/dia (VO). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. (n = 4/grupo).

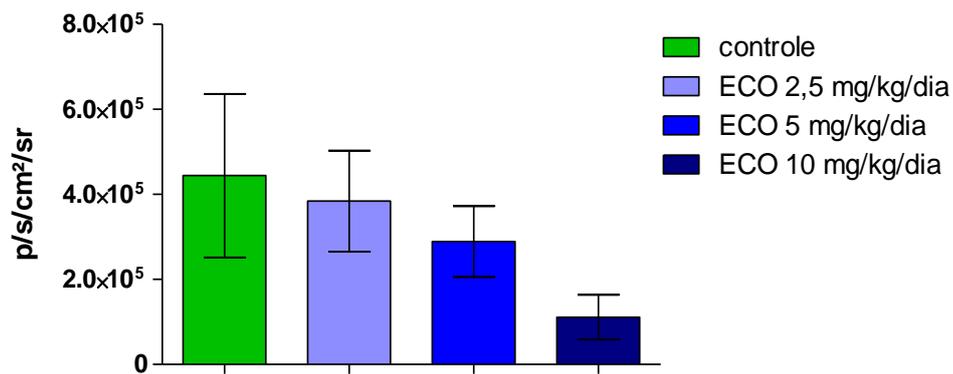


Figura 25: Determinação da carga parasitária nos grupos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com econazol 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO) após 28 dias de tratamento e no grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

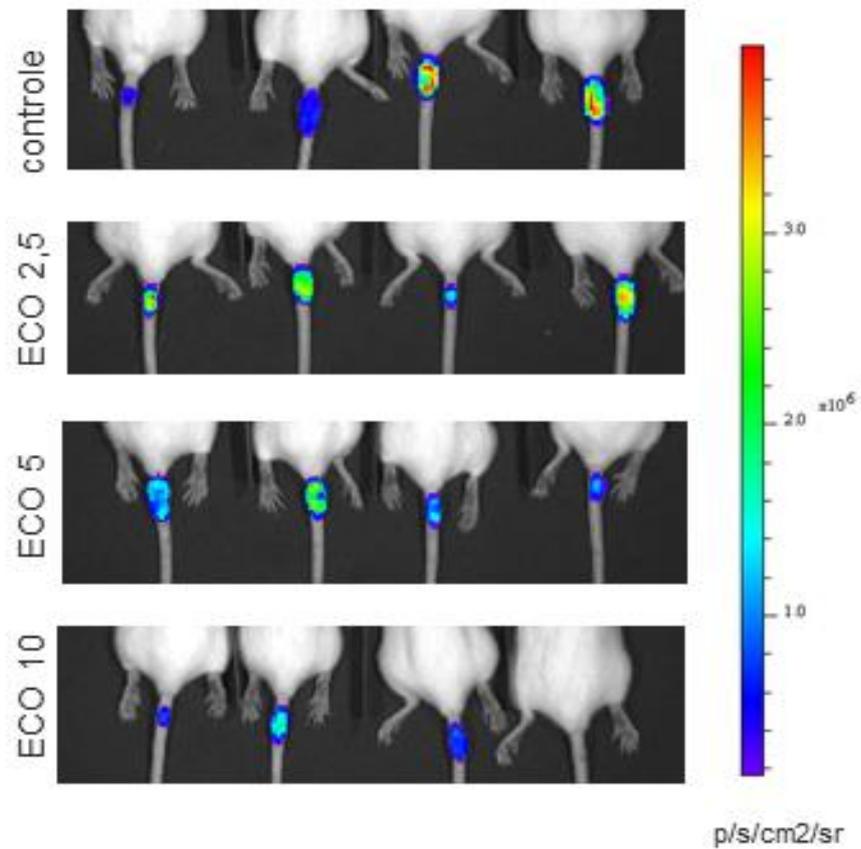


Figura 26: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com econazol 2,5 mg/kg/dia, 5 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia (VO) após 28 dias de tratamento. $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

4.4 Sertralina

Com base nos resultados indicados na **Tabela 1**, foi constatada a atividade *in vitro* e *ex vivo* do fármaco sertralina e em seguida foram realizados ensaios de associações terapêuticas e testes em animais.

4.4.1 Associações entre sertralina e os fármacos padrões

As associações *in vitro* entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina foram avaliadas nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares utilizando o método do isoblograma, como descrito anteriormente. As curvas obtidas a partir das associações entre sertralina e os fármacos padrões em formas promastigotas e amastigotas intracelulares são mostradas na **Figura 27** e **28**, respectivamente.

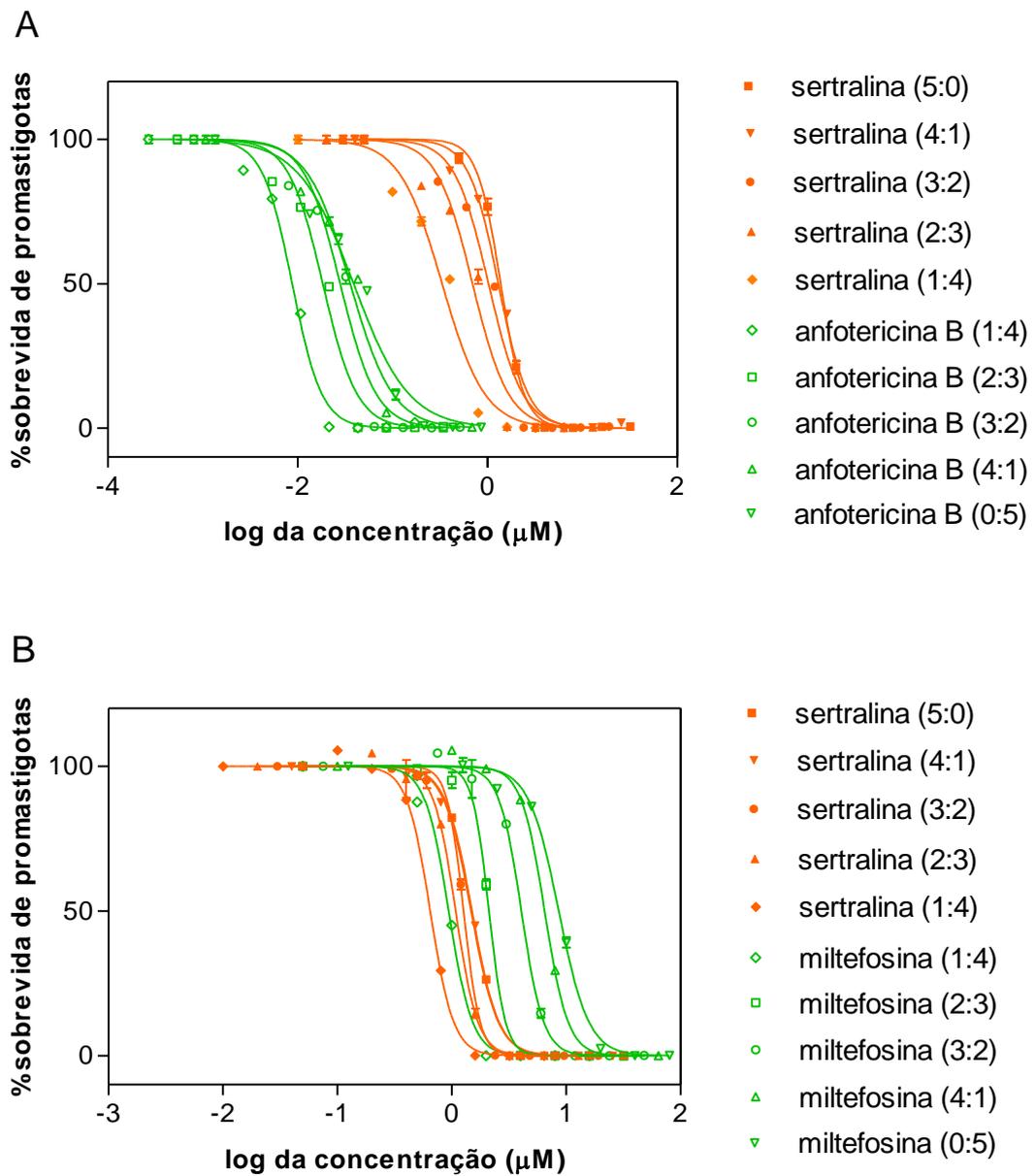


Figura 27: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre sertralina e fármacos padrões anofetericina B (A) e miltefosina (B) em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo.

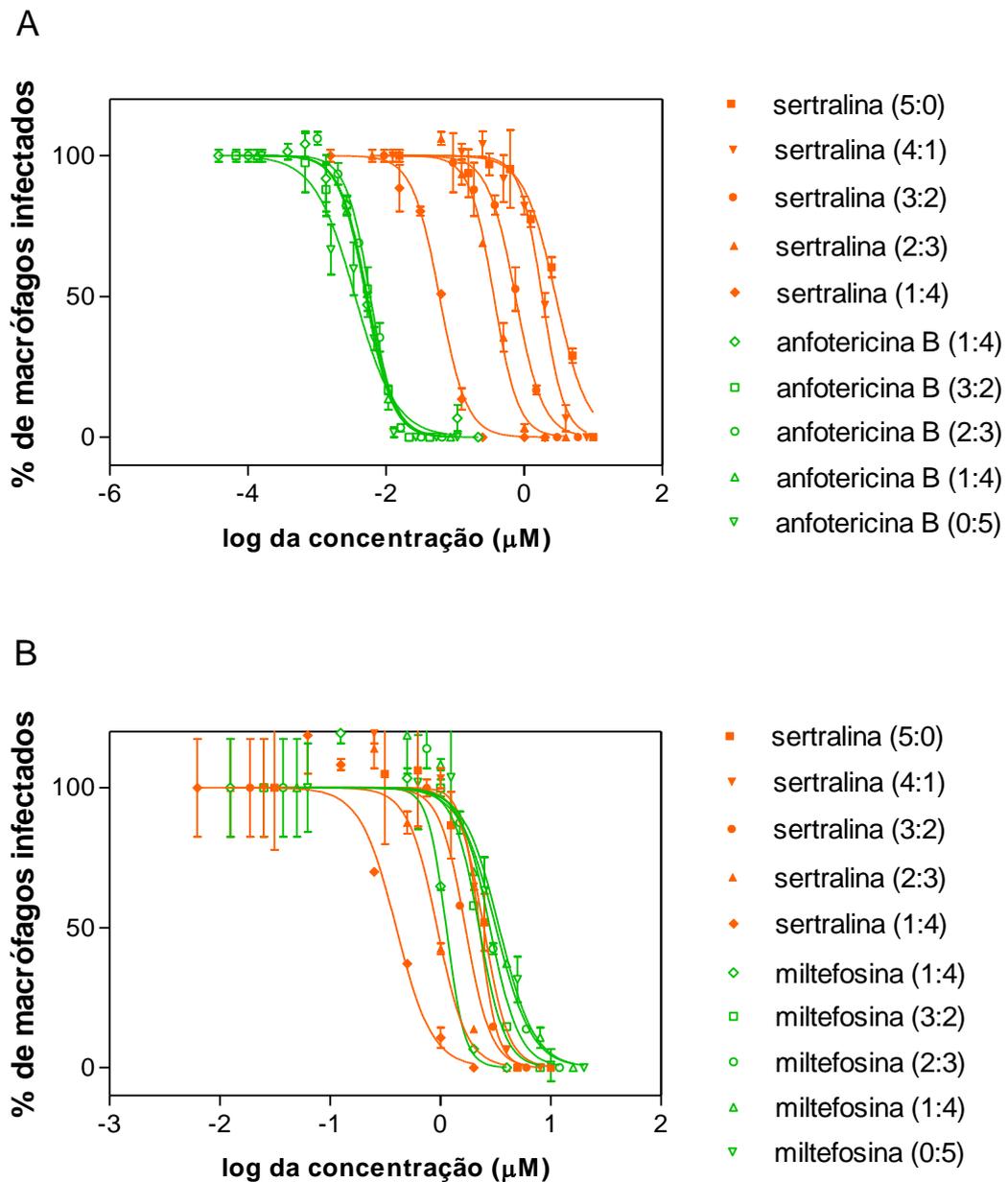


Figura 28: Curvas dose-resposta geradas pelas associações entre sertralina e fármacos padrões anofotericina B (A) e miltefosina (B) em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo.

Nas **Tabelas 5 e 6**, pode-se observar que os valores de CE_{50} do fármaco sertralina vão reduzindo, conforme se aumenta a dose do outro fármaco, e vice-versa, sendo este comportamento característico em interações aditivas ou indiferentes. Os valores de ΣCIF variaram de 0,72 a 1,49. De acordo com os valores de $X\Sigma CIF$, que variaram de 1,07 a 1,35, tais interações foram classificadas como aditivas ou indiferentes tanto nos ensaios com promastigotas como em amastigotas intracelulares.

Tabela 5: Valores de CE_{50} , CIF , ΣCIF e $X\Sigma CIF$ gerados pela associação entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos associados		proporção		CE_{50} da associação (μM) ($\pm DP$)		CIF da associação		ΣCIF	$X\Sigma CIF$
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
sertralina	anfotericina B	5	0	1,65 \pm 0,36	-	-	-	-	
		4	1	1,54 \pm 0,33	0,01 \pm 0,00	0,93	0,20	1,13	
		3	2	1,26 \pm 0,32	0,03 \pm 0,01	0,76	0,60	1,36	
		2	3	0,99 \pm 0,40	0,04 \pm 0,01	0,60	0,80	1,40	
		1	4	0,48 \pm 0,21	0,06 \pm 0,02	0,29	1,20	1,49	
		0	5	-	0,05 \pm 0,01	-	-	-	1,35
sertralina	miltefosina	5	0	1,82 \pm 0,43	-	-	-	-	
		4	1	1,62 \pm 0,20	1,02 \pm 0,11	0,89	0,09	0,98	
		3	2	1,47 \pm 0,28	2,45 \pm 0,47	0,81	0,22	1,03	
		2	3	1,38 \pm 0,42	5,16 \pm 1,54	0,76	0,47	1,23	
		1	4	0,82 \pm 0,23	8,15 \pm 2,33	0,45	0,74	1,19	
		0	5	-	10,94 \pm 3,25	-	-	-	1,11

CE_{50} : Concentração Efetiva 50%; CIF : concentração inibitória fracionária; ΣCIF : somatório da concentração inibitória fracionária; $X\Sigma CIF$: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP : desvio padrão.

Tabela 6: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pelas associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos associados		proporção		CE ₅₀ da associação (µM) (±DP)		CIF da associação		ΣCIF	XΣCIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
sertralina	anfotericina B	5	0	2,20 ±0,95	-	-	-	-	
		4	1	1,91 ±0,11	0,01 ±0,00	0,87	0,33	1,20	
		3	2	1,66 ±1,29	0,01 ±0,01	0,75	0,33	1,08	
		2	3	0,86 ±0,70	0,01 ±0,01	0,39	0,33	0,72	
		1	4	0,60 ±0,76	0,03 ±0,03	0,27	1,00	1,27	
		0	5	-	0,03 ±0,03	-	-	-	1,07
sertralina	miltefosina	5	0	1,84 ±0,90	-	-	-	-	
		4	1	1,69 ±0,81	0,84 ±0,41	0,92	0,30	1,22	
		3	2	1,21 ±0,67	1,62 ±0,89	0,66	0,57	1,23	
		2	3	0,62 ±0,45	1,87 ±1,34	0,34	0,66	1,00	
		1	4	0,32 ±0,11	2,54 ±0,90	0,17	0,90	1,07	
		0	5	-	2,82 ±0,84	-	-	-	1,13

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CIF: concentração inibitória fracionária; ΣCIF: somatório da concentração inibitória fracionária; XΣCIF: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP: desvio padrão.

Utilizando os valores de CIF, os isobogramas foram construídos (**Figura 29 e 30**) e os pontos referentes a cada associação foram ligados por uma linha de tendência, que indicou o comportamento aditivo das interações entre sertralina e os fármacos padrões.

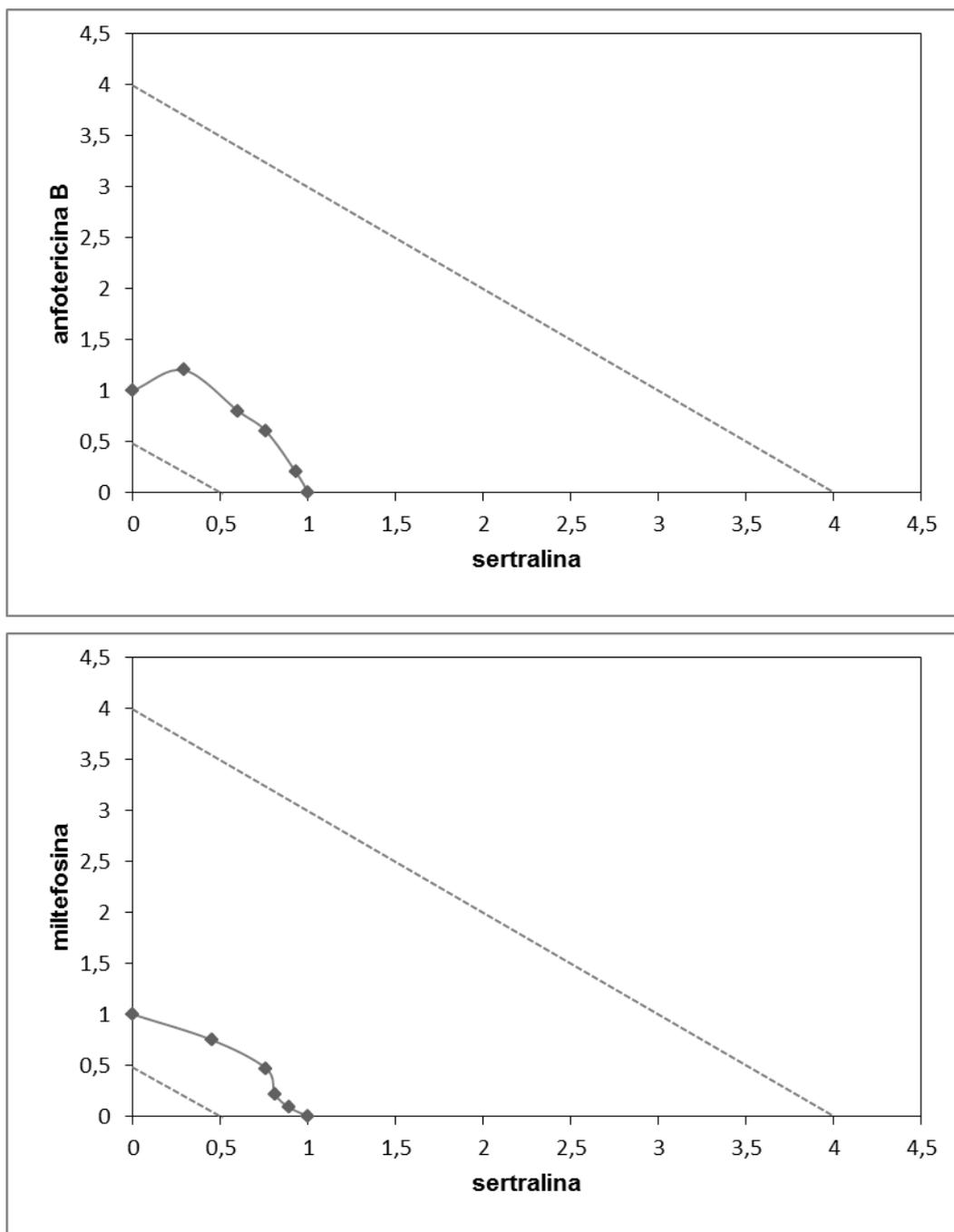


Figura 29: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF das associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas promastigotas de *L (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo de 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

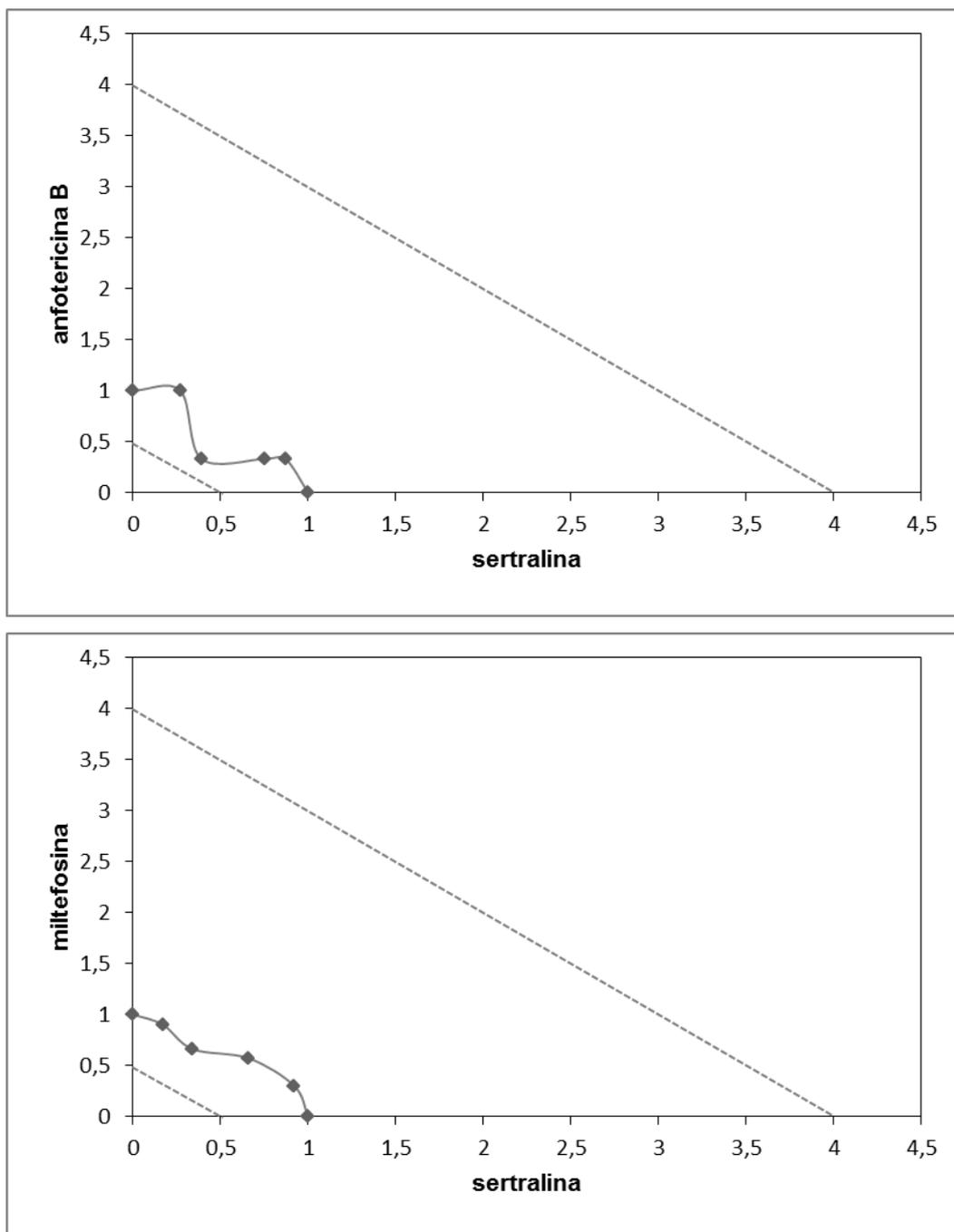


Figura 30: Isobogramas gerados com base nos valores de CIF das associações entre sertralina e os fármacos padrões anfotericina B e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo de 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

4.4.2 Avaliação da eficácia da sertralina no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*

Três experimentos foram realizados visando a avaliação da eficácia da sertralina em modelo experimental de leishmaniose tegumentar. O primeiro experimento foi realizado após 5 semanas de infecção no coxim plantar. Neste experimento, os camundongos foram tratados com 20 doses de sertralina, que resultou em redução no tamanho da lesão, conforme observado na **Figura 31 (A e B)**. Os animais tratados com sertralina 30 mg/kg/dia (VO), 30 mg/kg/dia (IP), 10 mg/kg/dia (VO) e 10 mg/kg/dia (IP) apresentaram uma redução de 54%, 52%, 3% e 19% no tamanho da lesão, respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado (controle) 14 dias após início do tratamento. O grupo tratado com sertralina 30 mg/kg/dia (VO) apresentou redução significativa no tamanho da lesão ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo não tratado. No 28º dia após início do tratamento, houve 41%, 22%, 8% e 3% de redução no tamanho da lesão dos animais tratados com sertralina 30 mg/kg/dia (VO), 30 mg/kg/dia (IP), 10 mg/kg/dia (VO) e 10 mg/kg/dia (IP), respectivamente, quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 32**).

Com relação à carga parasitária (**Figura 33 e 34**), se observa que houve aumento de parasitas na lesão em todos os grupos tratados com sertralina, e esse aumento variou de 18% a 576% em relação ao grupo controle (**Figura 33**). Houve diferença estatística ($p < 0,02$) entre o grupo tratado com sertralina 10 mg/kg/dia (VO) e o grupo não tratado. Ao final desse experimento, também foi possível notar que períodos prolongados de tratamento com sertralina IP podem causar peritonite em alguns animais (dados não mostrados), influenciando a absorção de luciferina para realização do bioimageamento. Portanto, deve-se evitar o uso dessa via por períodos prolongados em futuros experimentos *in vivo*.

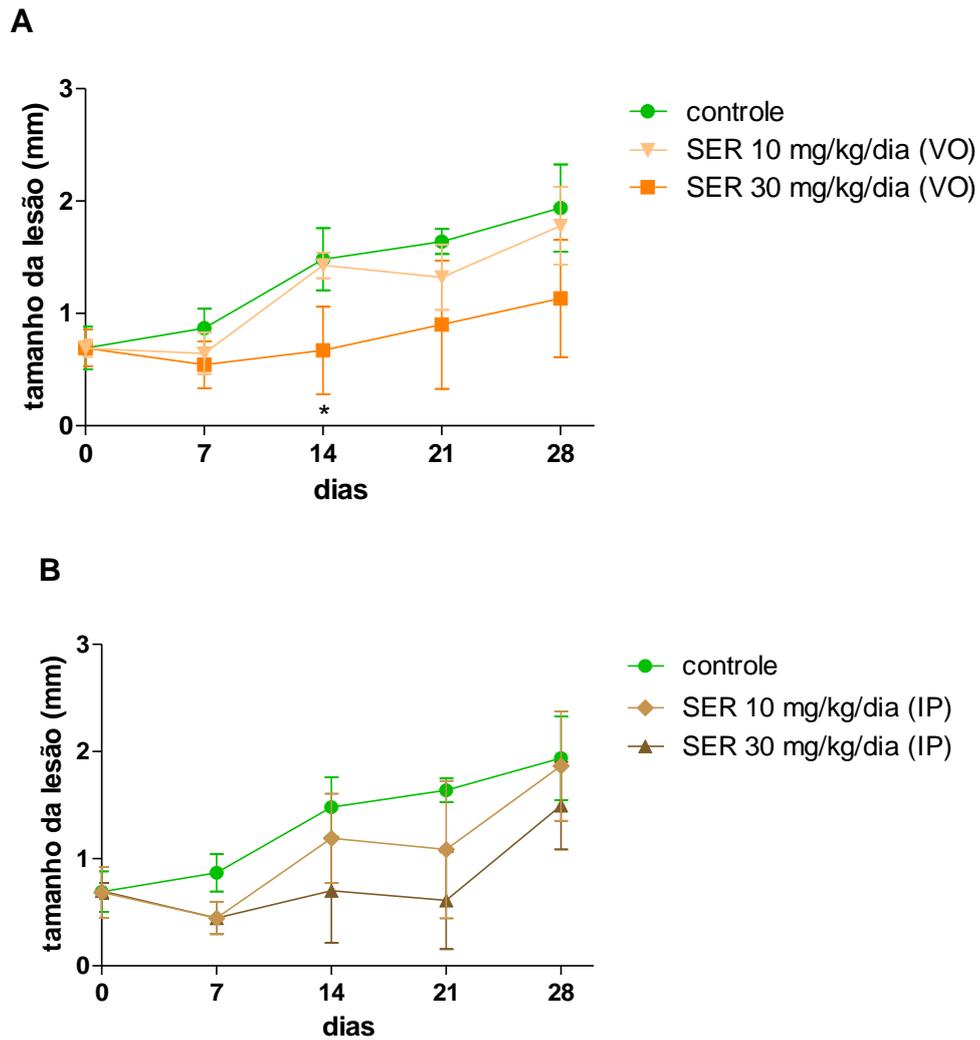


Figura 31: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina em comparação com o grupo não tratado. O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. * $p < 0,01$ em relação ao grupo não tratado. ($n = 4/\text{grupo}$). Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO), representado em (A) e intraperitoneal (IP), representado em (B).

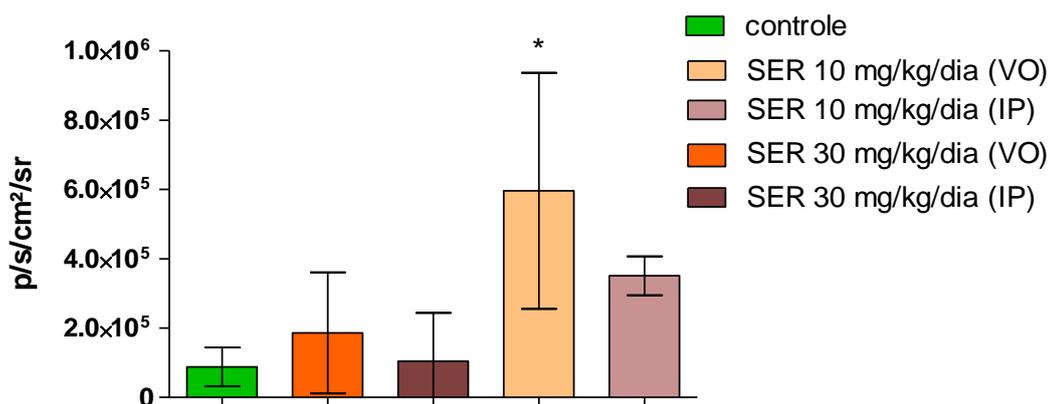


Figura 32: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina após 28 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. * $p < 0,02$ em relação ao grupo não tratado. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO) e intraperitoneal (IP).

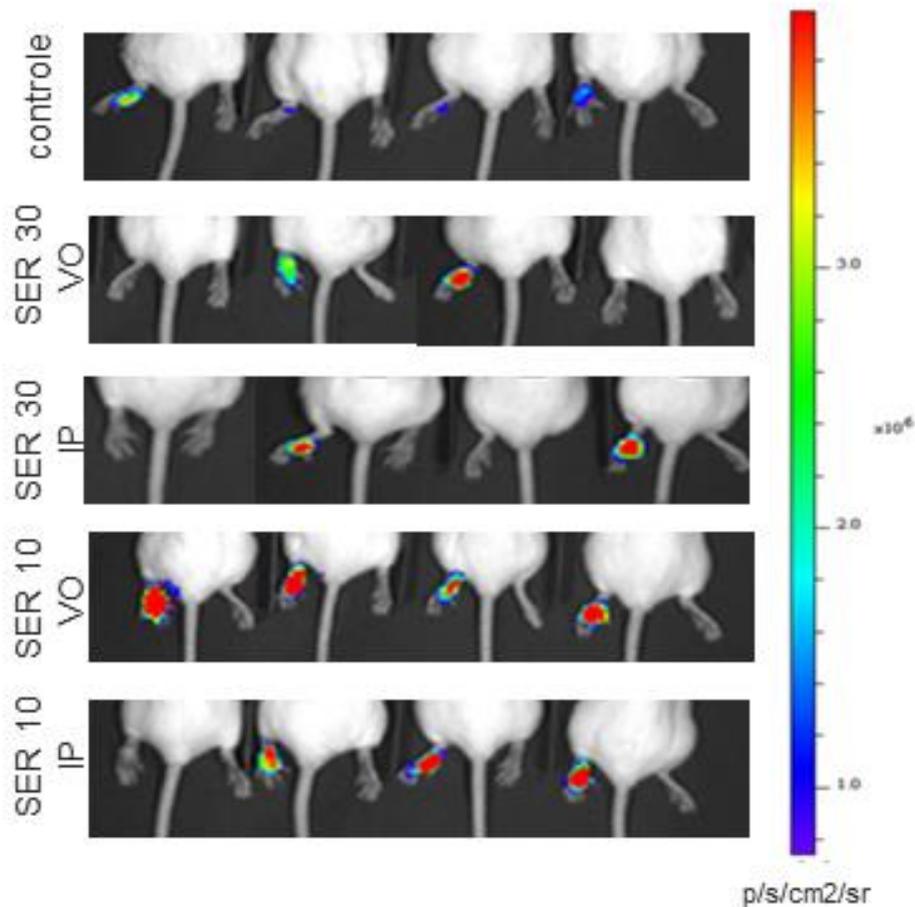


Figura 33: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com sertralina após 28 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 10 mg/kg/dia por via oral (VO) e intraperitoneal (IP).

No segundo experimento, a infecção também foi realizada no coxim plantar. Após 14 dias de tratamento com sertralina nas doses de 30 e 40 mg/kg/dia (VO), não se observou diferença estatística entre os grupos tratados e grupo controle, em relação ao tamanho da lesão e à carga parasitária (**Figuras 34 a 35**). No 14^o dia de tratamento, houve redução de 50% e 41% no tamanho da lesão nos grupos tratados com sertralina nas doses de 30 e 40 mg/kg/dia (VO), respectivamente em relação ao grupo não

tratado. No 28º dia de tratamento, observou-se aumento de 23% e redução de 11% nos grupos tratados com sertralina nas doses de 40 e 30 mg/kg/dia (VO), respectivamente em relação ao grupo não tratado. Ao final do tratamento (28 dias) o bioimageamento foi realizado mostrando redução de 13% no grupo tratado com sertralina 30 mg/kg/dia e aumento de 89% no grupo tratado com sertralina 40 mg/kg/dia (VO) em relação ao grupo não tratado (**Figura 35 e 36**).

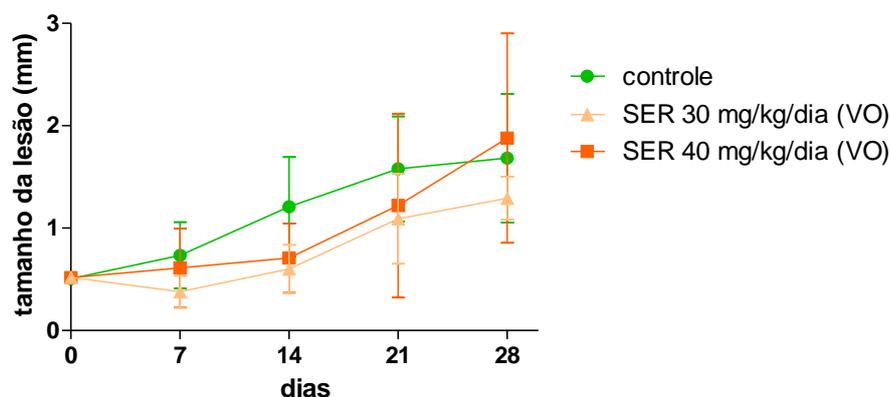


Figura 34: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina em comparação com o grupo não tratado (controle). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos e barras indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado ($n = 5/\text{grupo}$). Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO).

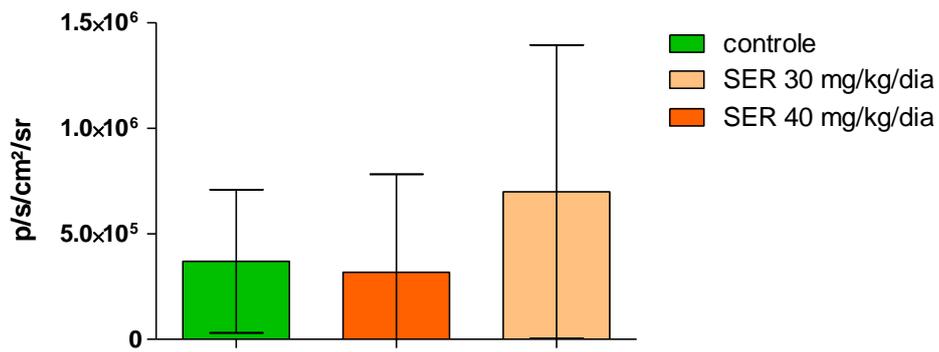


Figura 35: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com sertralina após 14 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência de lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano (média e desvio padrão). *p < 0,05 em relação ao grupo não tratado. Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO).

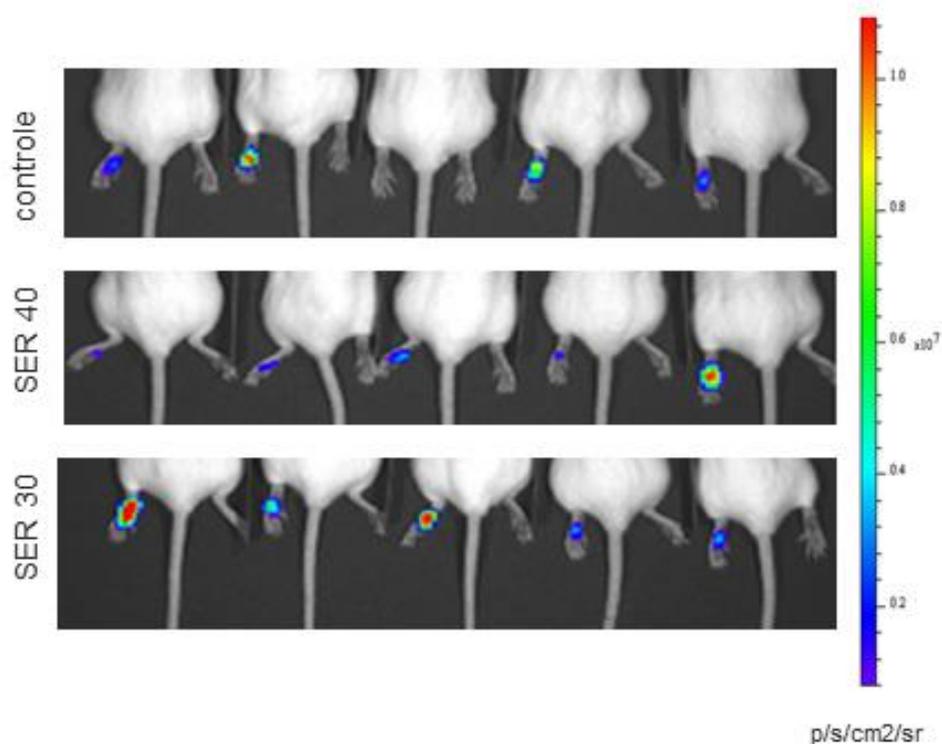


Figura 36: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle) e tratados com sertralina após 14 dias de tratamento. $p/s/cm^2/sr$: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano. Sertralina foi administrada a 30 e 40 mg/kg/dia por via oral (VO).

No terceiro experimento, o inóculo foi realizado na base da cauda para facilitar a administração das formulações tópicas e dificultar sua retirada pelos animais. Neste experimento as formulações utilizadas foram: creme base contendo miristato (grupo utilizado como controle de veículo) e creme base com miristato e sertralina 1%. O miristato foi utilizado nessa formulação para facilitar a permeação do fármaco à pele. Os animais foram tratados por 28 dias com duas aplicações ao dia. No 14^o de tratamento houve redução de 8% e 9% nos grupos tratados com creme e creme com sertralina 1%, respectivamente em relação ao grupo não tratado ($p < 0,002$). No 28^o dia após o tratamento, notou-se redução de 21% e 16% nos grupos tratados

com creme e creme com sertralina 1%, respectivamente em relação ao grupo não tratado ($p < 0,005$) (**Figura 37**).

Com relação à carga parasitária, notou-se redução de 85% e 88% nos grupos tratados com creme e creme com sertralina 1%, respectivamente em relação ao grupo não tratado ($p < 0,005$) (**Figuras 38 e 39**).

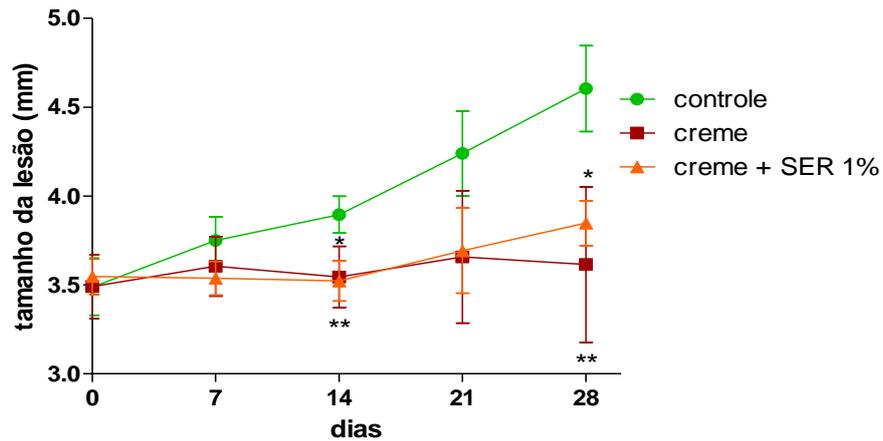


Figura 37: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme contendo miristato e creme contendo miristato e sertralina 1% em comparação com o grupo não tratado (controle). O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. Os pontos e barras indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. ** $p < 0,005$ em relação ao grupo não tratado. ($n = 4/\text{grupo}$).

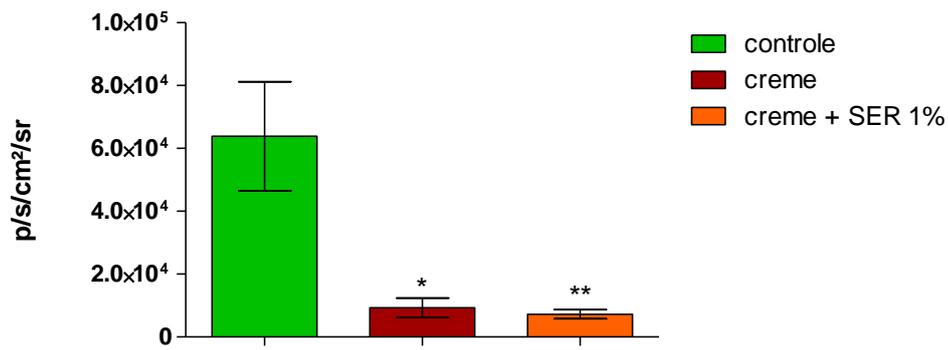


Figura 38: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme contendo miristato e creme contendo miristato e sertralina 1% após 28 dias de tratamento em comparação com o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões dos animais de cada grupo. p/s/cm²sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano (média e desvio padrão). **p < 0,005 em relação ao grupo não tratado.

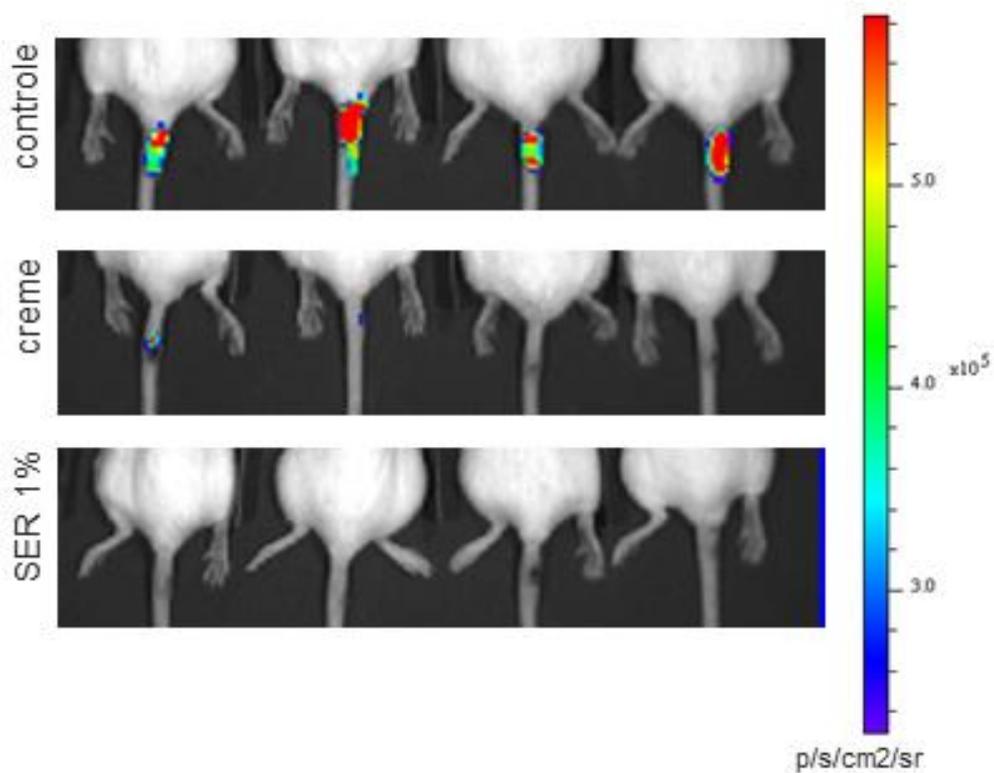


Figura 39: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle), tratados com creme contendo miristato (controle de veículo) e tratados com creme contendo miristato e sertralina 1% após 28 dias de tratamento. $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

4.5 Triclosan

Com base nos resultados mostrados na **Tabela 1**, foi constatada a atividade *in vitro* e *ex vivo* do fármaco triclosan e em seguida foram realizados ensaios para avaliação do mecanismo de ação leishmanicida, associações terapêuticas e eficácia no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

4.5.1 Avaliação do mecanismo de ação em *L. (L.) amazonensis*

4.5.1.1 Alteração da integridade da membrana plasmática

Neste estudo a sonda iodeto de propídeo foi usada para avaliar se o fármaco triclosan induz alteração na integridade da membrana plasmática parasitária, durante os primeiros 30 minutos de incubação, uma vez que a sonda aumenta a fluorescência quando é ligada a DNA. A permeabilização máxima desse experimento foi obtida utilizando o detergente Triton-X 100 (controle positivo), mostrando alteração significativa na membrana plasmática (** $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle (parasitas não tratados). Já o controle utilizando promastigotas não tratados foi usado para obtenção da fluorescência basal, descartando células alteradas na população de células em estudo. As leituras foram realizadas a cada dez minutos e notou-se que o triclosan testado no valor da CE_{50} apresentou fluorescência aumentada desde a adição do fármaco, apresentando metade da fluorescência máxima em relação ao Triton-X 100. O influxo da sonda aumenta progressivamente após 10 e 20 minutos, e aos 30 minutos, Triton-X 100 e triclosan possuem fluorescência semelhante, com valor estatisticamente diferente quando comparados ao grupo controle não tratado ($p < 0,0001$). Esses resultados mostram que a ação do triclosan em promastigotas está diretamente relacionada à sua capacidade de causar alterações na integridade da membrana plasmática parasitária (**Figura 40**).

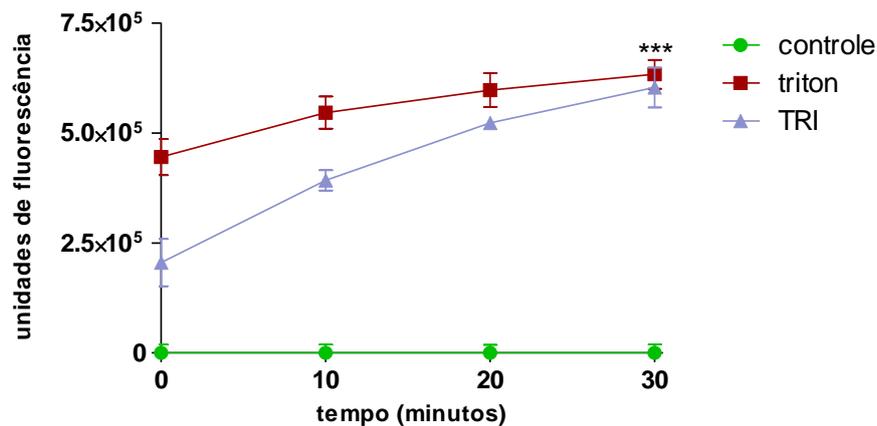


Figura 40: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com triclosan, utilizando iodeto de propídeo. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan na concentração correspondente à CE₅₀ do fármaco. Controles contendo parasitas não tratados e parasitas tratados com Triton-X 100 também foram utilizados. O valor de p é representado por *** (p < 0,0001) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um ensaio representativo.

4.5.1.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A rodamina 123 foi usada neste experimento para avaliar o potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Usando citometria de fluxo, parasitas tratados com triclosan no valor de CE₅₀ por 30 minutos foram avaliados, bem como parasitas não tratados (controle de mitocôndrias ativas) e parasitas tratados com FCCP (controle de despolarização do potencial de membrana mitocondrial). O triclosan mostrou redução de 91% nas unidades de fluorescência quando comparados ao controle não tratado (**p < 0,002). Essa redução foi estatisticamente significativa, mostrando que o triclosan despolariza o potencial de membrana mitocondrial após 30 minutos de tratamento. O controle positivo de despolarização (parasitas tratados com FCCP) apresentou redução

significativa de aproximadamente 87% em relação ao controle não tratado (** $p < 0,002$) (**Figura 41**).

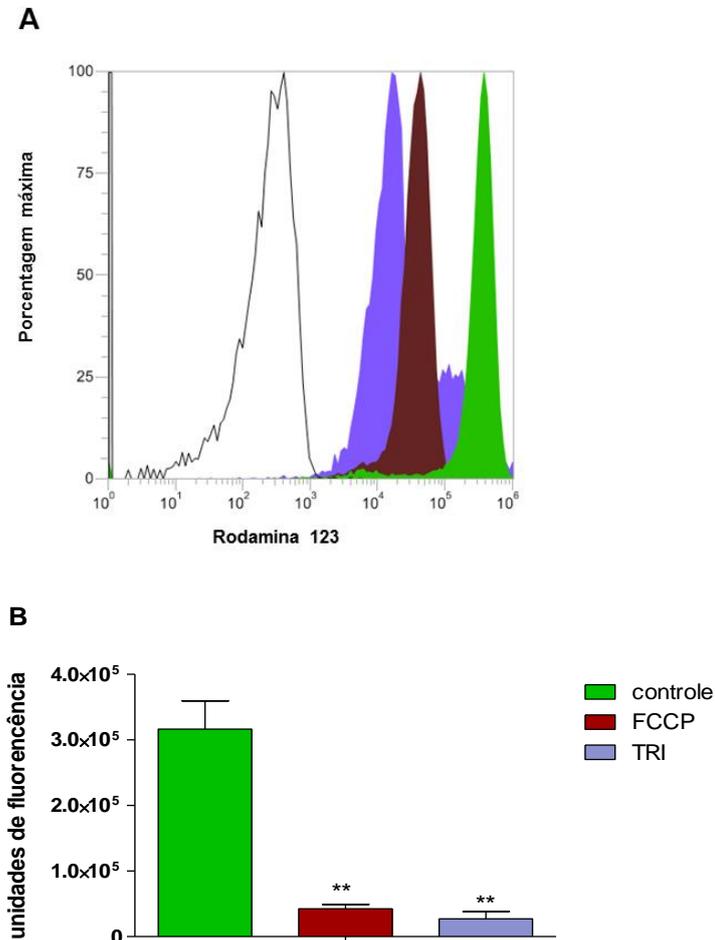


Figura 41: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial utilizando rodamina 123 por citometria de fluxo. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan na concentração correspondente ao CE₅₀ do fármaco por 30 minutos. Controles contendo células não tratadas e células tratadas com FCCP foram utilizados. Histograma mostrando em preto a fluorescência dos parasitas não tratados e não marcados; na cor verde os parasitas não tratados e marcados; na cor vinho os parasitas tratados com FCCP e marcados; na cor azul os parasitas tratados com triclosan por 30 minutos e marcados (A). Gráfico representando a média das unidades de fluorescência e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo. O valor de p é representado por ** ($p < 0,002$) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado (B).

4.5.1.3 Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio foi usada a sonda H₂DCF-DA. Parasitas não tratados e parasitas tratados com azida sódica por 30 minutos foram usados como controles. Parasitas não tratados foram usados para indicar a produção basal de espécies reativas de oxigênio. Já os parasitos tratados com azida sódica foram usados para representar as células com aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, com aumento significativo em relação ao grupo controle (**p<0,002). Após 30 minutos de tratamento com triclosan no valor de CE₅₀, pode-se notar que as unidades de fluorescência reduziram 61% quando comparado ao controle não tratado (**Figura 42**). Este resultado indica que possivelmente houve influxo das espécies reativas de oxigênio (saída) através da membrana plasmática, possivelmente devido à perda da integridade da membrana plasmática induzida pelo triclosan.

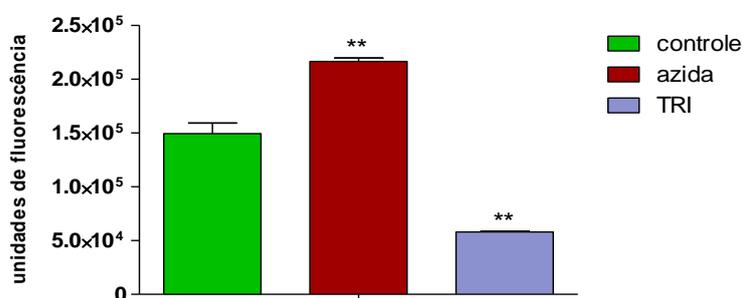


Figura 42: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após o tratamento com triclosan utilizando a sonda H₂DCF-DA. Formas promastigotas foram tratadas com triclosan no valor de CE₅₀ por 30 minutos. Controles contendo parasitos não tratados e parasitos tratados com azida sódica também foram utilizados. O valor de p é representado por ** (p<0,002) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. A barra representa a média e o desvio padrão das duplicatas de um experimento representativo.

4.5.1.4 Alterações ultraestruturais

Para avaliar as alterações ultraestruturais foram usadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados com triclosan no valor da CE_{50} por 15 minutos. Promastigotas não tratados foram utilizados como controle do experimento (**Figura 43 - A**). Nota-se que os parasitos não tratados possuem núcleo (n), membrana plasmática (mp) e kinetoplasto (k) preservados (**Figura 43 - A**). Parasitos tratados com triclosan por 15 minutos (**Figura 43 - B**) apresentaram ruptura na membrana plasmática (indicada por setas) e destruição da integridade das organelas.

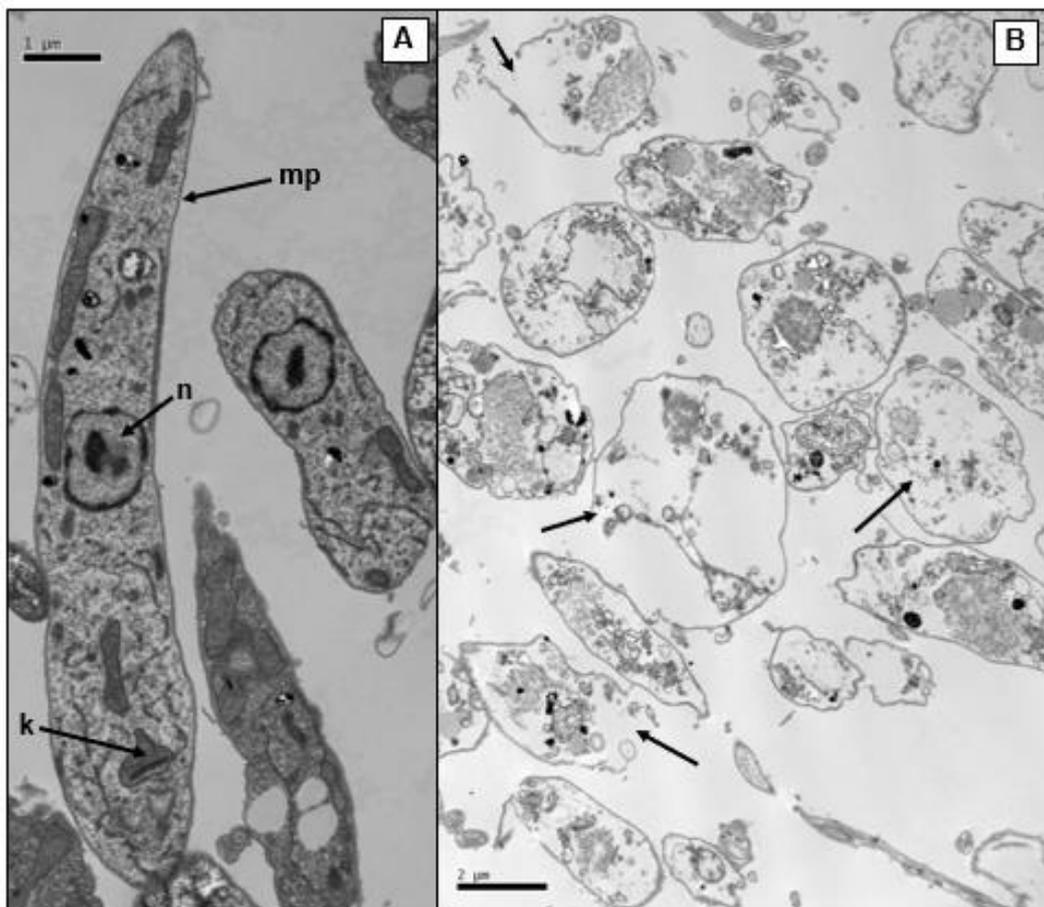


Figura 43: Análise ultraestrutural de promastigotas tratados com triclosan na concentração correspondente ao valor da CE_{50} por 15 minutos. Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas não

tratados (A: barra 1 μ m) e promastigotas tratados com triclosan por 15 minutos (B: barra 2 μ m). K: kinetoplasto, n: núcleo e mp: membrana plasmática. As setas (B) indicam ruptura na membrana plasmática e destruição das organelas. Aumento 15.000X.

4.5.2 Associação entre triclosan e miltefosina

Uma vez determinada atividade *in vitro* e *ex vivo* do triclosan, a interação entre triclosan e miltefosina foi avaliada em formas amastigotas intracelulares através de contagem de macrófagos infectados por meio de microscopia óptica. O método de isoblograma foi utilizado e as curvas de dose-resposta foram obtidas (**Figura 44**).

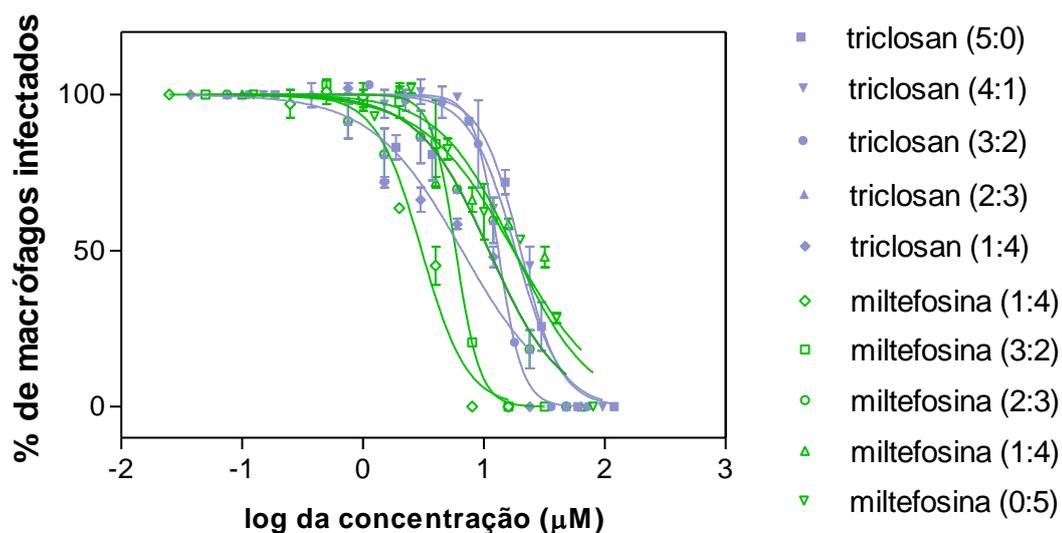


Figura 44: Curvas de dose-resposta geradas pela associação entre triclosan e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Resultados de um experimento representativo.

Na **Tabela 7** observa-se que os valores de CE₅₀ do triclosan reduzem, enquanto os valores de CE₅₀ de miltefosina aumentam, e vice-versa, sendo este comportamento característico de interações aditivas ou indiferentes. Também observa-se que os valores Σ CIF das associações

variaram de 1,16 a 1,36 e que o valor da $X\Sigma$ CIF foi de 1,26. De acordo com o valor da $X\Sigma$ CIF, a interação foi classificada como aditiva ou indiferente.

Tabela 7: Valores de CE_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF gerados pela associação entre triclosan e miltefosina em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

fármacos associados		proporção		CE ₅₀ da associação (μM)(± DP)		CIF da associação		ΣCIF	XΣCIF
A	B	A	B	A	B	A	B	A + B	
triclosan	miltefosina	5	0	16,99 ± 4,54	-	-	-	-	
		4	1	17,74 ± 0,91	2,96 ± 0,15	1,04	0,15	1,19	
		3	2	14,36 ± 1,65	6,38 ± 0,74	0,84	0,32	1,16	
		2	3	12,36 ± 1,86	12,36 ± 1,86	0,73	0,63	1,36	
		1	4	6,83 ± 0,31	18,23 ± 0,83	0,40	0,93	1,33	
		0	5	-	19,68 ± 2,50	-	-	-	1,26

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CIF: concentração inibitória fracionária; ΣCIF: somatório da concentração inibitória fracionária; XΣCIF: média do somatório das concentrações inibitórias fracionárias; DP: desvio padrão.

O isoblograma foi construído a partir dos valores de CIF (**Figura 45**) e os pontos foram ligados por uma linha de tendência, que indicou a interação aditiva dessa associação.

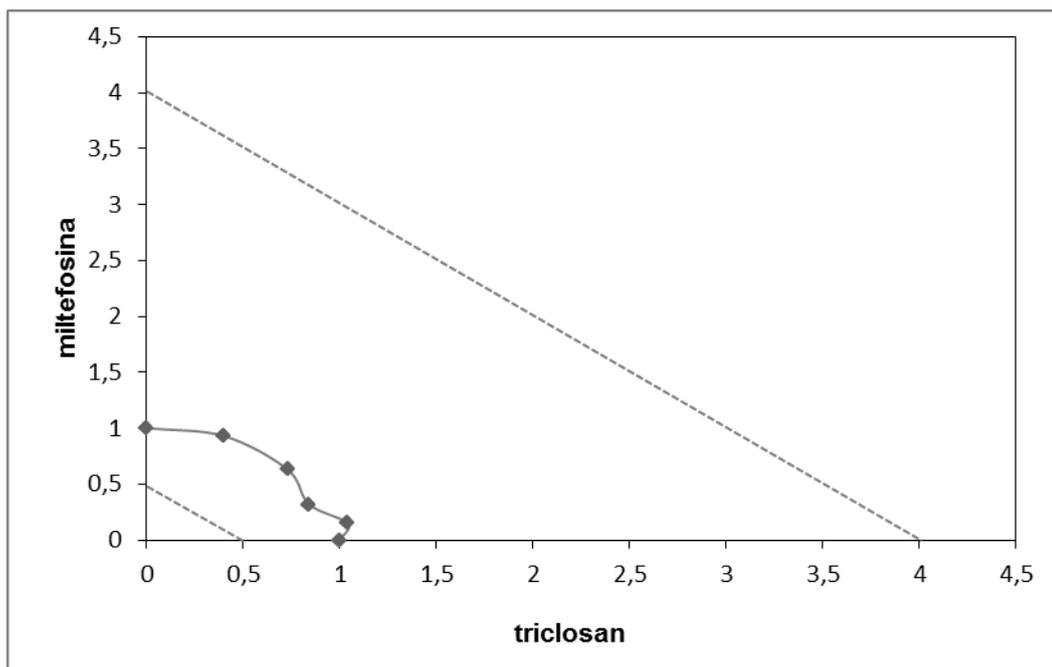


Figura 45: Isoblograma gerado com base nos valores de CIF da associação entre triclosan e miltefosina em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os pontos correspondentes às CIF das associações foram ligados por uma linha de tendência que se situou no intervalo entre 0,5 e 4, o qual foi identificado pelas linhas pontilhadas. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

4.5.3 Eficácia do triclosan no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*

Dois experimentos foram realizados utilizando formulações tópicas com e sem triclosan. Em um ensaio foi avaliada a eficácia da formulação creme base sem agente permeante contendo triclosan no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e em outro ensaio foi avaliado o possível dano que essas formulações poderiam causar em animais saudáveis.

No primeiro experimento, foram usadas formulações de creme base sem agente permeante com e sem triclosan 1%. O inóculo parasitário foi realizado na base da cauda e após 14 dias consecutivos de tratamento se

observou que o grupo tratado com creme sem agente permeante contendo triclosan 1% apresentou menores valores de medida (**Figura 46**). No 14º dia de tratamento, notou-se redução nas medidas da lesão de 7% (controle de veículo) e 10% (creme com triclosan), em relação ao grupo não tratado (grupo controle). No 28º dia, ou seja, 14 dias após o término do tratamento, as medidas da lesão obtiveram 7% (controle de veículo) e 12% (creme com triclosan) de redução em relação ao grupo não tratado. Os resultados obtidos por bioimageamento realizados no final do tratamento (14º dia), mostraram redução da carga parasitária em 19% no grupo tratado com creme (controle de veículo) e 89% no grupo tratado com creme e triclosan 1% em relação ao grupo controle não tratado (**Figura 47 e 48**). A diferença foi estatisticamente significativa entre o grupo tratado com creme e triclosan 1% e o grupo não tratado ($p < 0,02$).

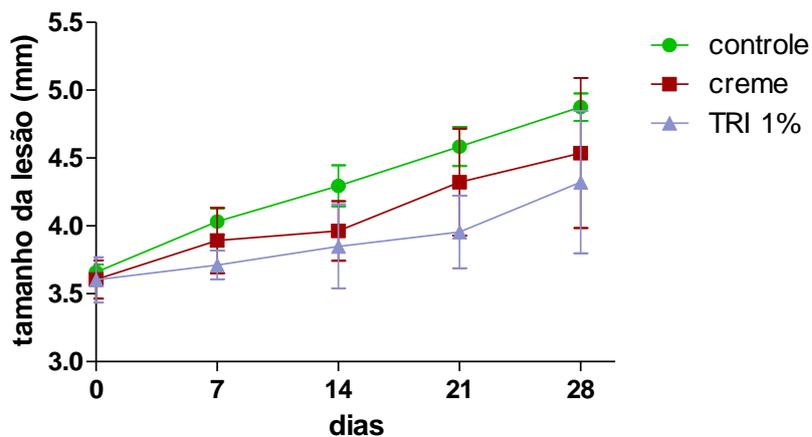


Figura 46: Evolução clínica do tamanho das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. O tempo zero indica o início do tratamento, ou seja, após 5 semanas de infecção. O tratamento foi realizado por 14 dias consecutivos. Os pontos indicam a média e o desvio padrão das medidas das lesões dos animais de cada grupo. Não houve diferença estatística entre os grupos. (n = 4/grupo).

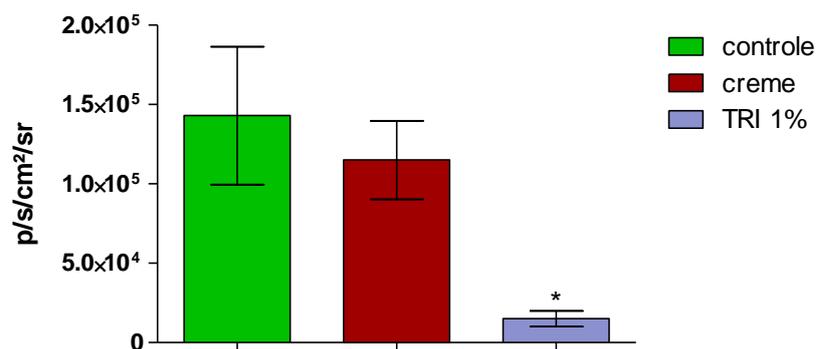


Figura 47: Determinação da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com creme e creme contendo triclosan 1% após 14 dias de tratamento e o grupo não tratado (controle). A carga parasitária foi determinada por bioluminescência da lesão. As barras indicam a média e o desvio padrão da bioluminescência das lesões de cada grupo. O valor de p é representado por * ($p < 0,02$) e representa diferença estatística em relação ao controle não tratado. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

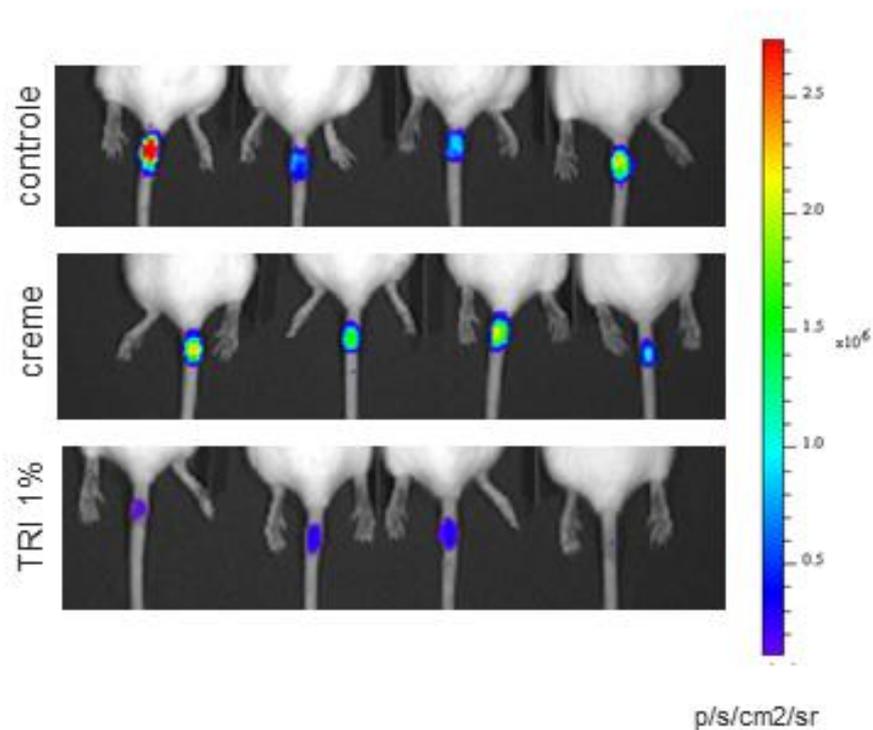


Figura 48: Imagem de bioluminescência de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* não tratados (controle), tratados com creme (controle de veículo) e tratados com creme e triclosan 1% após 14 dias de tratamento. p/s/cm²/sr: fótons/segundo/centímetro quadrado/esterradiano.

No segundo experimento, animais sadios não tratados e animais sadios tratados apenas creme sem agente permeante (controle de veículo) foram utilizados como controles do experimento. Um grupo foi tratado com creme sem agente permeante contendo triclosan 1% com a finalidade de pesquisar se havia ou não alteração tecidual. Os resultados obtidos a partir das análises histológicas não mostraram alteração histopatológica relevante nos tecidos avaliados (**Figura 49**).

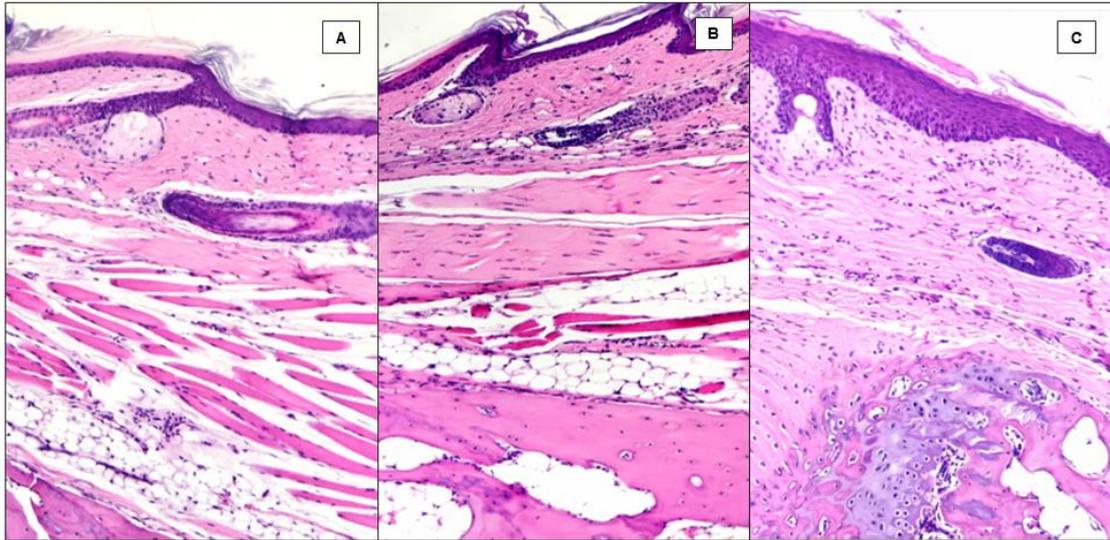


Figura 49: Secções histológicas de pele de animais saudáveis não tratados (A), tratados com creme base sem agente permeante (B) e tratados com creme base sem agente permeante contendo triclosan 1% (C). Fotografias de coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 100X.

5. Discussão

Com registro de milhões de novos casos ao ano, a leishmaniose cutânea está entre as doenças infecciosas mais importantes de nosso tempo (CDC, 2017; Uliana et al., 2017). Ainda que seja um importante problema de saúde pública no Brasil e nas Américas, dados publicados sobre o uso de novos medicamentos para tratar essa doença em nosso país são bastante limitados (Almeida e Santos, 2011).

O tratamento é uma questão importante na gestão da doença e há necessidade urgente de novos fármacos e/ou novos regimes de tratamento (Reimão et al., 2015). Um grande desafio e de extrema importância é realizar ensaios pré-clínicos que visem buscar fármacos mais efetivos, com baixa toxicidade, de fácil administração, de baixo custo e com menor tempo de tratamento.

Alguns modelos são usados para avaliar a eficácia de novos compostos anti-*Leishmania* antes dos ensaios clínicos (Mears et al., 2015). Para alcançar esse objetivo, estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são de extrema relevância. Apesar dos estudos *in vitro* e *ex vivo* apresentarem muitas vantagens sobre testes *in vivo*, como a obtenção de resultados mais rápidos e demanda de quantidade mínima do fármaco usado nos testes, é necessário verificar a eficácia do tratamento em animais infectados durante o processo de desenvolvimento de fármacos. Isso é necessário, uma vez que as previsões *in vitro* não são necessariamente transferidas para situações *in vivo*, da mesma forma que os resultados em modelos animais podem não ser totalmente preditivos da resposta em seres humanos (Mears et al., 2015). Mesmo que possa haver divergências entre os resultados pré-clínicos e clínicos, esses estudos ajudam a propor uma dose de arranque segura e eficaz para estudos clínicos, e sem testes pré-clínicos, não é possível elaborar estratégias para os ensaios em seres humanos (Guha, 2016).

Alguns critérios de seleção de fármacos para obter sucesso no tratamento da leishmaniose são sugeridos, como demonstração de valores de CE_{50} menores que 10 μ M contra formas amastigotas intracelulares, redução de 70% da carga parasitária no modelo animal infectado, e que seja utilizado por via não parenteral (Katsuno et al., 2015).

O desenvolvimento de fármacos é um processo caro e demorado (Clouser et al., 2010). Recentemente, o reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*) ganhou um lugar de destaque na pesquisa de novos fármacos, onde há a necessidade de rápida identificação de novas terapias para doenças que carecem de tratamento eficaz (Sun et al., 2016). O reposicionamento de fármacos é uma estratégia na qual se busca um novo uso para um fármaco já aprovado (Clouser et al., 2010). Além da vantagem de reduzir os custos de desenvolvimento e diminuir o tempo de descoberta, devido à disponibilidade de dados farmacocinéticos, toxicológicos e segurança clínica, os riscos associados ao desenvolvimento clínico são significativamente reduzidos com menos fases posteriores (Palit et al., 2013). Muitos fármacos usados para outras doenças, como miltefosina e anfotericina B, foram reposicionadas com sucesso na terapia da leishmaniose (Sarkar e Manna, 2015).

Desta forma, usando essa abordagem de reposicionamento de fármacos, foram testados quatro fármacos: amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan, os quais apresentaram atividade tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, sendo a forma amastigota intracelular mais relevante para descoberta de novos fármacos para essa doença. O fármaco mais ativo tanto em formas promastigotas e amastigotas intracelulares foi sertralina, sendo mais ativo que o fármaco padrão miltefosina. O fármaco menos ativo contra formas promastigotas foi triclosan, e o fármaco amitriptilina foi o menos ativo contra formas amastigotas intracelulares. O fármaco mais citotóxico em células NCTC foi sertralina e o menos citotóxico foi amitriptilina. Em relação ao índice de seletividade, o fármaco amitriptilina foi o que apresentou maior índice e o fármaco econazol o que apresentou o menor índice. Apesar dos

quatro fármacos estudados apresentarem atividade contra amastigotas intracelulares, nenhum deles apresentou índice de seletividade superior aos fármacos padrões utilizado neste estudo (anfotericina B e miltefosina).

O fármaco **amitriptilina** é um antidepressivo tricíclico, que em indivíduos deprimidos, exerce um efeito positivo sobre o humor, além de possui propriedades anticolinérgicas e sedativas (DrugBank, 2017; PubChem Compound, 2017). Um estudo publicado por Zilberstein e colaboradores (1990) demonstrou a atividade do fármaco amitriptilina contra formas promastigotas de *L. (L.) donovani*. Outro estudo realizado por Evans e Croft (1994) demonstrou sua atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) amazonensis*. Os dados obtidos no presente trabalho mostram atividade tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, corroborando os dados já observados nos estudos desenvolvidos por Zilberstein e colaboradores (1990) e Evans e Croft (1994).

Tentar compreender o mecanismo de ação deste fármaco foi uma das propostas desse trabalho. Quando se investigou o possível mecanismo de ação do fármaco amitriptilina, estudos empregando seu valor de CE₅₀ foram realizados com a finalidade de verificar possíveis danos em formas promastigotas. Considerando a primeira barreira da célula a membrana plasmática, nosso primeiro ensaio buscou determinar se o fármaco induzia algum dano na membrana do parasito. Nosso estudo utilizando a sonda iodeto de propídeo, não demonstrou alteração na integridade da membrana plasmática num período de até 60 minutos. Nossa próxima etapa foi avaliar se o fármaco induzia danos na mitocôndria do parasito; utilizando uma sonda fluorescente, foi observado que amitriptilina causou despolarização no potencial da membrana mitocondrial após 30 e 60 minutos de tratamento. Observou-se também, que a produção de espécies reativas de oxigênio permanecia inalterada após o tratamento com amitriptilina.

Dados de microscopia eletrônica de transmissão, confirmaram a ocorrência do dano mitocondrial logo após 15 minutos de incubação, caracterizado por uma alteração na mitocôndria, alteração morfológica da

célula (formato similar ao amastigota) e ausência de núcleo em algumas células analisadas após 15, 30 e 60 minutos de tratamento com amitriptilina. Com base nos dados, a análise ultraestrutural da célula confirmou o dano mitocondrial já visto a partir do ensaio fluorimétrico, sugerindo que a mitocôndria possa ser um possível alvo do fármaco.

As mitocôndrias são organelas onde ocorrem processos fisiológicos essenciais, e a principal característica delas é a fosforilação oxidativa, que proporciona nos organismos aeróbicos a maior parte da sua energia (Tomás e Castro, 2013). Os tripanosomatídeos possuem uma única mitocôndria com características únicas, como a presença de diferentes enzimas energéticas e antioxidantes e um arranjo específico de DNA mitocondrial (Menna-Barreto e Castro, 2014). Uma pequena, mas essencial parte das proteínas é codificada e produzida na mitocôndria, o que representa componentes específicos da cadeia respiratória e da maquinaria de tradução mitocondrial (Fidalgo e Gille, 2011). Além disso, outras funções importantes são atribuídas às mitocôndrias, como metabolismo de aminoácidos cruciais, biossíntese de esterol, homeostase de cálcio, oxidação de ácido graxo entre outras (Fidalgo e Gille, 2011; Tomás e Castro, 2013).

Na mitocôndria também podem ser geradas espécies reativas de oxigênio durante o processo de fosforilação oxidativa. Embora haja flutuações nos níveis basais de espécies reativas de oxigênio em resposta a estímulos, as espécies reativas de oxigênio são cruciais para a fisiologia da célula, e o estresse oxidativo eleva a concentração da mesma e precisa ser removido para prevenir toxicidade (Tomás e Castro, 2013). Porém, em nossos estudos, não houve aumento de ROS, sugerindo outro processo de morte celular além de estresse oxidativo.

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). Variações do potencial de membrana mitocondrial podem ser uma consequência de diversos eventos e curiosamente, inibidores do complexo II e III de

Leishmania causam uma dissipação de potencial de membrana mitocondrial (Fidalgo e Gille, 2011).

Devido às diferenças mitocondriais entre mamíferos e tripanossomatídeos, esta organela é uma excelente candidata à intervenção de fármacos (Menna-Barreto e Castro, 2014) e os dados obtidos no presente estudo sugerem que amitriptilina é promissora, uma vez que tem como possível alvo a mitocôndria, corroborando os dados apresentados por Zilberstein e colaboradores (1990).

Fármacos padrões como a pentamidina, usados na clínica das leishmanioses, também são descritos como causadores de danos do potencial da membrana mitocondrial (Cabezas et al., 2015).

Outro fármaco estudado neste trabalho foi o antifúngico **econazol**. Este fármaco pertence a uma importante classe de agentes quimioterapêuticos, chamada azóis, a qual possui amplo espectro de atividade contra leveduras e fungos filamentosos (Emani et al., 2017). Os azóis também têm sido reposicionados para tratar infecções causadas por protozoários, incluindo a leishmaniose (Emani et al., 2017). Um estudo realizado pelo nosso grupo (Mesquita et al., 2014) demonstrou a atividade de três fármacos imidazóis (bifonazol, clotrimazol e econazol) testados contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. Dentre os fármacos testados, econazol apresentou maior atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* quando comparado ao fármaco padrão miltefosina (Mesquita et al., 2014).

A via biossintética do ergosterol, o principal esterol presente em fungos, bem como em *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, é um alvo para alguns dos mais importantes fármacos antifúngicos (Croft et al., 2006). Os fármacos azóis atuam na via biossintética do ergosterol através da inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase (Emani et al., 2017). A inibição da biossíntese de ergosterol é cada vez mais reconhecida como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (Macedo-Silva et al., 2013). Nossos dados anteriores (Mesquita et al., 2014), demonstraram que o mecanismo de ação do econazol envolve dano à

membrana plasmática de promastigotas, levando a um aumento de espécies reativas de oxigênio, o que contribuiu para a morte dos parasitos.

Os dados obtidos no presente trabalho mostram pela primeira vez a atividade do fármaco econazol contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e corroboram os dados obtidos por Mesquita e colaboradores (2014). O valor de CE₅₀ obtido do fármaco econazol contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (L.) infantum*, foram similares, mesmo usando diferentes cepas de *Leishmania*. O estudo do mecanismo de ação não foi foco de investigação do presente trabalho, uma vez que este já foi descrito na literatura (Mesquita et al., 2014; Emani et al., 2017).

O fármaco **sertralina** foi outro agente antidepressivo estudado no presente trabalho (Kumar et al., 2006). Este fármaco inibe de forma seletiva a reabsorção de serotonina e apresenta atividade antifúngica, antimicrobiana, espermicida, anticancerígena, entre outras atividades (Sonne et al., 2013; Sarkar e Manna, 2015).

Além de seu mecanismo de ação clássico, inibindo a reabsorção de serotonina, evidências extensas sugerem que a sertralina possui outras atividades biológicas (Thumé e Frizzo, 2017). Entre estes efeitos biológicos adicionais, foi relatado que sertralina inibe canais de sódio e potássio, reduz a absorção de glutamato, aumenta os níveis de cálcio citosólico livre em células cancerígenas, além de induzir apoptose (Thumé e Frizzo, 2017).

Um estudo realizado por Palit e Ali (2008) mostrou que sertralina foi ativa *in vitro* contra formas promastigotas e *ex vivo* contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*. Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que o fármaco sertralina foi ativo tanto em formas promastigotas quanto amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, apresentando valores de CE₅₀ menores que o fármaco padrão miltefosina. Esses dados mostraram de forma inédita a atividade do fármaco sertralina frente à *L. (L.) amazonensis*, corroborando os dados obtidos com *L. (L.) donovani* por Palit e Ali (2008). Os valores de CE₅₀ obtidos contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* foram

mais efetivos do que os valores de CE_{50} obtidos por Palit e Ali (2008) em *L. (L.) donovani*.

O mecanismo de ação da sertralina não foi investigado no presente trabalho, uma vez que já haviam dados descritos na literatura sobre a ação desse fármaco em *Leishmania*. Segundo Palit e Ali (2008), sertralina induz a queda nos níveis de ATP citoplasmáticos e na taxa de consumo de oxigênio em promastigotas, envolvendo um modo semelhante a apoptose na morte celular dos parasitas. Ainda no mesmo estudo, sertralina também mostrou eficácia no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) donovani*, reduzindo aproximadamente 70% de carga parasitária no fígado e no baço, sugerindo que sertralina pode ser usada de forma promissora no tratamento oral da leishmaniose visceral (Palit e Ali, 2008).

O último fármaco estudado no presente trabalho foi **triclosan**, também conhecido como irgasana. Triclosan é um agente antimicrobiano e antifúngico usado em produtos de higiene pessoal, incluindo sabonetes, desodorantes, gel de banho, pasta de dente, enxaguante bucal, entre outros (Bhargava e Leonard, 1996; PubChem Compound, 2017). O fármaco triclosan possui atividade bacteriostática ou fungistática em baixas concentrações e bactericida em elevadas concentrações (Russell, 2003; Russell, 2004).

Um estudo realizado por Arango e colaboradores (2012) demonstrou a atividade do triclosan e de seus derivados sintéticos contra formas amastigotas axênicas de *L. (V.) panamensis*. Outro estudo realizado por Otero e colaboradores (2014) demonstrou a atividade do triclosan e de alguns derivados híbridos contra formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) panamensis*. Mais recente, um estudo mostrou atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) panamensis* e *T. cruzi* do fármaco triclosan e alguns derivados híbridos de ácido cafeíco (Otero et al., 2017). Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram de forma inédita a atividade do triclosan contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Os dados em amastigotas corroboram

os dados já apresentados em *L. (V.) panamensis*, porém nossos valores de CE₅₀ foram mais efetivos.

Uma pesquisa realizada por Villalaín e colaboradores (2001) sugere que os efeitos antibacterianos do triclosan são mediados por sua influência na estrutura da membrana, onde o fármaco é provavelmente incorporado. O mecanismo de ação do triclosan contra *Plasmodium* também assume o mesmo mecanismo observado em bactéria, onde ocorre a inibição da enoil redutase na via de síntese de ácido graxo (Surolia e Surolia, 2001). Outro estudo realizado por Vincent e colaboradores (2016) sugere que o tratamento com triclosan, quando ligado ao transportador NAD⁺, produz mais de 100 metabólitos. Quando analisados, verificou-se a redução na produção de metabólitos relacionados à biossíntese de poliamina, bem como alteração na produção de metabólitos relacionados à biossíntese de glutatona (Vincent et al., 2016). As poliaminas interagem eletrostaticamente com biomoléculas carregadas negativamente, como DNA, RNA, lipídios e proteínas ácidas, e sua falta pode tornar as membranas celulares e o DNA mais suscetíveis (Park e Igarashi, 2013). A ativação do catabolismo das poliaminas causa aumento de estresse oxidativo, contribuindo para danos celulares (Park e Igarashi, 2013). As ações do triclosan sobre o metabolismo dos ácidos graxos podem ser agravadas pelo aumento do estresse oxidativo, sendo que as alterações na biossíntese de poliaminas podem estar relacionadas com um efeito desestabilizador de membrana como sugerido por Villalain e colaboradores (2001) (Vincent et al., 2016).

Na tentativa de compreender o mecanismo de ação do fármaco triclosan em *Leishmania*, alguns ensaios foram realizados utilizando promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados no valor de seu CE₅₀. Considerando a membrana plasmática, a primeira barreira da célula, nosso primeiro ensaio buscou avaliar se triclosan induzia danos na membrana plasmática de promastigotas, utilizando a sonda iodeto de propídeo. Ao incubar os parasitos com triclosan por 30 minutos, pôde-se observar que a integridade da membrana plasmática parasitária foi alterada de forma significativa quando comparada ao controle não tratado. Nosso próximo

passo foi investigar se o fármaco triclosan causava dano à mitocôndria, utilizando a sonda rodamina 123. Os dados obtidos desse experimento mostraram que os parasitos tratados com triclosan por 30 minutos apresentaram despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Além disso, observou-se também que aos 30 minutos de tratamento com triclosan, a produção de espécies reativas de oxigênio foi reduzida de forma significativa, quando comparada ao controle, utilizando parasitos não tratados.

Os dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram que os parasitos tratados com triclosan por 15 minutos, apresentaram ruptura da membrana plasmática, com destruição total das organelas e extravasamento do material intracelular para o meio extracelular, corroborando os dados obtidos com as sondas fluorescentes. Baseado nesses dados apresentados, nossos estudos sugerem que o fármaco triclosan tem como alvo a membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A membrana plasmática de uma célula serve de barreira do ambiente extracelular, e é composta por uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas que regulam o trânsito de moléculas para dentro e fora da célula, onde se ocorrer rupturas ou perda da função pode levar ao comprometimento da homeostase celular, levando à morte celular (Blazek et al., 2015).

A membrana plasmática de *Leishmania* exibe algumas peculiaridades interessantes quando comparadas a outras células eucarióticas: (i) é fortemente carregada negativamente devido a altos níveis de lipofosfoglicano, um polissacarídeo aniônico que cobre mais de 60% da superfície; (ii) possui alto nível de atividade proteolítica; (iii) endocitose e exocitose são contidos em uma área especializada, conhecida como bolso flagelar; iv) composição lipídica é caracterizada por um percentual ligeiramente maior de fosfolipídios aniônicos do que as membranas padrão de mamíferos, e tem ergosterol em vez de colesterol (Diaz-Achirica et al., 1998). Os esteróis são componentes importantes da membrana celular fúngica e dos tripanossomatídeos e são vitais para a função e manutenção

celular (Chawla e Madhubala, 2010). Como principal esterol de membrana, os tripanosomatídeos sintetizam ergosterol e outros esteróis que são necessários para seu crescimento e viabilidade, e estes são ausentes em células de mamíferos, que por sua vez sintetizam colesterol. Portanto, com essas diferenças, a via biossintética do esterol em *Leishmania* é considerada um importante alvo para pesquisa de novos fármacos (Chawla e Madhubala, 2010). Com base nessas informações, podemos sugerir que triclosan pode ser um fármaco promissor no tratamento da leishmaniose cutânea, uma vez que tem como alvo a membrana plasmática do parasito. Atualmente, dois principais medicamentos utilizados para tratar leishmaniose (anfotericina B e miltefosina) têm ação sobre a membrana do parasito, sendo que a ação da anfotericina B resulta da capacidade de sua parte hidrofóbica em interagir com esteróis de membrana, formando assim um canal hidrofílico na face oposta, criando poros que alteram a permeabilidade da membrana (Cabezas et al., 2015), e miltefosina parece inibir a síntese de fosfatidilcolina e aumentar a síntese de fosfatidiletanolamina, sendo estes os dois principais fosfolipídios de membrana presentes em *Leishmania*; outros mecanismos também foram propostos, como a capacidade de induzir apoptose e ativar a resposta imune do hospedeiro (Cabezas et al., 2015).

A terapia combinada foi outra abordagem utilizada neste trabalho. Essa abordagem consiste em usar dois ou mais fármacos com efeitos sinérgicos ou aditivos com o objetivo de aumentar o espectro de atividade, eficácia terapêutica e tem sido utilizada para aumentar a taxa de sucesso no reposicionamento de fármacos (Sun et al., 2016; Uliana et al., 2017).

Intensamente estudada no tratamento de doenças complexas, esta estratégia tem potencial para melhorar a resposta ao tratamento (Wu et al., 2015). Idealmente, a terapia combinada reduzirá a dose dos fármacos e o tempo de tratamento, resultando em menor toxicidade e maior aderência ao tratamento, bem como redução dos custos e menor risco de seleção de parasitas resistentes (Uliana et al., 2017). Essas terapias têm sido cada vez mais reconhecidas como bem-sucedidas em curto prazo, mostrando-se mais potente do que a monoterapia (Kirk, 2013).

Um estudo sugere que a associação entre amitriptilina e tizanidina é mais rápida na melhora da cefaléia do que a monoterapia (Bettucci et al., 2006). Outro estudo mostrou que o efeito da terapia combinada com pregabalina e amitriptilina foi benéfico em pacientes com neuralgia grave do trigêmeo que não respondem ao tratamento primário (Taheri et al., 2015).

Outro estudo realizado por Chen e colaboradores (2014) avaliou *in vitro* a interação entre dois agentes antifúngicos, econazol e queleritina, contra isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol, onde se observou sinergia entre os fármacos estudados e nenhuma atividade antagonista (Chen et al., 2014).

A terapia combinada com sertralina e liotironina no tratamento de pacientes com depressão mostrou o aumento do efeito antidepressivo da sertralina pelo tratamento concomitante com liotironina sem aumento significativo dos efeitos adversos (Cooper-Kazaz et al., 2007). Outro estudo envolvendo pacientes com depressão crônica mostrou eficácia na combinação entre sertralina e bupropiona sem apresentar efeitos adversos. Os autores sugerem que a combinação foi eficaz devido ao sinergismo de dois mecanismos antidepressivos distintos envolvendo sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos (Marshall et al., 1995).

Um estudo realizado por Wohlrab e colaboradores (2007) mostrou que a aplicação tópica do triclosan com clorexidina foi benéfica no tratamento da dermatite atópica. Essa combinação em concentrações muito baixas oferece uma possível opção para minimizar o risco de efeitos colaterais, favorecendo a resolução da dermatite atópica (Wohlrab et al., 2007).

Na terapia das leishmanioses, vários estudos clínicos já demonstraram o potencial desta técnica. Dentre estes, o próprio antimônio pentavalente B e anfotericina B lipossomal já foram associados com miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral na África Oriental (Omollo et al., 2011). A associação entre anfotericina B e miltefosina também foi avaliada no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral co-infectados com HIV (DNDi, 2018). Outro estudo mostrou o tratamento

bem-sucedido de casos sem cura clínica de leishmaniose cutânea, usando uma combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol (Momeni e Aminjavaheri, 2003). Ainda, foi observado que o tratamento tópico de paromomicina associado à gentamicina obteve uma boa eficácia em modelo murino de leishmaniose cutânea (Grogl et al., 1999). Em estudos de combinações *in vitro* em leishmaniose cutânea, podemos citar que as interações entre tamoxifeno e anfotericina B *in vitro* e *ex vivo* foram aditivas ou indiferentes (Trinconi et al., 2014). Quando associados *in vivo*, também produzem efeitos aditivos em baixas doses de ambos os fármacos (Trinconi et al., 2014).

Notavelmente, em termos de benefícios, o reposicionamento de fármacos infere baixa toxicidade e quando usado em tratamento combinado pode mostrar eficácia aprimorada de forma aditiva ou sinérgica, permitindo o uso de baixas doses, o que potencialmente melhora a aderência à terapia (Chalmers, 1999).

No presente trabalho, as interações entre amitriptilina e anfotericina B, amitriptilina e miltefosina, econazol e miltefosina, sertralina e anfotericina B, sertralina e miltefosina e triclosan e miltefosina em formas promastigotas e/ou amastigotas intracelulares, foram consideradas aditivas ou indiferentes, conforme referência adotada (Odds, 2003). Apesar de não apresentar sinergismo em nenhuma das associações, os resultados das interações não apresentaram antagonismo, ou seja, em nenhuma das associações nenhum fármaco prejudicou a ação do outro, mostrando que nossos resultados podem ser promissores e podem evoluir para avaliação no modelo murino.

Camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* são rotineiramente utilizadas para avaliar a eficácia de diferentes tratamentos para leishmaniose cutânea, onde a infecção é realizada com injeções intradérmicas na base da cauda ou na pata, com promastigotas em fase metacíclica (Mears et al., 2015).

Na tentativa de melhorar os modelos experimentais, um teste rápido, simples e confiável que permite a determinação da atividade do fármaco no mamífero é necessário para o desenvolvimento de novos fármacos, o qual

requer a detecção e quantificação de amastigotas de *Leishmania* em diferentes células hospedeiras (Lang et al., 2005). Para quantificar a carga parasitária, tanto em ensaios *ex vivo* quanto *in vivo*, os genes repórteres oferecem um método que permite a detecção sensível de células metabolicamente ativas (Lang et al., 2005).

Os principais genes repórteres utilizados são β -galactosidase, proteína fluorescente verde e luciferase, sendo esse último um dos mais eficientes repórteres biológicos, que é produzido principalmente por animais marinhos e alguns insetos como vaga-lume (Oliveira, 2014). A enzima luciferase é catalisada pela oxidação da luciferina na presença Mg^{2+} e ATP em oxiluciferina, o que produz um curto flash de luz diretamente proporcional ao número de moléculas da enzima luciferase (Reimão et al., 2013; Mears et al., 2015).

A quantificação de bioluminescência *in vivo* parece ser um método efetivo para determinar a carga parasitária de camundongos infectados e avaliar a eficácia farmacológica (Reimão et al., 2013). Seu uso oferece várias vantagens em relação ao método convencional, pois possui natureza não destrutiva e não invasiva, e pode ser realizado repetidamente, o que permite que cada animal seja usado como seu próprio controle ao longo do tempo e reduzindo o número de animais por experimento (Reimão et al., 2013). No entanto, este método também possui desvantagens, uma vez que a técnica exige a administração intravenosa ou intraperitoneal do substrato luciferina para a detecção da atividade da luciferase, com tempo cronometrado com anestesia e aquisição de imagens, o que torna essa técnica de elevado custo (Reimão et al., 2013; Mears et al., 2015).

Um trabalho publicado por Reimão e colaboradores (2013) mostrou que a luminescência medida *in vivo* e *ex vivo* foi diretamente proporcional à carga parasitária estimada pelo método de diluição limitante e aos tamanhos de lesão e úlcera, validando o uso da luciferase como ferramenta quantitativa neste modelo.

Com base nas informações apresentadas, optou-se por dar continuidade aos estudos pré-clínicos utilizando fêmeas de camundongos

BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* de linhagem mutante expressora de luciferase. Nesse estudo, os fármacos amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan foram testados em diferentes doses e/ou vias de administração e/ou forma farmacêutica, uma vez que todos eles já haviam apresentado atividade em formas amastigotas intracelulares.

O fármaco amitriptilina apresentou o maior índice de seletividade dentre os fármacos estudados neste trabalho. Camundongos previamente infectados foram tratados com amitriptilina a 15 mg/kg/dia por 14 dias consecutivos usando gavagem oral. Ao final do experimento, observou-se que nas condições testadas, não houve eficácia no tratamento, tanto com relação à medida da lesão quanto com relação à carga parasitária estimada por bioimageamento (IVIS). Evans e colaboradores (1988) avaliaram a eficácia de um creme aquoso contendo amitriptilina no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e relataram falha terapêutica desta formulação, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

O fármaco amitriptilina apresenta afinidade pelos receptores muscarínicos e histamínicos e é rapidamente absorvida após administração oral (biodisponibilidade de 30 a 60% devido ao metabolismo de primeira passagem). Amitriptilina sofre metabolismo hepático que envolve principalmente desmetilação, levando à formação de seu principal metabólito ativo, nortriptilina (DrugBank, 2017).

Algumas hipóteses foram criadas para explicar a falha terapêutica ocorrida nesse estudo *in vivo*. O fármaco amitriptilina pode não ter alcançado o local em que o parasito se encontrava, sugerindo que outros estudos possam ser realizados, como por exemplo: a utilização de uma formulação diferente que contenha entrega direcionada e/ou outra via de administração. Além disso, a diferença observada nos resultados *in vitro* e *in vivo* pode ser explicada através da metabolização do fármaco amitriptilina em nortriptilina, onde seu principal metabólito pode não ter ação anti-*Leishmania*.

O fármaco econazol foi outro fármaco avaliado *in vivo*, uma vez que se mostrou promissor ao apresentar atividade contra formas amastigotas

intracelulares. Camundongos previamente infectados foram tratados com econazol nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg/dia VO (uma vez ao dia) por 28 dias consecutivos. Ao final do 28º dia do experimento, observou-se que nas condições testadas, houve redução tanto nas medidas das lesões quanto na carga parasitária, e também se pode observar que a atividade do econazol foi dose dependente. Apesar de não se observar diferença estatística significativa entre todos os grupos tratados com econazol em relação ao grupo controle, o grupo tratado com econazol na dose de 10 mg/kg/dia (VO) resultou em redução de 75% da carga parasitária.

Na literatura, um estudo realizado por Navin e colaboradores (1992) mostra dados da eficácia do cetoconazol no tratamento de pacientes infectados com *L. (L.) mexicana*. No mesmo estudo, os autores sugerem que pesquisas adicionais devem ser realizadas sobre o tratamento da leishmaniose com cetoconazol, bem como com outros imidazóis (Navin et al., 1992).

Nosso estudo demonstra pela primeira vez dados promissores da atividade do fármaco econazol no modelo *in vivo* de *L. (L.) amazonensis*, corroborando os dados disponíveis na literatura, que indicam que fármacos azólicos podem ser promissores no tratamento das leishmanioses. Nossos dados sugerem que futuros estudos utilizando diferentes doses e/ou vias de administração em conjunto com terapia combinada possam ser mais efetivos no tratamento da leishmaniose cutânea.

O fármaco sertralina também foi avaliado no modelo animal, uma vez que mostrou atividade contra formas amastigotas intracelulares superior ao fármaco padrão miltefosina. Além disso, esse fármaco já havia sido testado *in vivo* contra leishmaniose visceral, apresentando resultados promissores (Palit e Ali, 2008).

Camundongos previamente infectados foram tratados com sertralina utilizando diferentes doses, vias de administração e esquemas terapêuticos. Ao final do experimento, observou-se que nas condições testadas, nenhum tratamento com sertralina resultou em redução das medidas das lesões e da carga parasitária. Observou-se também que a via IP não é uma boa opção

para realizar períodos longos de tratamento com este fármaco, uma vez que se observou peritonite em alguns animais. Nosso estudo utilizando sertralina no tratamento da leishmaniose cutânea não corrobora o estudo descrito por Palit e Ali (2008) no tratamento da leishmaniose visceral. Essa discordância entre os resultados pode ser explicada pelo tropismo do parasito causado pelas diferentes espécies estudadas, pela farmacocinética do fármaco que talvez não atinja o local em que o parasito se encontrava. Além disso, como o fármaco sertralina é rapidamente metabolizado para desmetilsertralina, não se sabe se este metabólito ainda permaneça com a atividade anti-*Leishmania*, como observada em nossos estudos *in vitro*. Um estudo realizado em humanos por Yue e colaboradores (2016) mostrou que após a administração única de sertralina, na dose de 100 mg por via oral, a concentração plasmática máxima (C_{max}) foi de 42 ng/mL; este fato demonstra que a sertralina livre atinge níveis plasmáticos muito abaixo da concentração necessária para eliminar a *Leishmania*, segundo nossos estudos *in vitro* de CE₅₀. Assim, a falha terapêutica da sertralina em nosso modelo poderia ser justificada.

Outro fármaco testado foi o triclosan. Na literatura um trabalho sugere que estudos adicionais são necessários para avaliar se a atividade *in vitro* do triclosan contra *L. (V.) panamensis* também é observada no modelo *in vivo* (Otero et al., 2014). No presente trabalho, triclosan a 1% foi testado topicamente em formulação creme base (sem agente permeante). Um teste com camundongos sadios (não infectados) foi usado para avaliar se estas formulações mostravam algum dano nos órgãos estudados. Um grupo não tratado foi usado como controle, outro grupo tratado apenas com creme base (sem agente permeante) foi usado como controle de veículo e um grupo tratado com creme base com triclosan 1% (sem agente permeante) foi estudado. Os dados encontrados, não mostraram alterações histopatológicas nos órgãos estudados, bem como não se observou alterações histopatológicas nas caudas avaliadas dos três grupos testados. Com base nesses resultados, pode-se perceber que o uso dessa formulação

com triclosan 1%, nas condições adotadas, parece seguro para os camundongos.

Estudos prévios indicaram que o triclosan se mostrou bem tolerado por uma variedade de espécies, incluindo seres humanos (Bhargava e Leonard, 1996). Também foram estabelecidos perfis de toxicidade aguda, subaguda, subcrônica e crônica para determinar que o triclosan não é carcinogênico, mutagênico ou teratogênico e se observou que este fármaco é seguro no uso oral e tópico (Bhargava e Leonard, 1996).

Considerando os estudos já descritos por outros grupos sobre a segurança do triclosan, animais infectados com *L. (L.) amazonensis* foram tratados uma vez ao dia com creme base sem agente permeante e creme base sem agente permeante contendo triclosan 1% durante 14 dias consecutivos. Um grupo sem tratamento foi usado como controle do experimento. Ao final do tratamento (após 14 dias), pode-se observar que não houve diferença significativa nas medidas das lesões utilizando paquímetro, tanto com o grupo tratado apenas com creme quanto o grupo tratado com creme contendo triclosan 1% em relação ao grupo não tratado, mas houve redução significativa de 89% da carga parasitária no grupo tratado com triclosan 1% em relação ao grupo não tratado. Essa diferença entre os resultados encontrados em medidas e carga parasitária pode ser explicada, que mesmo a lesão não reduzindo seu tamanho de forma significativa quando comparado ao controle não tratado, isso não significa que os amastigotas estejam vivos dentro das células. Esse estudo demonstra pela primeira vez a atividade promissora do triclosan no modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea, e sugere que estudos adicionais com triclosan coadministrado com fármaco padrão em doses inferiores ao que se usa na monoterapia, possam ser uma nova alternativa de tratamento.

Recentemente, um estudo realizado por Bilslund e colaboradores (2018) mostrou um segundo alvo enzimático para a ação antimalárica do fármaco triclosan. Com isso, candidatos a fármacos com atividade em vários estágios da doença é importante no desenvolvimento de um novo fármaco, pois a dupla ação do fármaco triclosan em alvos enzimáticos distintos em

diferentes domínios do metabolismo reduz o desenvolvimento de resistência, gerando esperança na descoberta de uma nova classe de medicamentos antimaláricos (Bilsland et al.,2018).

A terapia tópica na leishmaniose cutânea tem se mostrado promissora, uma vez que oferecem vantagens à terapia sistêmica, tais como, facilidade de administração, redução de efeitos adversos e custo-efetividade (Garnier e Croft, 2002). Formulações de modo geral foram pesquisadas para esta finalidade neste trabalho, concluindo-se que uma formulação creme seria mais adequada ao nosso modelo por ser facilmente aplicado em qualquer parte do corpo, ser segura para os pacientes, além de seu uso ser conveniente em qualquer faixa etária (Sahu et al., 2016). Por ser menos lipofílica do que as pomadas e ter uma fase hidrofílica, isso facilita e acelera a absorção a pele. Os cremes são formas farmacêuticas semissólidas, formada por uma fase lipofílica e uma fase hidrofílica, e contém um ou mais princípios ativos dissolvidos ou dispersos em uma base apropriada, que é normalmente usada para aplicação externa na pele ou nas membranas mucosas (Gupta e Garg, 2002; Ueda et al., 2009).

Dependendo das propriedades físico-químicas, do local de ação desejado e das estratégias de formulação do fármaco, os fármacos incorporados nas formulações podem mostrar atividade nas camadas mais superficiais ou através da penetração em camadas mais profundas para chegar ao local de ação ou através de distribuição sistêmica (Chang et al., 2013).

A principal limitação da via tópica é a dificuldade de permeação do fármaco através da pele e existem várias melhorias físicas (iontoforese, eletroporação, ultra-som, microporação e micro-agulhas) e químicas (ácido graxo, álcoois, sulfóxidos e surfactantes) que intensificam o grau de penetração do fármaco (Kouchak e Handali, 2014). O estado da pele também pode influenciar (facilitar ou dificultar) na permeação do fármaco, o que deve ser considerado no tratamento das doenças tegumentares.

A terapia tópica para leishmaniose cutânea foi recomendada por ter potencialmente baixo custo, ser de fácil de administração, ter risco reduzido

de efeitos sistêmicos secundários, ter maior aderência ao tratamento e por não necessitar de complexa infraestrutura do sistema de saúde (Trinconi et al., 2017). Embora o tratamento tópico possa ter vantagens atraentes, em vários casos pode não ser considerado eficaz se aplicado como monoterapia. Neste caso, o uso de um agente tópico junto com um fármaco sistêmico representa uma interessante opção que deve ser mais investigada (Uliana et al., 2017; Trinconi et al., 2017).

Analisando de forma geral os resultados *in vivo*, pode-se observar que os fármacos amitriptilina e sertralina, não apresentaram atividade *in vivo* em nenhum esquema terapêutico adotado neste trabalho. Os fármacos econazol por via oral (10 mg/kg/dia) e creme com triclosan 1% via tópica resultaram em redução da carga parasitária, onde econazol mostrou tendência biológica, mas não estatisticamente. Já o creme com triclosan 1% reduziu o parasitismo de forma estatisticamente significativa e houve processo de cicatrização nos animais tratados com essa formulação. Por conta disso, isso encontra as necessidades sugeridas pelo DNDi (2018), onde o fármaco para tratar leishmaniose cutânea precisa ser seguro, de uso tópico ou oral, ser acessível, cicatrizar as lesões sem deixar cicatrizes profundas e que possa ser administrado no serviço de atenção primária ou pelo paciente.

6. Conclusões

- Os fármacos estudados (amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan) apresentaram atividade tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.
- Os fármacos estudados apresentaram citotoxicidade em células de mamífero, demonstrando índice de seletividade do fármaco amitriptilina>sertralina>triclosan> econazol frente à *L. (L.) amazonensis*.
- A ação letal do fármaco amitriptilina e triclosan em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sugere que amitriptilina tenha como alvo a mitocôndria, considerando a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, e sugere que triclosan induz alteração na integridade da membrana plasmática. Os estudos realizados por microscopia eletrônica de transmissão mostraram alterações ultraestruturais compatíveis aos resultados obtidos nos ensaios fluorimétricos.
- As associações entre os fármacos estudados (amitriptilina, econazol, sertralina e triclosan) e/ou os fármacos padrões anfotericina B e/ou miltefosina, contra formas promastigotas e/ou amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, foram classificadas como aditivas ou indiferentes.

- Nos estudos *in vivo* utilizando camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*, os fármacos amitriptilina e sertralina não apresentaram redução na medida da lesão e da carga parasitária quando comparados ao grupo não tratado. Já os fármacos econazol (10 mg/kg/dia) por via oral e a formulação creme base com triclosan 1% por via tópica apresentaram redução da carga parasitária quando comparado ao grupo não tratado, mas somente a formulação com triclosan 1% apresentou redução estatisticamente significativa.
- Os dados descritos pela primeira vez no modelo *in vivo*, sugerem que futuros estudos utilizando terapia combinatória com fármacos já utilizados na clínica das leishmanioses possam ser promissores como uma nova alternativa de tratamento.

7. Referências Bibliográficas

Aguiar MG, Pereira AM, Fernandes AP, Ferreira LA. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (L.) amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 11:4699-704.

Almeida OLS, Santos JB. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 2011; 3:497-506.

Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GL, Melo MN et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of leishmania in skin. *PLoS One* 2013; 5:e63343.

Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Dos Santos Faioes V, Pereira TM, Silva RL, Leon LL et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018; 23:967-996.

Angrimani DSR, Losano JDA, Rui BR, Bicudo LC, Andrade AFC, Arruda RP et al. Tools for evaluating the functionality of sperm mitochondria. *Rev Bras Reprod Anim* 2015; 39:277-283.

Arango V, Domínguez JJ, Cardona W, Robledo SM, Muñoz DL, Figadere B et al. Synthesis and leishmanicidal activity of quinoline - triclosan and quinoline-eugenol hybrids. *Med Chem Res* 2012; 21:3445-3454.

Bastos MM, Boechat N, Gomes ATPC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAC. The use of porphyrins in photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. *Rev Virtual Quim* 2012; 3:257-267.

Bettucci D, Testa L, Calzoni S, Mantegazza P, Viana M, Monaco F. Combination of tizanidine and amitriptyline in the prophylaxis of chronic tension–type headache: evaluation of efficacy and impact on quality of life. *The Journal of Headache and Pain* 2006; 1:34-36.

Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control* 1996; 3:209-18.

Bhargava P, Singh R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012; 2012:626838.

Bilsland E, van Vliet L, Williams K, Feltham J, Carrasco MP, Fotoran WL, Cubillos EFG, Wunderlich G, Grotli M, Hollfelder F, Jackson V, King RD, Oliver SG. *Plasmodium* dihydrofolate reductase is a second enzyme target for the antimalarial action of triclosan. *Sci Rep* 2018; 1:1038.

Blazek AD, Paleo BJ, Weisleder N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 2015; 30:438-48.

Cabezas Y, Legentil L, Robert-Gangneux F, Daligault F, Belaz S, Nugier-Chauvin C et al. *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org Biomol Chem* 2015; 21:8393-404.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Parasites Home: Resources for Health Professionals: disease / leishmaniasis. [acesso em 29 de setembro 2017]. Disponível em https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Parasites – Leishmaniasis: Epidemiology & Risk Factors. [acesso em 28 de janeiro de 2017]. Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>.

Chalmers J. The importance of drug combinations for effective control of hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999; 21:875-84.

Chang RK, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* 2013; 1:41-52.

Charlton RL, Rossi-Bergmann B, Denny PW, Steel PG. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. *Parasitology* 2017; 14:1-18.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;1-2:7-12.

Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. *J Parasit Dis* 2010; 1: 1-13.

Chen Z, Li X, Wu X, Wang W, Wang W, Xin M et al. Synergistic activity of econazole-nitrate and chelerythrine against clinical isolates of *Candida albicans*. *Iran J Pharm Res* 2014; 2: 567-73.

Chiang AP, Butte AJ. Systematic evaluation of drug-disease relationships to identify leads for novel drug uses. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 5:507-10.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, Silva RM, Gadelha Yamashita EP, Oliveira Penna G et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous

leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 2:255-60.

Clouser CL, Patterson SE, Mansky LM. Exploiting drug repositioning for discovery of a novel HIV combination therapy. *J Virol* 2010; 18:9301-9.

Cooper-Kazaz R, Apter JT, Cohen R, Karagichev L, Muhammed-Moussa S, Grupper D, Drori T et al. Combined treatment with sertraline and liothyronine in major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 6:679-88.

Costa Filho AV, Lucas IC, Sampaio RN. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev da Soc Bras de Med Trop* 2008; 4:424-427.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 1:111-26.

Díaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem J* 1998;1:453-60.

DNDi. Drug for Neglected Diseases initiative. DNDi's strategy for cutaneous Leishmaniasis. [acesso e 25 de fevereiro de 2018]. Disponível em <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/dndi-strategy-cl/>.

DNDi. Drug for Neglected Diseases initiative. New treatments for HIV/VL. [acesso em 23 de fevereiro de 2018]. Disponível em <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/hivvl/>.

DNDi. Drug for Neglected Diseases initiative. Visceral Leishmaniasis: Estratégia da DNDi para na America Latina. [acesso em 29 de julho de 2013]. Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmanioses/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>.

DrugBank. DrugBanck. Amitriptyline. [acesso em 02 de fevereiro de 2017]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00321>.

DrugBank. DrugBanck. Sertraline. [acesso em 04 de fevereiro de 2017]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01104>.

DrugBank. DrugBanck. Triclosan. [acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08604>

Drugs. Drugs.com Knowmore.Besure. Home. Profissionais. FDAPI: Amitriptyline. [acesso em 02 de fevereiro de 2017]. Disponível em <https://www.drugs.com/pro/amitriptyline.html>.

Drugs. Drugs.com Knowmore.Besure. Home. Profissionais. FDAPI: Sertraline. [acesso em 04 de fevereiro de 2017]. Disponível em <https://www.drugs.com/dosage/sertraline.html>.

Duarte MC, Reis Lage LM, Lage DP, Mesquita JT, Salles BC, Lavorato SN et al. An effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016; 217:81-8.

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.

Emami S, Tavangar P, Keighobadi M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. *Eur J Med Chem* 2017;135: 241-259.

Evans AT, Croft SL. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. *Biochem Pharmacol* 1994; 3:613-6.

Evans AT, Croft SL, Peters W. Failure of chlorpromazine or amitriptyline ointments to influence the course of experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 2:226.

Ferreira CC, Marochio GG, Partata AK. Estudo sobre a leishmaniose tegumentar americana: com enfoque na farmacoterapia. *Revista Científica do ITPAC* 2012; 5:4.

Ferreira DD. Reposicionamento de fármacos e estudo de novas combinações terapêuticas no tratamento etiológico da doença de Chagas. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo; 2014.

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.

Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PLoS One 2011; 2:e14666.

Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Investig Drugs 2002; 4:538-44.

Gil ES, Cunha LC, Paula JR, Bezerra JCB, Aguiar FA. Leishmaniasis: therapeutic options and molecular targets. Vita et Sanitas 2007; 1:1.

Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 1:71-80.

Grogl M, Schuster BG, Ellis WY, Berman JD. Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. J Parasitol 1999; 2:354-9.

Guha R. Preclinical pharmacology and toxicology: an important aspect in /drug discovery. Adv clin Toxic 2016; 1:1.

Gupta P and Garg S. Recent Advances in Semisolid Dosage Forms for Dermatological Application 2002;1.

Gupta UD, Vemuri N, Gupta P, Kumar V, Tanushree P, Khuller GK. Efficacy of moxifloxacin & econazole against multidrug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* in murine model. Indian J Med Res 2015; 3:323-9.

Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. Sci Transl Med 2015; 290:290ra89.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol 2006; 9:439-45.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Van Huijsduijnen R H, Kaneko T, Kita K et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nat Rev Drug Discov 2015; 11:751-8.

Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasit Vectors 2017; 1:287.

Kirk R. Targeted therapies: the maths behind combination therapy. Nat Rev Clin Oncol 2013; 9:488.

Kouchak M, Handali S. Effects of various penetration enhancers on penetration of aminophylline through shed snake skin. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2014; 1:24-9.

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.

Kumar VS, Sharma VL, Tiwari P, Singh D, Maikhuri JP, Gupta G et al. The spermicidal and antitrichomonas activities of SSRI antidepressants. Bioorg Med Chem Lett 2006; 9: 2509-12.

Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. Cell Microbiol 2005; 3: 383-92.

López-Vélez R, Videla S, Márquez M, Boix V, Jiménez-Mejías ME, Górgolas M et al. Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2004; 3:540-3.

Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 2013;12: e83247.

Machado PA. Efeito de bioisómeros do reveratrol complexados a metal em espécies de *Leishmania* associadas à leishmaniose cutânea e estudo do mecanismo de morte do parasito [tese]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2017.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 12:e912.

Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2007; 6:788-93.

Mandal A, Sinha C, Kumar Jena A, Ghosh S, Samanta A. An investigation on *in vitro* and *in vivo* antimicrobial properties of the antidepressant: amitriptyline hydrochloride. *Braz J Microbiol* 2010; 3:635-45.

Marshall RD, Johannet CM, Collins PY, Smith H, Kahn DA, Douglas CJ. Bupropion and sertraline combination treatment in refractory depression. *J Psychopharmacol* 1995; 3:284-6.

Martins MRFM, Veiga F. Permeation enhancers in transdermal drug delivery systems: a new application of cyclodextrins. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 38:1.

McRae AL, Brady KT. Review of sertraline and its clinical applications in psychiatric disorders. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 5:883-92.

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A review: the current *in vivo* models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:9.

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.

Mesquita JT, da Costa-Silva TA, Borborema SE, Tempone AG. Activity of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Acta Trop* 2014; 3: 666-73.

Mesquita JT. Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum*. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo; 2013.

Mesquita JT, Pinto EG, Taniwaki NN, Galisteo AJ Jr, Tempone AG. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Acta Trop* 2013; 3:666-73.

Miguel DC. Caracterização da atividade de tamoxifeno no tratamento da leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.

Momeni AZ, Aminjavaheri M. Successful treatment of non-healing cases of cutaneous leishmaniasis, using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. *Eur J Dermatol* 2003; 1:40-3.

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

MS. Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana. Diagnóstico clínico e diferencial. Brasília; 2006.

MS. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília; 2017.

Muijsers RB, Plosker GL, Noble S. Sertraline: a review of its use in the management of major depressive disorder in elderly patients. *Drugs Aging* 2002; 5:377-92.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajón JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 1992; 3: 528-34.

Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Júnior RM, Guerra JA, Ferreira LC et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 2011; 6:1092-101.

NM. *Nature Medicine. Mechanism Matter*. 2010; 16:4.

No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop* 2016; 155:113-23.

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

Oliveira A, Mesquita JT, Tempone AG, Lago JH, Guimarães EF, Kato MJ. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Exp Parasitol* 2012; 3:383-7.

Oliveira JC. Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.

Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EA, Younis BM, Abuzaid AA et al. Safety and efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2011; 12:166.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis, 2010. [acesso em 15 de setembro de 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.

Otero E, García E, Palacios G, Yepes LM, Carda M, Agut R, Vélez ID, Cardona WI, Robledo SM. Triclosan-cafeic acid hybrids: Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem* 2017; 1:73-83.

Otero E, Vergara S, Robledo SM, Cardona W, Carda M, Vélez ID et al. Synthesis, leishmanicidal and cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. *Molecules* 2014; 9:13251-66.

PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis. [Acesso em 29 de agosto de 2017]. Disponível em:http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754).

Palit P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother 2008; 5:1120-4.

Palit P, Mandal SC, Mandal NB. Reuse of Old, Existing, Marketed Non-antibiotic Drugs as antimicrobial agents: a new emerging therapeutic approach. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education 2013; 1883-1892.

Palomino JC, Martin A. Is repositioning of drugs a viable alternative in the treatment of tuberculosis? J Antimicrob Chemother 2013; 2:275-83.

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.

Park MH, Igarashi K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. Biomol Ther (Seoul) 2013; 1:1-9.

Penna GO, Domingues CMAS, Siqueira JB Jr, Elkhoury ANSM, Cechinel MP, Grossi MAF et al. Dermatological diseases of compulsory notification in Brazil. An Bras Dermatol 2011; 5:865-77.

Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis 2014; 7:e2977.

PS. Portal da Saúde. Descrição da doença. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>.

PubChem Compound. Amitriptyline. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2160#section=Top>.

PubChem Compound. Amphotericin B. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965#section=Top>

PubChem Compound. Econazole. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3198#section=Top>.

PubChem Compound. Glucantime. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64953#section=Top>

PubChem Compound. Miltefosine. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3599#section=Top>

PubChem Compound. Paromomycin. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em PubChem Compound. Amitriptyline. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2160#section=Top>.

PubChem Compound. Pentamidine. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em PubChem Compound. Amitriptyline. [Acesso em 30 de agosto

de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735#section=Top>

PubChem Compound. Sertraline. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68617>.

PubChem Compound. Triclosan. [Acesso em 30 de agosto de 2017]. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564#section=Top>.
Quim Nova 2003; 26:550-555.

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.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 2008; 3:659-61.

Reimão JQ, Miguel DC, Taniwaki NN, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene. PLoS Negl Trop Dis 2014; 5:e2842.

Reimão JQ, Oliveira JC, Trinconi CT, Cotrim PC, Coelho AC, Uliana SR. Generation of luciferase-expressing *Leishmania infantum chagasi* and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging. PLoS Negl Trop Dis 2015; 2:e0003556.

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.

Reimão JQ, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Kalil SP, Uliana SR. Parasite burden in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *J Microbiol Methods* 2013; 93:95-101.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 9:581-96.

Russell AD. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J Antimicrob Chemother* 2003; 5:750-63.

Russell AD. Whither triclosan? *J Antimicrob Chemother* 2004; 5:693-5.

Sahu T, Patel T, Sahu S, Gidwani B. Skin Cream as Topical Drug Delivery System: A Review. *J Pharm Biol Sci* 2016; 5: 149-154.

Sarkar P, Manna M. Anti-leishmanial activities of some antidepressant drugs. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences* 2015; 1: 5-12.

Scariot DB, Britta EA, Moreira AL, Falzirolli H, Silva CC, Ueda-Nakamura T et al. Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. *Front Microbiol* 2017; 8:255.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci* 2017; 18:6.

Silva JA, Apolinário AC, Souza MSR, Damasceno BPGL, Medeiros ACD. Cutaneous administration of drugs: challenges and strategies for the development of transdermal formulations. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 2010; 3:125-131.

Silva RE, Toledo A Júnior, Senna MC, Rabello A, Cota G. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 8: 512-6.

Sonne C, Carlsson J, Eiklit A, Mortensen EL, Ekstrøm M. Treatment of traumatized refugees with sertraline versus venlafaxine in combination with psychotherapy - study protocol for a randomized clinical trial. *Trials* 2013; 14:137.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2004; 9:1266-72.

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.

Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2017; 1:82.

Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 6:e2278.

Sun W, Sanderson PE, Zheng W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today* 2016; 7:1189-95.

Surolia N, Surolia A. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med* 2001; 7:167-73.

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

Taheri A, Firouzi-Marani S, Khoshbin M, Beygi M. A retrospective review of efficacy of combination therapy with pregabalin and carbamazepine versus pregabalin and amitriptyline in treatment of trigeminal neuralgia. *Anaesthesia, Pain & Intensive Care* 2015; 2220-5799.

Tempone AG, Ferreira DD, Lima ML, Costa Silva TA, Borborema SET, Reimão JQ et al. Efficacy of a series of alpha-pyrone derivatives against *Leishmania (L.) infantum* and *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem* 2017;139:947-960.

Thalhofer CJ, Graff JW, Love-Homan L, Hickerson SM, Craft N, Beverley SM et al. *In vivo* imaging of transgenic *Leishmania* parasites in a live host. *J Vis Exp* 2010;41.

Thumé IS, Frizzo ME. Sertraline induces toxicity and behavioral alterations in planarians. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 5792621.

Trinconi CT, Reimão JQ, Bonano VI, Espada CR, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK et al. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 2017; 9: 1-7.

Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC, Uliana SR. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 5:1314-22.

Trinconi CT, Reimão JQ, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Uliana SR. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 5:2608-13.

Ueda CT, Shah VP, Derdzinsky K, Ewing G, Flynn G, Maibach H et al. Topical and Transdermal Drug Products.

Topical and Transdermal Drug Products. Pharmacopeial Forum 2009; 35:3

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.

Veiga IG. Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios. [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 2012.

Villalaín J, Mateo CR, Aranda FJ, Shapiro S, Micol V. Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan. Arch Biochem Biophys 2001; 1: 128-36.

Vincent IM, Ehmann DE, Mills SD, Perros M, Barrett MP. Untargeted metabolomics to ascertain antibiotic modes of action. Antimicrob Agents Chemother 2016; 4: 2281-91.

WHO. World Health Organization. Epidemiological situation. [Acesso em 29 de setembro de 2017] Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. [Acesso em 29 de agosto de 2017]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

WHO. World Health Organization. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2015. [Acesso em 29 de setembro de 2017]

Disponível em
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015.png.

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

Wohlrab J, Jost G, Abeck D. Antiseptic efficacy of a low-dosed topical triclosan/chlorhexidine combination therapy in atopic dermatitis. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 2:71-6.

Wu M, Sirota M, Butte AJ, Chen B. Characteristics of drug combination therapy in oncology by analyzing clinical trial data on ClinicalTrials.gov. *Pac Symp Biocomput* 2015; 68-79.

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

Yue XH, Wang Z, Tian DD, Zhang JW, Zhu K, Ye Q. Determination of sertraline in human plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci* 2016; 2:195-9.

Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 7:3758-66.

Zilberstein D, Liveanu V, Gepstein A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem Pharmacol* 1990; 5:935-40.

Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today* 2017; 17: 30005-3.

8. Anexo



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



ANEXO E

São Paulo, 23 de setembro de 2016.

Protocolo 04/2016

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “Estudo pré-clínico racional de novos candidatos a fármacos em protozooses negligenciadas utilizando abordagens farmacocinéticas”, sob a responsabilidade de **André Gustavo Tempone Cardoso**, Pesquisador Científico do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **60ª** reunião realizada em **13/09/2016**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	13/09/2016 a 01/06/2020
---------------------	-------------------------

Espécie	Camundongos heterogênicos
Linhagem	Swiss
Nº de animais	60
Idade	19 a 21 semanas
Peso	18 gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério IAL

Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	Balb/c
Nº de animais	129 machos e 48 fêmeas
Idade	19 a 21 semanas
Peso	18 gramas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar - Salas 1102
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 - e-mail: ceua@ial.sp.gov.br



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



Espécie	Hamster
Linhagem	Sírio dourado
Nº de animais	90
Idade	20-25 semanas
Peso	30 a 40 gramas
Sexo	Machos
Origem	Biotério IAL

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar - Salas 1102
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2857 - e-mail: ceua@ial.sp.gov.br