CRISTIANA DE MELO TRINCONI TRONCO

**TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DE
LEISHMANIOSE: ATIVIDADE EM ESQUEMAS
TERAPÊUTICOS COMBINADOS E ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CRISTIANA DE MELO TRINCONI TRONCO

**TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE:
ATIVIDADE EM ESQUEMAS TERAPÊUTICOS COMBINADOS
E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Silvia Reni Bortolin Uliana

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Tronco, Cristiana de Melo Trinconi.

Tamoxifeno no tratamento de leishmaniose: atividade em esquemas terapêuticos combinados e estudo de mecanismo de ação / Cristiana de Melo Trinconi Tronco. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Quimioterapia de leishmanioses.

Versão do título para o inglês: Tamoxifen in leishmaniasis treatment: activity in combined therapeutic schemes and study of mechanism of action.

1. *Leishmania* 2. Tamoxifeno 3. Terapia combinada 4. Esfingolipídios 5. Quimioterapia 6. Inositol I. Uliana, Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0169/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristiana de Melo Trinconi Tronco.

Título da Tese: Tamoxifeno no tratamento de leishmaniose: atividade em
esquemas terapêuticos combinados e estudo de
mecanismo de ação.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **178** nas fls. **138** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Silvia Reni Bortolin Uliana**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Identificação e estudo de fármacos ou esquemas alternativos para o tratamento de leishmaniose*" do qual participam o(s) aluno(s), **Juliana Quero Reimão, Adriano Cappellazzo Coelho, Cristiana Trinconi Tronco, Caroline Ricce Espada**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **03.12.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 04 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.060.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 33/07/CEEA datado de 27.03.07, por solicitação da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Cristiana de Melo Trinconi** ao projeto de pesquisa "*Estudo de novas abordagens quimioterápicas para o tratamento de leishmaniose*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 14 de setembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEEA- ICB/USP

Dedico esta Tese de Doutorado aos meus pais, José Luis e Rita, pela confiança, apoio e amor verdadeiro que me encorajam; às minhas irmãs, Camila e Carolina, amigas verdadeiras e muito fiéis; e não poderia deixar de incluir minha princesinha Luiza, uma nova forma de amor que estou adorando experimentar.

Dedico ainda este trabalho ao meu esposo, Victor, por me incentivar a crescer a cada dia e mostrar que o amor verdadeiro existe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Professora Dra. Silvia Uliana. Agradeço imensamente todo o carinho, dedicação e paciência dispensados à minha formação. Os ensinamentos adquiridos durante todos estes anos me tornaram uma nova pessoa, totalmente diferente daquela garota de cabelos vermelhos que te encontrou pela primeira vez em 2011. Você contribuiu imensamente para minha formação profissional e também pessoal. Gostaria de enfatizar aqui a minha admiração por você. Tenho diversos motivos para isto, mas os principais são a sua sabedoria, confiança, respeito e simplicidade. Obrigada por me ensinar o quanto a ciência é mágica e divertida.

Aos colegas de bancada Adriano (Altinho) Coelho, Carol Espada, Jordana Oliveira e Juliana Reimão, pela companhia, por todas as discussões científicas sobre meus experimentos a qualquer momento do dia, por todos os almoços, por todos os bate-papos extremamente produtivos, além de todo o carinho, amor e dedicação dispensados à minha pessoa. Por tudo isto (e muito mais), sou muito grata a vocês.

Agradeço a Jenicer pela acolhida, apoio e convivência durante todos estes anos.

Aos demais colegas de trabalho que passaram rapidamente por nosso laboratório: Grazzi, Ana, Amanda, Lucas, Victor e outros que provavelmente me esqueci. Meu muito obrigada!

A todos os funcionários do ICB, obrigada pelo carinho e trabalho constante.

Ao Prof. Alejandro Katzin, por disponibilizar não só seu laboratório e equipamentos, mas seus conhecimentos e experiências.

À professora Beatriz Stolf e toda sua equipe, por todos os conselhos e trocas de conhecimentos durante nossas reuniões semanais.

Ao professor Ariel Silber e equipe, pela colaboração e ensinamentos para a realização da caracterização do transportador de inositol de *L. amazonensis*. Muito obrigada!

A todos docentes do departamento e seus respectivos grupos de pesquisa. Agradecimento especial a Carlos Winter, Tania Katzin, Marta Teixeira, Marcelo Urbano, Carsten, Cláudio Marinho pelas conversas e auxílios dispensados a mim durante todos estes anos. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Norton Heise, pela grande ajuda e orientação sobre os experimentos de mecanismo de ação. Fico muito grata por todas as discussões fantásticas sobre esfingolipídios. Foi um grande prazer estabelecer colaboração com um profissional como você!

À FAPESP, pelo apoio financeiro por meio da bolsa de doutorado e da reserva técnica.

A todos os meus amigos! Alguns longe, outros perto, mas todos sempre presentes e fiéis. Obrigado por mostrar sempre o verdadeiro sentido da vida.

Ao meu esposo, Victor. Muito obrigada por me apoiar, confiar na minha competência e sempre me incentivar a enfrentar novos desafios. Graças a você e aos meus pais esta tese existe. Obrigada!

Aos meus pais, José Luiz e Rita, minha fortaleza! Meu amor e admiração por vocês são incondicionais. Não existem palavras capazes de expressar o quanto sou grata por tudo que vocês fizeram por mim. Espero poder retribuir tudo o que fizeram por muitos e muitos anos!

Às minhas irmãs Camila e Carol, que cuidam de mim e me protegem até os dias de hoje. Fico grata pelo carinho, amor e dedicação. Unidas pelo amor de nossos pais e pela benção de Deus, nunca iremos nos separar.

À minha sobrinha linda, Luiza! Como é bom ter você! Obrigada por me ensinar um amor que nunca tinha experimentado antes!

Gostaria muito de agradecer a todos das famílias Trinconi, Melo, Isaac e Tronco. Obrigado por torcerem por mim em todos os momentos e me darem o exemplo de lealdade, força, determinação, união e amor verdadeiro.

Não poderia deixar de agradecer a Deus! O responsável por tudo! É Ele que me guia, me ampara, me protege, me fortalece e me renova. Com Deus no coração fui (e sou) capaz de superar tudo! Por isso estou aqui! Muito obrigada, Senhor!

*“O ato da conquista de um grande sonho
reflete o sucesso nas lutas diárias para alcançá-lo.”*

Kléber Novartes

RESUMO

TRINCONI, C. T. **Tamoxifeno no tratamento de leishmaniose: atividade em esquemas terapêuticos combinados e estudo de mecanismo de ação.** 2015. 177 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Pode ser causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e a transmissão para o homem envolve vetores da família Psychodidae. O arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento de leishmaniose apresenta importantes limitações relacionadas ao restrito número de fármacos disponíveis, sua alta toxicidade, administração parenteral obrigatória na maioria dos casos, custo elevado e/ou baixa eficácia, sendo esta última algumas vezes relacionada à existência de parasitas resistentes. Estes fatores levam com constância a respostas terapêuticas imprevisíveis e insatisfatórias. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de encontrar novas alternativas quimioterápicas para o tratamento de leishmaniose. Investigações sobre a atividade leishmanicida de tamoxifeno, fármaco utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama, contra *Leishmania* vêm sendo desenvolvidas em nosso laboratório há cerca de uma década. Tamoxifeno é ativo contra diversas espécies de *Leishmania in vitro*, sendo muito eficaz e bem tolerado em modelos experimentais de leishmaniose visceral e cutânea. Nesse trabalho, objetivamos desenvolver estratégias quimioterápicas para aprimorar a terapêutica da leishmaniose utilizando a terapia combinada de tamoxifeno, por diferentes vias, com os fármacos utilizados atualmente no tratamento desta enfermidade. Além disso, buscando compreender os mecanismos de ação da droga, estudamos a influência de tamoxifeno na biossíntese de esfingolipídios em promastigotas de *Leishmania*. A interação entre tamoxifeno e antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina mostrou-se indiferente ou aditiva, tanto *in vitro* como *in vivo*. Tamoxifeno administrado por via tópica foi eficaz quando co-administrado com antimoniais sistêmicos, sendo que a terapia combinada teve eficácia superior aos esquemas monoterápicos correspondentes. Este fato apoia a hipótese do uso de tamoxifeno como parceiro dos fármacos citados, uma vez que se trata de um composto de perfil clínico seguro e bem estabelecido, de fácil acesso, barato e ativo contra leishmaniose por diferentes vias, principalmente oral e tópica. Os efeitos de tamoxifeno sobre a biossíntese de esfingolipídios em *Leishmania* foram caracterizados utilizando a estratégia de marcação metabólica de promastigotas de *L. amazonensis* com precursores radioativos ($[^3\text{H}]$ -esfingosina e $[^3\text{H}]$ -inositol). Verificamos que parasitas tratados com tamoxifeno apresentam redução de síntese de fosfatidilinositol e inositolfosforil ceramida e acúmulo de ceramida acilada. A redução na biossíntese de inositolfosforil ceramida não pode ser atribuída a redução no transporte de inositol mas provavelmente está relacionada à inibição da enzima inositolfosforil ceramida sintase. Os resultados apresentados neste trabalho indicam novas estratégias para superar as deficiências encontradas no tratamento da leishmaniose, justificando futuras investigações sobre o uso de tamoxifeno em co-administração com os fármacos utilizados atualmente no tratamento da leishmaniose. Além disso, resultados obtidos nos

estudos de mecanismo de ação em *Leishmania*, em concordância com dados de literatura relacionada, sugerem que tamoxifeno exerça ações em múltiplos alvos, assim como ocorre em células tumorais humanas.

Palavras-chave: *Leishmania*. Terapia combinada. Tamoxifeno. Quimioterapia. Esfingolipídios. IPC. PI. Ceramida acilada. Inositol.

ABSTRACT

TRINCONI, C. T. **Tamoxifen in leishmaniasis treatment: activity in combined therapeutic schemes and study of mechanism of action.** 2015. 177 p. Ph. D. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leishmaniasis is a neglected disease that affects approximately 12 million people worldwide. It is caused by more than 20 species of protozoan parasites of the *Leishmania* genus and transmission to humans involves vectors of the Psychodidae family. Current leishmaniasis treatment is severely limited by the small number of drugs available, by their toxicity and, in most cases, parenteral route of administration and high cost. There is also the problem of low efficacy, in some instances related to parasite resistance. These factors lead to unpredictable and unsatisfactory therapeutic responses. Therefore, there is a clear need for new chemotherapeutic alternatives for leishmaniasis. The leishmanicidal activity of tamoxifen, an oral drug used in the treatment and prevention of breast cancer, was described in our laboratory some years ago. Tamoxifen was shown to be active against several species of *Leishmania in vitro*, and effective and well tolerated in experimental models of visceral and cutaneous leishmaniasis. In this study, we sought to develop chemotherapeutic strategies using combination therapy with tamoxifen, applied through different routes of administration, and the drugs currently used in the treatment of leishmaniasis. In addition, to understand the drug's antileishmanial mechanisms of action, we studied the impact of tamoxifen on sphingolipid biosynthesis. The interaction between tamoxifen and pentavalent antimonial, amphotericin B and miltefosine was characterized as being indifferent or additive, both *in vitro* and *in vivo*. Topical tamoxifen was effective when co-administered with systemic antimonial. The efficacy of this combined scheme was superior to the corresponding monotherapy schemes. The effects of tamoxifen on sphingolipid biosynthesis in *Leishmania* were characterized using metabolic labelling of *L. amazonensis* promastigotes with radioactive precursors ($[^3\text{H}]$ - sphingosine and $[^3\text{H}]$ -inositol). Treatment with tamoxifen inhibited the biosynthesis of phosphatidylinositol and inositolphosphoryl ceramide and led to accumulation of acylceramide. Our data suggest that the reduction in inositolphosphoryl ceramide biosynthesis cannot be attributed to a decrease in inositol's transport but is probably related to inositolphosphoryl ceramide synthase inhibition. In summary, these findings support the proposal of using tamoxifen as a partner in co-administration with currently used antileishmanial drugs. In addition, our studies on the mechanism of action are in agreement with previous data which suggest that tamoxifen is a multi-target drug in *Leishmania*, as well as in human tumor cells.

Keywords: *Leishmania*. Combined therapy. Tamoxifen. Chemotherapy. Sphingolipids. IPC. PI. Acil ceramide. Inositol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de C18-ceramida e de bases esfingóides: esfingosina, esfinganina e fitoesfingosina.	37
Figura 2. Esquema simplificado da via de biossíntese dos esfingolipídios em mamíferos.	38
Figura 3. Via de biossíntese de esfingolipídios em <i>Leishmania</i>	40
Figura 4. Efeitos de tamoxifeno na via de biossíntese de esfingolipídios de <i>L. amazonensis</i>	62
Figura 5. Caracterização da banda B por hidrólise alcalina.....	64
Figura 6. Íons preponderantes de extrato lipídico total de <i>Leishmania</i> eluído da banda B. ..	65
Figura 7. Íons preponderantes de extrato lipídico total de <i>Leishmania</i> eluído da banda A. ..	66
Figura 8. Separação de extrato lipídico total de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em diferentes sistemas de corrida.	69
Figura 9. Íons preponderantes de extrato lipídico total de <i>Leishmania</i> eluído da banda C. ..	70
Figura 10. Caracterização da banda D por hidrólise alcalina.	73
Figura 11. Esquema de possíveis alvos de tamoxifeno na biossíntese de esfingolipídios em <i>Leishmania</i>	76
Figura 12. Cinética enzimática do transporte de [³ H]myo-inositol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	79
Figura 13. Inibição do transporte de [³ H]myo-inositol por tamoxifeno nas condições de K_m e V_{max} em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	80
Figura 14. Inibição do transporte de [³ H]myo-inositol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com tamoxifeno.	83
Figura 15. Efeito de inositol na síntese de esfingolipídios de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com tamoxifeno.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração e viabilidade celular de promastigotas tratados com diferentes concentrações de tamoxifeno por 10 minutos.	81
Tabela 2. Valores de K_m e V_{max} do transportador de inositol de <i>L. amazonensis</i> de parasitas pré-incubados com 0, 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ΣCIF	Somatória da CIF
°C	Graus Celsius
μCi	Micro Curie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	micromolar
ABC	Transportador de cassete de ligação de ATP
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
AmB	Anfotericina B
ATP	Adenosina Trifosfato
C-1	Carbono 1
C-2	Carbono 2
C-3	Carbono 3
CDP	Citidina difosfato
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
Ci/mmol	Curie por milimol
CIF	Concentração inibitória fracionada
CMP	Citidina monofosfato
CoA	Coenzima A
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Colina-P	Colina fosfato
CPM	Contagem por minuto
DAG	Diacilglicerol
DE ₂₅	Dose efetiva 25%
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DE ₉₉	Dose efetiva 99%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPC	Etanolamina-fosforilceramida
ESI/MS	Espectrometria de massas por ionização por eletrospray
EtN-P	Etanolamina fosfato
<i>g</i>	aceleração da gravidade
g/L	Grama por litro
G418	Geneticina
GIPLs	Glicoinositol fosfolipídios
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
gp-P	Glicoproteína P
GroPI	Glicerofosfoinositol
GSL	Glicoesfingolipídio
h	Hora
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta performance

IP	Inositolfosfato
IPC	Inositolfosforil ceramida
IVIS	Sistema de imageamento <i>in vivo</i>
K _m	Constante de Michaelis-Menten
kV	Kilovolt
La-LUC	<i>L. amazonensis</i> expressora de luciferase
La-WT	<i>L. amazonensis</i> selvagem
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCDF	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LUC	Luciferase
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
<i>m/z</i>	Relação massa carga
mg	Miligrama
mg/Kg/dia	Miligrama por quilograma por dia
MILT	Transportador transmembrana de <i>myo</i> -inositol
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mPPG	Proteofosfoglicanos ligados à membrana
mRNA	RNA mensageiro
N ₂	Nitrogênio
NBD	Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NBD-Cer	NBD-Ceramida
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
PBS	Salina tamponada com fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIK	Fosfatidilinositol quinase
PIP	Fosfatidilinositídeos
PKC	Proteína quinase C
PKDL	Leishmaniose cutânea pós Kala-azar
PL	Fosfolipídio
pmol/min	Picomol por minuto
PSL	Fosfoesfingolipídios
R _f	Fator de retenção
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Sb ^V	Antimônio pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SERM	Modulador seletivo do receptor de estrógeno
SLs	Esfingolipídios
SMase	Esfingomielinase
SPT	Serina Palmitoil Transferase
TBq/mmol	Terabecquerel por milimol
v/v	Volume/volume
V_{max}	Velocidade máxima
WHO	World Health Organization
$\bar{x}\Sigma CIF$	Média da ΣCIF

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A DOENÇA	22
1.1.1 <i>Leishmaniose Visceral</i>	23
1.1.2 <i>Leishmaniose Cutânea</i>	23
1.1.3 <i>Coinfecção Leishmania x HIV</i>	24
1.2 CICLO DE VIDA	25
1.3 PREVENÇÃO E CONTROLE	26
1.4 TRATAMENTO	26
1.4.1 <i>Antimoniais Pentavalentes</i>.....	26
1.4.2 <i>Anfotericina B</i>.....	27
1.4.3 <i>Miltefosina</i>	29
1.4.4 <i>Paromomicina</i>	30
1.4.5 <i>Pentamidina</i>	31
1.4.6 <i>Alternativas para o tratamento da leishmaniose</i>.....	31
1.5 TAMOXIFENO.....	32
1.6 A TERAPIA COMBINADA	34
1.6. ESFINGOLIPÍDIOS EM <i>LEISHMANIA</i> SPP.	35
2 OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAIS.....	43
3.1.1 <i>Parasitas</i>.....	43
3.1.2 <i>Drogas</i>.....	43
3.2 MÉTODOS.....	44
3.2.1 <i>Cultivo de promastigotas de L. amazonensis</i>.....	44
3.2.2 <i>Determinação da concentração de droga 50% efetiva contra promastigotas de L. amazonensis</i>	44

3.2.3 Obtenção de macrófagos, infecção e determinação da concentração efetiva 50% de fármacos contra amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	45
3.2.4 Ensaios de associação in vitro	46
3.2.5 Ensaios in vivo	47
3.2.6 Marcação metabólica	49
3.2.7 Análise por cromatografia de alta resolução em camada delgada	49
3.2.8 Re-extração de lipídios da sílica	50
3.2.8 Análise por Espectrometria de Massas	51
3.2.9 Hidrólise alcalina	51
3.2.10 Transporte de Inositol	52
3.2.11 Interferência do tamoxifeno no transporte de Inositol	53
3.2.12 Marcação com Iodeto de Propídio	54
3.2.13 Análise estatística	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 UTILIZAÇÃO DE LUCIFERASE COMO REPÓRTER EM ENSAIOS DE ATIVIDADE DE FÁRMACOS	55
4.2 ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS	56
4.2.1 Associação de tamoxifeno e anfotericina B	56
4.2.2 Associação de tamoxifeno e miltefosina	57
4.2.3 Associação de tamoxifeno e Sb^v	58
4.3 INTERFERÊNCIA DE TAMOXIFENO NA BIOSÍNTESE DE ESFINGOLÍPIDIOS EM <i>LEISHMANIA</i>	60
4.3.1 Marcação metabólica de <i>L. amazonensis</i> por [³H]-esfingosina ou [³H]-inositol	60
4.4 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE TAMOXIFENO	75
4.4.1 Caracterização do transportador de inositol em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	77
4.4.2 Interferência de tamoxifeno na atividade do transportador de inositol em <i>L. amazonensis</i>	79
4.4.3 Caracterização do tipo de inibição de tamoxifeno sobre a atividade do transportador de inositol de <i>L. amazonensis</i>	82
4.4.4 Interferência de inositol na síntese de IPC e PI de parasitas tratados com tamoxifeno	84
4.4.5 Considerações Finais	87
4.5 PARTICIPAÇÃO DA ALUNA EM PROJETOS PARALELOS	90

5 CONCLUSÕES.....	91
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	92
-------------------------	-----------

APÊNDICE A – Parasite burden in <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool	113
--	------------

APÊNDICE B - Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis	
Erro! Indicador não definido.	

APÊNDICE C - Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with <i>L. amazonensis</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
--	--------------------------------------

APÊNDICE D - Oral and topical tamoxifen as partners to pentavalent antimony in the therapy of cutaneous leishmanioses	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
--	--------------------------------------

APÊNDICE E – Espectros de massas das bandas A, B, C e D	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
--	--------------------------------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença

A leishmaniose é uma doença tropical mundialmente distribuída, com uma prevalência global de aproximadamente 12 milhões de casos e com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em área de risco de transmissão. Estima-se incidência de 1,5 a 2 milhões de novos casos e 70 mil mortes a cada ano (REITHINGER et al., 2007; SAVOIA, 2015).

A leishmaniose é considerada uma “doença negligenciada” devido sua forte relação com a pobreza e limitados recursos investidos em diagnóstico, tratamento e controle da doença (YAMEY; TORREELE, 2002). Trata-se de uma enfermidade que ocupa o segundo lugar em mortalidade e quarto em morbidade no mundo dentre todas as doenças tropicais. A leishmaniose consiste em um complexo de doenças devido à grande variedade de manifestações clínicas apresentadas. A leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC) são as principais formas da doença, sendo a última subdividida em formas localizada (LCL), difusa (LCDF), disseminada (LCD) e mucocutânea (LMC). Somado a essas manifestações, há a leishmaniose cutânea pós Kala-azar (PKDL), forma mais rara observada em alguns pacientes após remissão da sintomatologia clínica visceral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O espectro clínico observado nos pacientes indica a complexidade da leishmaniose: mais de 20 espécies de *Leishmania* podem causar a doença e muitas espécies de flebotomíneos e mamíferos têm sido implicados como vetores e reservatórios, respectivamente. Além disso, o estabelecimento da infecção e o desenvolvimento da doença são dependentes de diversos fatores como linhagem, dose ou via de inoculação do parasita e fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro (REITHINGER et al., 2007; SCOTT, 2005) .

1.1.1 Leishmaniose Visceral

A LV é caracterizada por febre, perda de peso, esplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia, sendo usualmente causada pelas espécies *Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. infantum chagasi* (CAMARGO-NEVES et al., 2006). A LV é letal em praticamente todos os casos não tratados e, mesmo em pacientes tratados, os níveis de fatalidade podem ser superiores a 10%. Entre os sinais ou situações associados com alta mortalidade estão icterícia, anemia severa, extremos de idade e co-infecção com HIV (BERN et al., 2005; DESJEUX, 1996).

A LV é endêmica em 70 países, sendo que mais de 90% dos casos ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012). A incidência de LV relatada no Brasil vem crescendo consideravelmente. Enquanto que em 1980 foram reportados 1.500 casos por ano, em 2006 foram registrados 4.000 casos, passando o país a representar a terceira maior concentração de casos de LV no mundo (ALVAR et al., 2008). No ano de 2009, a região nordeste contabilizou 47% dos casos brasileiros. Apenas um ano mais tarde, em 2010, Minas Gerais passou a ser o estado com maior incidência de LV com 692 casos no ano, seguido do Ceará, Maranhão, Bahia, Pará e Tocantins com 599, 500, 467, 406 e 258 casos, respectivamente. No total foram notificados 4.888 casos de LV no Brasil em 2010 (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013).

1.1.2 Leishmaniose Cutânea

A LC é mais frequentemente causada por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e espécies relacionadas no Novo Mundo (REITHINGER et al., 2007). A LCL, a forma mais comum das manifestações cutâneas, é caracterizada por lesões arredondadas ulceradas única ou múltiplas (até 20 lesões), que apresenta boa resposta ao tratamento. A cicatrização espontânea da lesão pode ocorrer meses ou anos após a estabilização da doença, dependendo da espécie causadora (BERN et al., 2005). Cerca de 10% dos pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* evoluem para a forma mucosa que usualmente ocorre meses ou anos após a cicatrização da doença primária (REITHINGER et al., 2007). Esta forma da doença é mais grave podendo

causar destruição do septo nasal, palato e outras estruturas de mucosa, evoluindo para mutilação facial e, raramente, morte por envolvimento das vias aéreas (MARSDEN, 1990). Outras formas mais raras, porém severas e difíceis de tratar incluem a LCDF, que consiste em uma doença nodular não-ulcerativa que se dissemina do sítio inicial de infecção para todo o corpo do paciente e a LCD, caracterizada por lesões nodulares ou ulceradas pequenas, às vezes acneiformes, distribuídas por todo o corpo (BERN et al., 2008).

A LC é mundialmente distribuída com cerca de 70 a 75% da incidência global estimada presente em dez países (Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru) (ALVAR et al., 2012). Nas Américas, a LC ocorre em todos os países, com exceção de Uruguai e Chile (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008), sendo o Brasil o país com a maior incidência. Em 2010 foram registrados mais de 30.000 casos de LC, com destaque para os estados do Pará, Maranhão, Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rondônia e Amazonas que apresentaram 4.331, 3.417, 3.400, 3.383, 1.947, 1.896 e 1.829 casos, respectivamente (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013).

1.1.3 Coinfecção *Leishmania* x HIV

Um fator que favorece o aumento na incidência de leishmaniose é a associação que ocorre em pacientes portadores de HIV que desenvolvem a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). O primeiro caso de co-infecção *Leishmania*/HIV na América foi relatado no Brasil (NICODEMO et al., 1990) cinco anos após o primeiro relato mundial ocorrido em 1985 no sul da Europa (DE LA LOMA et al., 1985). No ano de 2000, foram notificados aproximadamente 2 mil casos de co-infecção *Leishmania*/HIV em 35 países de vários continentes - Ásia, África, América do Sul e Europa - a maioria dos quais diagnosticados em países do Sudoeste Europeu como Espanha, Portugal, França e Itália (ALVAR et al., 1997; ALVAR et al., 2008; CAMARGO-NEVES et al., 2006). A expansão da AIDS e a crescente urbanização da LV tendem a favorecer o aumento de prevalência da co-infecção *Leishmania*/HIV nos próximos anos (ALVAR et al., 2008; CAMARGO-NEVES et al., 2006). Isto porque a LV e a AIDS exercem um efeito prejudicial sinérgico na resposta imune pelo fato de ambas comprometerem células do sistema imune celular (OLIVIER et al., 2003; TREMBLAY et al., 1996). Desta forma, a infecção por HIV aumenta o número de casos de LV em áreas endêmicas, reduz a probabilidade de resposta à terapia e aumenta

as chances de recidiva ao mesmo tempo que a LV promove a progressão clínica da AIDS (GRADONI et al., 1996; LOPEZ-VELEZ et al., 1998; PINTADO et al., 2001).

A apresentação clínica da LV em pacientes HIV positivos é semelhante aos pacientes sem HIV, com excessão de diarreia que parece ser mais comum em pacientes co-infectados. No entanto, recidivas da doença são mais frequentes em pacientes co-infectados (56,5% dos casos). Somado a isso, estes pacientes apresentam maior taxa de letalidade que pode chegar a 23,5% (LINDOSO et al., 2014).

1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *Leishmania* é caracterizado por duas diferentes formas: promastigotas (presentes no intestino de fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo) e amastigotas (presentes no interior de células do sistema retículo-endotelial de diversas classes de mamíferos domésticos e silvestres e alguns répteis, além do homem). Ao longo do ciclo, o parasita sofre múltiplas alterações morfológicas e bioquímicas que garantem sua sobrevivência nos hospedeiros.

Em resumo, os macrófagos infectados são tomados pelo inseto hematófago onde, por lise celular, são liberadas as formas intracelulares conhecidas como amastigotas. No intestino médio do inseto, os parasitas se diferenciam nas formas multiplicativas denominadas promastigotas procíclicas. Estas últimas passam pelo processo de metaciclogênese tornando-se infectivas para o hospedeiro mamífero. Finalmente, no próximo repasto sanguíneo os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro mamífero juntamente com a saliva do inseto. Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, os parasitas terão de evadir dos mecanismos de defesa inatos e infectar principalmente macrófagos permanecendo no interior de fagolisossomos. O aumento de temperatura e diminuição de pH são sinais cruciais para a diferenciação do parasita para formas amastigotas, que se multiplicam até a ruptura da célula hospedeira invadindo rapidamente outras células. Após períodos de semanas a meses, a doença pode se manifestar nas diferentes formas clínicas já citadas (BATES; ROGERS, 2004; GOSSAGE et al., 2003; LAINSON et al., 1987).

1.3 Prevenção e controle

O Programa de Controle de Leishmaniose no Brasil é baseado em três principais medidas: diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle dos vetores com o uso de inseticidas e triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose. Estas estratégias permanecem inalteradas desde o ano de 1950 (BRANDÃO-FILHO, 2006; DANTAS-TORRES) e infelizmente não foram suficientes para reduzir a incidência de casos humanos (BRAGA et al., 1998; COSTA; VIEIRA, 2001). Ao contrário, a prevalência de leishmaniose tem aumentado a cada ano e a doença tornou-se um sério problema de saúde pública em diversos estados brasileiros.

1.4 Tratamento

O tratamento de leishmaniose apresenta múltiplos problemas, estando longe de ser ideal. Com resultados frequentemente imprevisíveis e insatisfatórios, o tratamento de leishmaniose não se limita apenas em estabelecer a cura de pacientes, mas configura uma importante estratégia de controle da doença. Os esquemas terapêuticos atualmente utilizados são pouco eficazes e potencialmente tóxicos, sendo notória a complexidade da situação terapêutica atual desta doença.

1.4.1 Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) (p.ex., estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumine – Glucantime®) ainda são considerados fármacos de primeira escolha para o tratamento da LV e LC. O uso dos Sb^V é limitado pelo alto custo, administração parenteral obrigatória e efeitos adversos, alguns dos quais bastante graves como: arritmias cardíacas, nefro, pancreato e hepatotoxicidade. Esses medicamentos são contra-indicados para indivíduos portadores de hipersensibilidade ao fármaco, determinadas condições crônicas, crianças muito jovens, gestantes e lactantes (BALAN-FOUCE et al., 1998; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2010).

Apesar do seu uso difundido por mais de meio século, o mecanismo de ação dos Sb^V ainda não está completamente esclarecido. Acredita-se que sua eficácia contra o

parasita possa estar relacionada à sua conversão a antimônio trivalente (Sb^{III}) no local de ação ou próximo dele. No entanto, a biomolécula envolvida e o local onde ocorre a redução do Sb^{V} ao Sb^{III} ainda não foram identificados (FREZARD et al., 2001). O Sb^{III} é letal para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e acredita-se que ele interfere no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à depleção dos níveis de ATP intracelular (BALANA-FOUCE et al., 1998).

A eficiência desses compostos tem-se reduzido significativamente devido à seleção de parasitas resistentes observada durante os últimos 15 anos, principalmente no nordeste da Índia onde mais de 60% dos pacientes com LV não mais respondem à terapia com antimoniais (MUNIARAJ, 2014; SUNDAR et al., 2014). Consequentemente, o uso dos antimoniais não é mais recomendado na Índia. Acredita-se que a resistência tenha ocorrido pelo fato do tratamento ser de longa duração, doloroso, tóxico e de alto custo, levando os pacientes a interromperem a terapia precocemente. Além disto, nesta região o ciclo do parasita é antroponótico, o que pode favorecer a seleção de parasitas resistentes (HADIGHI et al., 2006). Casos de LV e LC refratários à terapia com antimoniais também tem sido registrados na América (BRUSTOLONI et al., 2010). No caso do Brasil, estudos recentes em áreas endêmicas revelaram que a taxa de cura definitiva em 6 meses para pacientes com LC tratados com Sb^{V} é de apenas 50-60% (CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011; MACHADO et al., 2010; NEVES et al., 2011; ROMERO et al., 2001) sugerindo que o surgimento de cepas resistentes a esse fármaco pode estar ocorrendo (INOCENCIO DA LUZ et al., 2011; ROJAS et al., 2006).

Em regiões com alta incidência de resistência a Sb^{V} , anfotericina B e miltefosina tornaram-se os fármacos de escolha, mas também há dificuldades com estas drogas, devido à toxicidade, alto custo ou a probabilidade de seleção de resistência (BHANDARI et al., 2012; SUNDAR, 2001).

1.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B é o fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV e LC. Durante a última década a anfotericina B, formulada como desoxicolato de anfotericina, foi amplamente utilizada no tratamento da LV, mas seu uso é limitado pela toxicidade e reações adversas. Para tentar contornar esses problemas, formulações lipídicas menos

tóxicas foram desenvolvidas (por exemplo, AmBisome[®]). Desde então, a anfotericina B lipossomal tem apresentado o melhor índice terapêutico dentre as drogas anti-*Leishmania* atuais, particularmente em áreas onde a resistência aos antimoniais tem sido reportada (BERMAN, 2005; DESJEUX, 2004; MISHRA et al., 2007).

Nestas formulações, os lipídios agregados à molécula de anfotericina B reduzem a toxicidade do fármaco por facilitar sua absorção pelas células do sistema reticuloendotelial aumentando sua eficácia (BERMAN, 2005; DESJEUX, 2004; MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007), porém o alto custo tem restringido seu uso (NONATA et al., 1997).

A princípio, a eficácia de anfotericina B lipossomal no tratamento da LC foi questionada devido a ausência de conhecimentos sólidos sobre sua farmacocinética na doença cutânea como, por exemplo, a concentração real da molécula na pele (GREGORIADIS, 1991). No entanto, a eficácia da anfotericina B lipossomal por via intravenosa foi comprovada em modelo experimental de LC (YARDLEY; CROFT, 1997) e em testes clínicos com pacientes infectados com *L. braziliensis* (SOLOMON et al., 2007). Neste estudo realizado por Solomon e colaboradores em 2007, o tratamento com anfotericina B lipossomal se mostrou mais eficaz que aquele realizado com estibogluconato de sódio, não sendo observada nenhuma falha no grupo tratado com anfotericina B lipossomal e poucos efeitos adversos (SOLOMON et al., 2007). Além disso, testes clínicos utilizando anfotericina B lipossomal no tratamento de pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos com LC e LMC adquiridas na América do Sul (Bolívia, Peru e Brasil) tem apresentado resultados satisfatórios (AMATO et al., 2004; CAMPOS-MUNOZ et al., 2007; CROFTS, 1976; DEL ROSAL et al., 2010; DI LELLA et al., 2006; NONATA; SAMPAIO; MARSDEN, 1997; SAMPAIO et al., 1971).

O principal mecanismo de ação desta droga está relacionado à formação de poros na membrana plasmática do parasita, capazes de alterar o balanço iônico e resultar na morte celular (revisado em CROFT; COOMBS, 2003; NEUMANN et al., 2010). A anfotericina B lipossomal é indicada em casos graves de LV que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do antimônio, em pacientes em extremos de idade ou com outras patologias graves.

1.4.3 Miltefosina

A miltefosina foi a primeira droga de administração oral efetiva para o tratamento de LV (JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 2002). O mecanismo de citotoxicidade exato da miltefosina em *Leishmania* spp. ainda não está completamente esclarecido, mas sua atividade tem sido relacionada com apoptose (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004) e metabolismo de lipídios do parasita (RAKOTOMANGA et al., 2005; RAKOTOMANGA et al., 2007).

Miltefosina foi incorporada na rotina clínica de tratamento de leishmaniose no Sul da Ásia (Índia, Nepal e Bangladesh) e aprovada para uso na Alemanha e Colômbia. Também vem sendo estudada em pacientes com LC e imunossuprimidos com infecção por HIV (RITMEIJER et al., 2006; SINDERMAN et al., 2004; SUNDAR et al., 2002). Este fármaco ainda não está aprovado para uso clínico no Brasil, mas estudos clínicos no país têm revelado maior eficácia de miltefosina em relação ao Sb^V no tratamento de pacientes com LC na Bahia e Manaus, estados endêmicos para *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, respectivamente (CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011; MACHADO et al., 2010).

Apesar dos resultados positivos do tratamento de leishmaniose com miltefosina, seu uso ainda é limitado devido ao potencial teratogênico (CROFT; COOMBS, 2003) e à sua eficácia variável em diferentes regiões geográficas (SOTO et al., 2008). Além disso, seu uso apresenta o risco de emergência de resistência devido ao seu longo tempo de meia vida, aos possíveis cursos incompletos de tratamento devido a efeitos colaterais adversos, como diarreia, além do fato do ciclo de transmissão ser antroponótico nas regiões em que a droga está sendo utilizada (BRYCESON, 2001; SUNDAR; MURRAY, 2005).

A resistência à miltefosina é facilmente obtida *in vitro*, onde o aumento gradual da concentração da droga conduz facilmente à seleção de parasitas resistentes. A resistência à miltefosina está relacionada à mutação em um único gene, o gene do transportador de miltefosina (COELHO et al., 2012; PEREZ-VICTORIA et al., 2003; SEIFERT et al., 2003), o que culmina em drástica redução do acúmulo da droga no interior da célula (PEREZ-VICTORIA et al., 2003).

Um estudo recente mostrou redução da eficácia clínica de miltefosina após uma década de uso em Bihar, na Índia (SUNDAR et al., 2012). No Nepal, pacientes com LV tratados com miltefosina foram monitorados clinicamente por até 12 meses após o fim da

terapia. Foi identificada uma taxa de cura inicial de 95,8%, porém após 6 e 12 meses observou-se recidiva da doença em 10,8% e 20% dos pacientes, respectivamente (RIJAL et al., 2013). Entretanto, não foi identificada resistência à droga *in vitro* em parasitas isolados de pacientes recidivantes. Um fator de risco relacionado à falha terapêutica foi a idade abaixo de 12 anos (RIJAL et al., 2013). Estudo farmacocinético-farmacodinâmico realizado com pacientes com LV tratados com miltefosina também correlacionou a falha terapêutica de miltefosina às crianças. Neste caso, a concentração sérica de miltefosina no fim do tratamento estava significativamente menor em crianças do que em adultos, embora a dose diária utilizada foi de 2,5 mg/kg de peso corporal para ambos os grupos (DORLO et al., 2014). Outro fator que pode estar relacionado à falha terapêutica é a descontinuidade prematura da terapia por uma grande parte dos pacientes devido a possíveis efeitos colaterais frequentes, como intolerâncias gastrointestinais (RIJAL et al., 2013).

Um relato mais preocupante, reportado por Cojean e colaboradores (2012), descreve a observação de redução da susceptibilidade de *L. infantum* à miltefosina em isolados de pacientes coinfectados com HIV, devido à inativação do gene transportador de miltefosina. Este fato indica que parasitas resistentes à miltefosina podem ser selecionados durante o tratamento com a droga *in vivo* (COJEAN et al., 2012).

1.4.4 Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico, inicialmente proposto como tratamento alternativo para a leishmaniose e testado em diversas preparações tópicas em associação com gentamicina ou como monoterapia em diferentes estudos clínicos para LC na Tunísia, Equador e Panamá (ARMIJOS et al., 2004; BEN SALAH et al., 2009; BEN SALAH et al., 2013; SOSA et al., 2013). Estudos clínicos realizados na Índia (SUNDAR et al., 2007) e Sudão (MUSA et al., 2010) têm mostrado que a paromomicina administrada sistemicamente também é eficaz no tratamento de LV. Em alguns casos, o tratamento de pacientes com LV aguda sintomática com paromomicina em doses de 15 mg/Kg/dia por 21 dias apresentou eficácia terapêutica semelhante à terapia com anfotericina B (SUNDAR et al., 2007). No entanto, dados experimentais e clínicos têm mostrado eficácia

variável para o tratamento com paromomicina de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e com a região geográfica (SUNDAR et al., 2008).

O mecanismo de ação deste composto parece estar relacionado à despolarização da membrana mitocondrial do parasita resultando em inibição da respiração celular (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2006). Assim como ocorre com miltefosina, a resistência à paramomicina pode ser induzida experimentalmente em promastigotas de *Leishmania in vitro* e seu mecanismo parece estar relacionado à diminuição do acúmulo intracelular da droga (EL-ON et al., 1991; JHINGRAN et al., 2009; MAAROUF et al., 1998). Atualmente, a paromomicina é utilizada no tratamento da LV na Índia, sendo uma alternativa viável para regiões endêmicas com pouco acesso aos antimoniais ou para indivíduos com contra-indicação para o uso de Sb^V.

1.4.5 Pentamidina

A pentamidina é mais tóxica e menos eficaz do que Sb^V e anfotericina B. Durante um curto período de tempo a pentamidina foi utilizada como a droga de segunda linha para pacientes refratários ao Sb^V (JHA et al., 1991). Seu mecanismo de ação leishmanicida parece incluir inibição da biossíntese de polimerases, interação com a molécula de DNA impedindo a replicação e alteração do potencial de membrana, mas estas atividades ainda não estão claramente definidas (revisado em CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). O uso da pentamidina é reservado apenas aos casos de falha terapêutica das duas drogas anteriormente citadas.

1.4.6 Alternativas para o tratamento da leishmaniose

Apesar do desenvolvimento de novos fármacos e da busca por compostos com atividade leishmanicida, os Sb^V, anfotericina B e miltefosina ainda constituem as principais opções terapêuticas para leishmaniose. Todas elas possuem diversas desvantagens importantes conforme exposto anteriormente. Desta forma, devido à resistência aos antimoniais já reportada para isolados de *Leishmania* e à ausência de um medicamento ideal para o tratamento de leishmaniose, a busca por novas alternativas quimioterápicas torna-se imprescindível. Com base nessa urgente necessidade, foram

iniciadas pesquisas em nosso laboratório com o intuito de verificar o potencial leishmanicida de compostos anticâncer, dentre eles o tamoxifeno ([Z]-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)-fenóxi]-N,N-dimetiletanamina), um conhecido quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama.

1.5 Tamoxifeno

O tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama responsivo a hormônio em todos os estágios (POWLES, 1997). A primeira descrição do uso clínico de tamoxifeno para o tratamento do carcinoma de mama foi realizada por Kistner e Smith em 1960 (WARD, 1973), sendo aprovado para o tratamento hormonal do câncer de mama no Reino Unido 13 anos depois. Desde então, ele é o quimioterápico mais prescrito no mundo (GOSS et al., 2005). Seu uso como agente quimioprotetor tem reduzido a incidência da doença em 50% das mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (CUZICK et al., 2003; FISHER et al., 1998).

Efeitos colaterais de tamoxifeno reportados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, estão relacionados com a indução de patologias uterinas benignas, como hiperplasia, polipose proliferativa e carcinoma endometrial, além do risco de eventos trombo-embólicos (SINGH et al., 2007; WILLIAMS-BROWN et al., 2011). Contudo, o aparecimento destes efeitos é em sua maioria descritos em pacientes submetidos à terapia diária com tamoxifeno por períodos prolongados (anos) (BERGMAN et al., 2000).

Em contrapartida, o uso de tamoxifeno também está associado com vários efeitos benéficos devido sua ação pró-estrogênica em outros tecidos alvo, como: manutenção e/ou, até certo ponto, restauração da densidade mineral dos ossos de mulheres na menopausa (LOVE et al., 1992), redução do colesterol sérico responsável pela redução de infartos agudos do miocárdio e angina (CHANG et al., 1996) e indução da ovulação em pacientes com ovário policístico (STEINER et al., 2005).

Além disso, tamoxifeno possui diversas atividades independentes da interação com o receptor de estrógeno, como: proteção contra peroxidação lipídica (CUSTODIO et al., 1994; WISEMAN; HALLIWELL, 1994), alcalinização de organelas intracelulares (ALTAN

et al., 1999), antagonismo da calmodulina (ROWLANDS et al., 1990), modulação da proteína quinase C (GUNDIMEDA et al., 1996), redução dos níveis de nucleotídeos cíclicos (LOPES et al., 1990), ativação da sinalização de segundos mensageiros lipídicos (CABOT et al., 1995), interferência em lipídios de membrana (CABOT; ZHANG; GIULIANO, 1995) e no metabolismo de esfingolipídios (CABOT et al., 1996), além de sensibilização de células resistentes a múltiplas drogas (LIU et al., 2011; SHEN et al., 2005).

Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que o tamoxifeno é ativo contra várias espécies de *Leishmania in vitro* (MIGUEL et al., 2007) e *in vivo* (MIGUEL et al., 2008; MIGUEL et al., 2009). Foi demonstrado que, em infecções por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, o tratamento com tamoxifeno durante 15 dias resultou em significativa e sustentada melhora clínica e parasitológica (MIGUEL; YOKOYAMA-YASUNAKA; ULIANA, 2008). A atividade de tamoxifeno foi também demonstrada em modelo experimental de infecção por *L. braziliensis*, o agente etiológico de LC de mais larga prevalência em nosso meio. Nesse modelo, o tamoxifeno foi capaz de reduzir significativamente o tamanho das lesões e resultou em redução de 99% na carga parasitária (MIGUEL et al., 2009). Foi também utilizado um modelo experimental de LV de hamsters infectados com *L. chagasi*, com o qual foi demonstrado que o tratamento com este fármaco resulta em expressiva redução na carga parasitária no fígado e baço, com sobrevivência de 100% dos animais tratados (MIGUEL et al., 2009). É importante frisar que em todos os casos, o tratamento dos animais infectados foi iniciado de 4 a 5 semanas após a infecção, quando a doença já estava estabelecida e aparente. Além disso, a eficácia, observada já durante o tratamento, foi sustentada após a suspensão da terapia.

Com base nesses resultados foi realizado um estudo clínico piloto na Bahia, região endêmica de LC no Brasil, utilizando o tamoxifeno no tratamento de pacientes com LC causada por *L. braziliensis* (Uliana SRB, comunicação pessoal). Foi observada a cicatrização total em um de seis pacientes tratados, em uma dose de 40 mg/kg/dia por via oral. Nesta dose, o tratamento foi bem tolerado por todos os pacientes, porém o estudo foi interrompido porque cinco pacientes apresentaram melhora, mas ainda mostravam sinais de atividade da lesão, ou não tiveram melhora clínica 60 dias após o início do tratamento, não havendo, portanto, evidências de que esse esquema terapêutico fosse mais eficaz do que o esquema clássico de tratamento com Sb^V. Considerando a ampla margem farmacológica de segurança de tamoxifeno, ainda haveria

espaço para testes clínicos com maiores doses em experimentos futuros. Por outro lado, tornou-se interessante a proposta de verificar as propriedades de interação de tamoxifeno com outros quimioterápicos clássicos com a finalidade de ensaiar combinações de fármacos.

1.6 A terapia combinada

A associação de fármacos é uma estratégia interessante muito recomendada pela Organização Mundial da Saúde visando melhorar a terapia de leishmaniose (WHO, 2012). Nos últimos anos, o consenso do uso de regimes de associação vem crescendo entre os especialistas na área de quimioterapia da leishmaniose por diversas razões (ALVAR et al., 2006; BRYCESON, 2001; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Primeiro, a associação de fármacos de classes químicas diferentes pode aumentar a eficácia da terapia, enquanto a redução da dose e do tempo de tratamento reflete em menor toxicidade, maior aceitação do paciente e menor carga sobre o sistema de saúde (VAN GRIENSVEN et al., 2010; WHO, 2010). Isso também poderia reduzir os custos da terapia fornecendo uma opção mais viável economicamente (VAN GRIENSVEN et al., 2010). A terapia combinada também pode ajudar a retardar o aparecimento de resistência e aumentar a vida útil dos diferentes fármacos, como já foi visto em doenças como tuberculose, malária e AIDS (KREMSNER; KRISHNA, 2004; MITCHISON; DAVIES, 2012; VAN GRIENSVEN et al., 2010; WHO, 2014). Finalmente, a associação de fármacos pode melhorar a eficácia do tratamento em casos mais complicados, como em pacientes co-infectados com o vírus HIV, onde os resultados do tratamento com a monoterapia têm sido inadequados (ALVAR et al., 2008).

Diversos estudos clínicos têm investigado a terapia combinada utilizando fármacos atualmente disponíveis na quimioterapia da leishmaniose, como Sb^V, anfotericina B, miltefosina, paromomicina e imunomoduladores. Esses estudos têm sido realizados principalmente em pacientes com LV na Índia e África (MELAKU et al., 2007; OMOLLO et al., 2011; SUNDAR et al., 1997; SUNDAR et al., 2008; SUNDAR et al., 2011), e em alguns casos incluem pacientes com LV co-infectados com HIV (MAHAJAN et al., 2015), pacientes com PKDL não responsivos à terapia com Sb^V (RAMESH et al., 2014) e casos raros de LV não responsiva a múltiplas drogas (KUMAR et al., 2011). Alguns estudos clínicos também

têm sido realizados avaliando a terapia combinada em pacientes com LC ou LMC no Irã e Peru, respectivamente (DASTGHEIB et al., 2012; LLANOS-CUENTAS et al., 1997; SADEGHIAN; NILFOROUSHZADEH, 2006).

Dessa forma, tendo constatado a atividade de tamoxifeno contra diversas espécies de *Leishmania* *in vitro* e *in vivo*, decidimos investigar as propriedades da interação deste fármaco com os medicamentos convencionais utilizados na terapêutica de leishmaniose.

Por outro lado, tínhamos interesse também em entender os mecanismos de ação leishmanicidas de tamoxifeno. Os dados disponíveis na literatura sobre os efeitos do tamoxifeno em células tumorais incluem uma variedade de alvos metabólicos, dentre eles a via de biossíntese das ceramidas (CABOT et al., 1996). Neste estudo, Cabot e colaboradores demonstraram que tamoxifeno inibe a atividade da glicosilceramida sintase, a enzima catalisadora da glicosilação de ceramida, em células neoplásicas resistentes a múltiplas drogas (KB-V-1) e em linhagem celular de melanoma (M10) (CABOT et al., 1996). Com base nestas informações, iniciou-se em nosso laboratório a investigação sobre a interferência do tamoxifeno no metabolismo de esfingolipídios em *Leishmania*.

1.6. Esfingolipídios em *Leishmania* spp.

Os esfingolipídios (SLs) são componentes essenciais de membrana de organismos eucariotos pluricelulares e unicelulares, incluindo protozoários da família Tripanosomatidae, como *Leishmania* (SUTTERWALA et al., 2008). Atuam como importantes mediadores da sinalização celular, além de participarem em vários aspectos críticos e fundamentais da biologia celular, incluindo endocitose, crescimento, diferenciação, apoptose e oncogênese (SHAYMAN, 2000). Os SLs estão presentes principalmente em membranas plasmáticas do retículo endoplasmático, Golgi e lisossomos, mas também foi demonstrada sua presença em membranas mitocondriais (BIONDA et al., 2004) e nucleares (WATANABE et al., 2004).

Os SLs e fosfolipídios (PLs) podem se associar com o colesterol/ergosterol e proteínas de membrana plasmática, em particular as proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), formando microdomínios conhecidos como “lipid rafts” (BROWN; LONDON, 1998; SIMONS; IKONEN, 1997). Em eucariotos, esses microdomínios

de membrana têm sido implicados em um grande número de funções celulares, incluindo tráfego de proteínas ancoradas por GPI na membrana apical de células epiteliais (BROWN; LONDON, 1998), triagem endocítica de proteínas ancoradas por GPI (CHATTERJEE et al., 2001), modulação da transdução de sinal da imunoglobulina E em mastócitos e basófilos (BAIRD et al., 1999) e de receptores de antígenos das células T e B (MAGEE et al., 2002; PIERCE, 2002). Em *Leishmania*, a fração insolúvel dos microdomínios de membrana apresentam altas concentrações de glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), inositolfosforil ceramida (IPC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) e esteróis (YONEYAMA et al., 2006). Nestes parasitas os microdomínios de membrana estão envolvidos no processo de migração das formas promastigotas do parasita no intestino do inseto vetor durante o processo de metaciclogênese, sinalização celular e invasão do macrófago (DENNY; SMITH, 2004; YONEYAMA et al., 2006).

A estrutura básica dos SLs consiste em uma base esfingóide constituída, em geral, por 18 a 20 átomos de carbono, contendo grupamentos hidróxi no carbono-1 (C-1) e no carbono-3 (C-3) e um grupamento amino no carbono-2 (C-2), com saturação ou não entre os carbonos 4 e 5 e grupos metila inseridos ao longo da cadeia carbônica (Figura 1). As principais bases esfingóides encontradas em eucariotos são esfingosina, esfinganina e a 4-hidroxiesfingosina ou fitoesfingosina, no entanto, podem ser encontradas mais de 60 tipos diferentes de bases esfingóides (Figura 1). Estas moléculas podem ser N-aciladas no grupamento amino livre do C-2 por um ácido graxo, gerando a ceramida (Figura 1). Esta, por sua vez, consiste na precursora principal para a síntese de SLs. Os ácidos graxos da ceramida podem variar no tamanho da cadeia (14 a 30 carbonos), grau de insaturação (mas são principalmente saturados) e presença ou ausência de um grupo hidroxila (revisado em MERRIL; SANDHOFF, 2002).

Figura 1. Estrutura de C18-ceramida e de bases esfingóides: esfingosina, esfinganina e fitoesfingosina.

Fonte: Modificado de Schanaar et al., 2009.

Em eucariotos, a síntese *de novo* de ceramida se inicia com a condensação do palmitoil CoA e serina, formando 3-cetoesfinganina (BRADY; KOVAL, 1958), pela ação da enzima serina palmitoil transferase (SPT). A esfinganina (dihidroesfingosina) é formada por meio da reação de redução catalisada pela 3-cetoesfinganina redutase (STOFFEL et al., 1968). Uma vez sob a ação da enzima ceramida sintase, a esfinganina é acilada formando a dihidroceramida (N-acilesfinganina), a qual sofre dessaturação pela enzima dihidroceramida desaturase gerando a ceramida. Em geral, todas as enzimas associadas com a síntese *de novo* da ceramida estão presentes no retículo endoplasmático (MANDON et al., 1992).

Figura 2. Esquema simplificado da via de biossíntese dos esfingolipídios em mamíferos. A ceramida pode ser formada pela via de biossíntese *de novo* (vermelho) ou pela via de salvagem a partir da hidrólise da esfingomielina, ceramida-1-fosfato ou glicoesfingolipídios ou por acilação de esfingosina. A ceramida também pode servir como substrato para a síntese dos glicoesfingolipídios e fosfoesfingolipídios, alguns destes representados nesta via. SPT: serina palmitoil transferase; 3-CSR: 3-cetoesfinganina redutase; CerS: ceramida sintase; DES: dihidroceramida desaturase; GCS: glucosilceramida sintase; CRS: cerebrosidases; CDase: ceramidase; C1PP: ceramida-1-fosfato fosfatase; CK: ceramida cinase; SMS: esfingomielina sintase; SMase: esfingomielinase. Fonte: Modificado de Ogretmen e Hannun, 2004.

Posteriormente, no aparato de Golgi, componentes polares podem ser adicionados à hidroxila do C-1 da ceramida por uma ligação fosfodiéster ou glicosídica formando os diferentes SLs complexos (NELSON; COX, 2002). Desta forma, SLs são divididos em duas principais subclasses, os fosfoesfingolipídios (PSLs) e os glicoesfingolipídios (GSL). Os PSLs são formados com a adição de fosfocolina (PC), PE ou PI à molécula de ceramida gerando, respectivamente, esfingomielinas (SM), etanolamina

fosforilceramida (EPC) e IPC. Os GSLs são subdivididos em GSL neutros, ácido, básicos ou anfipáticos dependendo do tipo de açúcares adicionados à molécula de ceramida (MERRIL; SANDHOFF, 2002; NELSON; COX, 2002).

A ceramida também pode ser obtida pela via de salvação, através da hidrólise de esfingolipídios mais complexos, como PSL e GSL, ou a partir de bases esfingóides livres, como a esfingosina (Figura 2). Dados na literatura sugerem que *Leishmania* seja capaz de adquirir e remodelar os lipídios do hospedeiro em SLs e PSLs próprios (ZHANG et al., 2005) utilizando a via de salvação para síntese de ceramidas. Neste estudo, foi demonstrado que amastigotas de *Leishmania* deletados para a SPT, enzima responsável pela síntese *de novo* de esfingolipídios, continham quantidades suficientes de IPC, um PSL abundante em *Leishmania*, porém ausente em células de mamífero (Figura 3) (ZHANG et al., 2005). Também foi demonstrado que a expressão da subunidade 2 da SPT é estágio regulada, sendo indetectável na forma amastigota do parasita (DENNY et al., 2004). Estes mutantes que são incapazes de biossintetizar esfingolipídios de maneira integral são viáveis, porém incapazes de completar a metaciclogênese *in vitro* (DENNY et al., 2004; ZHANG, K. et al., 2005). No entanto, são capazes de infectar animais, confirmando que o primeiro passo na via *de novo* de biossíntese de ceramida é desnecessário para a sobrevivência da *Leishmania* no macrófago do hospedeiro e para sua patogênese (DENNY et al., 2004). Provavelmente o amastigota deve compensar a ausência da síntese *de novo* sequestrando GSLs do hospedeiro *in vivo*, possivelmente como um meio de evasão do sistema imune do mamífero (WINTER et al., 1994).

Além disso, embora *Leishmania* não sintetize SM, foi demonstrado que promastigotas de *L. major* possuem uma IPC hidrolase (ISC1p) com atividade de esfingomielinase (SMase), sugerindo que o parasita degrade a SM do hospedeiro, possivelmente auxiliando sua sobrevivência no interior do macrófago (ZHANG et al., 2009), evidenciando a importância da via de salvação nesta fase do parasita.

Figura 3. Via de biossíntese de esfingolípídios em *Leishmania*. LCB: base esfingóide de cadeia longa, S-1-P: esfingosina-1-fosfato, DHS-1-P: diidroesfingosina-1-fosfato, IPC: inositolfosforilceramida, EtN-P: etanolamina fosfato, DAG: diacilglicerol, PC: fosfocolina, PE: fosfoetanolamina. SPT: serina palmitoil transferase; SK: esfingosina quinase; CerS: ceramida sintase, CDase: ceramidase, IPCS: IPC sintase, ISCL: inositol esfingolipidiofosfolipase C-like, SPL: esfingosina-1-fosfato liase, EPCT: etanolamina-fosfato citidililtransferase, CPCT: colinafosfato citidililtransferase, C/EPT: colina/etanolamina fosfotransferase. Fonte: Modificado de Zhang e Beverley, 2010.

Em *Leishmania*, a ceramida também age como precursora de outros lipídios essenciais, sendo a esfingosina 1-fosfato convertida a etanolamina fosfato (EtN-P) para uso na via de Kennedy (ZHANG et al., 2007; ZHANG; BEVERLEY, 2010). Neste caso, EtN-P é convertida em Colina-P, e essas podem dar origem a PE e PC, respectivamente (Figura 3) (ZHANG; BEVERLEY, 2010).

Conforme comentado acima, ao contrário do observado em mamíferos e plantas, os parasitas do gênero *Leishmania* não sintetizam SM e GSLs complexos (KANESHIRO et al., 1986). Neste caso, o esfingolípídio predominante é o IPC que corresponde a cerca de 5 a 10% dos lipídios totais de membrana (KANESHIRO; JAYASIMHULU; LESTER, 1986) (Figura 3). Já *Trypanosoma cruzi* sintetiza IPC (FIGUEIREDO et al., 2005) e SM (OLIVEIRA et al., 1977), enquanto que *T. brucei* sintetiza SM, EPC e IPC (SUTTERWALA et al., 2008). A

abundância de IPC em *Leishmania* e sua ausência em células de mamíferos têm sugerido que esta via pode ser um bom alvo para intervenção terapêutica (DENNY et al., 2004).

Com o intuito de se identificar possíveis mecanismos de ação de tamoxifeno que explicassem sua atividade leishmanicida, iniciou-se em nosso laboratório a investigação sobre a interferência do tamoxifeno no metabolismo de ceramida em *Leishmania*. Estudos prévios de marcação metabólica de parasitas marcados com C₆-NBD-ceramida e submetidas ao tratamento com tamoxifeno, demonstraram que o fármaco alterou o perfil de incorporação de ceramida em promastigotas de *L. amazonensis* (MIGUEL, 2011), sugerindo possível redução dos níveis de IPC.

Considerando-se, portanto, a trajetória da pesquisa do uso de tamoxifeno na quimioterapia da leishmaniose descrita acima, nos propusemos neste trabalho a determinar a interação entre tamoxifeno e os fármacos convencionais quando co-administrados *in vitro* e em modelo experimental de LC, assim como investigar a interferência de tamoxifeno na biossíntese de SLs em *Leishmania* buscando esclarecer o mecanismo de sua ação leishmanicida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar novas alternativas para a quimioterapia de LC utilizando tamoxifeno em terapia combinada.

Caracterizar o efeito de tamoxifeno sobre a via de biossíntese de esfingolipídios em promastigotas de *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos Específicos

No que diz respeito à investigação de alternativas quimioterápicas para a LC utilizando tamoxifeno em terapia combinada, pretende-se:

- Estudar as interações entre tamoxifeno e anfotericina B ou miltefosina *in vitro*, em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.
- Estudar as interações entre tamoxifeno e Sb^V *in vitro*, em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.
- Estudar as interações entre tamoxifeno e anfotericina B, miltefosina e Sb^V *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.
- Testar a utilização de tamoxifeno por via tópica em esquemas de associação de drogas.

Quanto à investigação de possível interferência de tamoxifeno na via de biossíntese de esfingolipídios, propõe-se:

- Verificar o efeito de tamoxifeno sobre a biossíntese de esfingolipídios em promastigotas de *L. amazonensis*.
- Caracterizar o transporte de inositol em promastigotas de *L. amazonensis*.
- Avaliar possíveis alterações no transporte de inositol em parasitas tratados com tamoxifeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Parasitas

Os parasitas utilizados nesse trabalho foram: a cepa tipo de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* MHOM/BR/73/M2269, gentilmente cedida pelo Dr. Jeffrey Jon Shaw (Departamento de Parasitologia, ICB-USP), denominada nessa trabalho como cepa selvagem (La-WT). Foram também utilizadas linhagens derivadas dessa cepa e que são expressoras de luciferase (La-LUC) tanto a partir de DNA mantido em episomos (REIMAO et al., 2013) como por integração no genoma (OLIVEIRA, 2014).

3.1.2 Drogas

O tamoxifeno (T5648), citrato de tamoxifeno (T9262) e miltefosina (M5571) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi Aventis, 300 mg/ml [contendo 80 mg/mL de Sb^v]) foi gentilmente cedida pelo Ministério da Saúde. Desoxicolato de anfotericina B (A2411), adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), foi utilizada para experimentos *in vitro* e desoxicolato de anfotericina B (Cristália, Itapira, SP, Brasil), gentilmente cedida pelo Ministério da Saúde, foi utilizada para experimentos *in vivo*. A solução estoque de tamoxifeno (10 mM) foi preparada em DMSO e armazenada a -20 °C. Anfotericina B e miltefosina (10 mM) foram preparadas em água estéril e mantidas nas mesmas condições. Para ensaios *in vitro*, as soluções estoque foram diluídas em meio de cultura. Para experimentos *in vivo*, desoxicolato de anfotericina B, miltefosina e Sb^v foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). Citrato de tamoxifeno foi diluído em solução salina nos experimentos de associação com anfotericina B. Para ensaios de associação com miltefosina e Sb^v, citrato de tamoxifeno foi diluído em veículo 1 [45% Cremofor®A25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)] e veículo 2 [5% DMSO, 15% Cremofor^{EL}-Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 80% salina], respectivamente. Todos os fármacos foram preparados diariamente imediatamente antes de serem administrados aos animais.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*

Promastigotas de La-WT foram cultivados em meio M199 (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, HEPES 40mM pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005% e penicilina/estreptomicina 100 µg/mL e incubados a 25 °C, com repiques semanais.

Promastigotas de La-LUC, obtidos por expressão a partir de episômos (REIMAO et al., 2013) ou por integração no genoma (OLIVEIRA, 2014), foram mantidos nas mesmas condições de cultura, exceto pela adição de 32 µg/mL de G418 ou 32 µg/mL de higromicina, respectivamente.

3.2.2 Determinação da concentração de droga 50% efetiva contra promastigotas de *L. amazonensis*

Para determinar a concentração de droga 50% efetiva (CE₅₀) contra promastigotas de *L. amazonensis*, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (Costar®) em concentrações de 2×10^7 promastigotas por mL (volume final de 200 µL) e incubadas a 25°C na presença de concentrações crescentes de anfotericina B (2 - 500 nM), miltefosina (3,75 - 44 µM) e/ou tamoxifeno (1,5 to 27 µM), durante 24 horas. A viabilidade do parasita foi avaliada por MTT como descrito por Zauli-Nascimento e co-autores (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010). Em resumo, após o período de incubação com a droga, promastigotas foram incubados com MTT durante duas horas. O ensaio foi finalizado com a lise dos parasitas com SDS 20% seguida de homogeneização. A porcentagem de parasitas viáveis foi calculada a partir de leitura da absorbância a 595 nm e utilizando-se como referência 690 nm. As medidas de absorbância foram efetuadas em espectrômetro de absorbância Polarstar Omega (BMG Labtech). Os valores de CE₅₀ foram determinados por regressão sigmoide das curvas de dose-resposta de cada droga. Cada ponto foi testado em triplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

3.2.3 Obtenção de macrófagos, infecção e determinação da concentração efetiva 50% de fármacos contra amastigotas intracelulares de L. amazonensis

Macrófagos derivados de medula óssea foram obtidos de camundongos BALB/c conforme Zamboni e Rabinovitch (ZAMBONI; RABINOVITCH, 2003). Após sacrifício dos animais em câmara de CO₂, foram retirados os fêmures e tíbias, os quais tiveram seu conteúdo medular extraído por meio de lavagem com 10 mL de meio R2030 (meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino e 30% de sobrenadante de células L929 contendo fator de diferenciação de macrófagos) utilizando agulha (22G) e seringa. Os monócitos foram mantidos em placas de Petri de poliestireno (Optilux™) por 7 dias em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% CO₂, acrescentando-se 4 mL de meio R2030 no terceiro dia. Após diferenciação, macrófagos foram distribuídos em placas de 16 (NUNC™) ou 96 poços (Costar®) em densidades de 8×10^5 macrófagos por poço e incubados a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ durante 24 horas para a adesão das células.

Macrófagos foram infectados com promastigotas de La-WT ou La-LUC em fase estacionária (3° ou 4° dia de cultura) na proporção de 20:1 (promastigotas: macrófago) a 33 °C por 3 horas. Parasitas extracelulares foram removidos por lavagem com PBS a 37 °C. As células foram então incubadas em meio RPMI (10% de SFB) contendo diferentes concentrações de tamoxifeno (1,5 to 12 µM), anfotericina B (0,5 – 200 nM) e/ou miltefosina (1,9 to 15 µM) durante 48 horas a 33 °C. Ensaios realizados com Sb^v (18.75 to 1,200 µg/mL) e tamoxifeno (0,19 to 12 µM) foram finalizados após 6 dias, sendo realizada a troca de meio com a droga no terceiro dia.

No fim do experimento, a taxa de infecção de macrófagos foi avaliada por microscopia óptica e/ou atividade de luciferase (LUC). Para microscopia óptica, células foram coradas com INSTANT PROV® (NewProv®, Brasil) e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinada analisando 500 células em cada amostra. O ensaio de LUC foi realizado utilizando-se o kit One Glo Luciferase Assay System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o meio de cultura de cada amostra foi substituído por 100 µL de solução contendo 20% de Luciferase OneGlo (Promega) em PBS 1X a temperatura ambiente. Após intensa homogeneização, as unidades de luminescência foram registradas em leitor de microplacas (Polarstar Omega, BMG Labtech) sendo determinada a porcentagem de infecção das amostras tratadas em comparação ao

controle não tratado (100% de infecção). Os valores de CE_{50} foram determinados por regressão sigmoide das curvas de dose-resposta de cada droga. Cada ponto foi testado em duplicata ou triplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

3.2.4 Ensaios de associação *in vitro*

As interações entre tamoxifeno e anfotericina B/miltefosina/Sb^v foram avaliadas *in vitro* através do método de isoblograma de razão fixa modificado (FIVELMAN et al., 2004; SEIFERT; CROFT, 2006). A CE_{50} pré-determinada foi utilizada para definir as concentrações máximas das drogas individuais, assegurando que a CE_{50} estivesse no meio da diluição seriada (4º poço). As maiores concentrações das soluções foram preparadas em proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de tamoxifeno: anfotericina B/miltefosina/Sb^v, as quais foram diluídas em série (base 2) até o sétimo poço em duplicata. Promastigotas e amastigotas intracelulares foram incubados na presença dos fármacos tamoxifeno:anfotericina B ou tamoxifeno:miltefosina durante 48 horas. Amastigotas intracelulares foram tratados com tamoxifeno:Sb^v durante 6 dias. A taxa de sobrevivência dos promastigotas foi determinada pelo método de MTT e a taxa de infecção de macrófagos por ensaio de LUC. Os dados obtidos foram utilizados para determinar a CE_{50} das drogas nas variadas combinações. A concentração inibitória fracionada (CIF) de cada combinação foi determinada conforme Seifer e Croft (2006). As CIFs e a somatória das CIFs (Σ CIFs) foram calculadas como se segue:

$$\text{CIF da droga} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ da droga associada}}{\text{EC}_{50} \text{ da droga isolada}}$$

e

$$\Sigma \text{CIFs} = \text{CIF da droga A} + \text{CIF da droga B.}$$

A Σ CIF foi utilizada para classificar a natureza da interação entre as drogas da seguinte forma: sinergismo ($\Sigma \text{CIF} \leq 0,5$), indiferença ($\Sigma \text{CIF} > 0,5$ e ≤ 4) ou antagonismo ($\Sigma \text{CIF} > 4$) (ODDS, 2003).

3.2.5 Ensaios *in vivo*

Camundongos BALB/c, com 30 a 60 dias de vida foram infectados na base da cauda (volume final de 20 μ L) com 10^6 promastigotas de La-WT ou La-LUC em fase logarítmica tardia (5º dia de cultura). Os animais foram tratados com anfotericina B e Sb^v por via intraperitoneal (volume final de 200 μ L) ou com miltefosina via oral, através de gavagem (volume final de 100 μ L). O citrato de tamoxifeno foi administrado por via intraperitoneal, oral ou tópica. Os tratamentos orais ou parenterais foram realizados durante 15 a 20 dias consecutivos e os tópicos durante 20 a 30 dias consecutivos.

Os tratamentos foram sempre iniciados 3-4 semanas após a infecção, quando as lesões já estavam estabelecidas e aparentes. Imediatamente antes do início do tratamento as lesões eram avaliadas e os animais distribuídos em grupos experimentais homogêneos (n= 5-6) de acordo com o tamanho da lesão.

As diferentes terapias utilizadas foram avaliadas por parâmetros clínicos e parasitológicos. A avaliação clínica foi realizada através de medidas semanais do diâmetro médio da lesão (média dos diâmetros horizontal e vertical da cauda no sítio da lesão). As medidas foram realizadas com paquímetro (Mitutoyo Corp., Japão). A avaliação do crescimento da lesão levou em consideração a diferença entre valor do diâmetro médio da cauda no fim do tratamento ou no fim do experimento (4-5 semanas após o fim do tratamento) e o valor da espessura da cauda obtido no início do tratamento (dia 0). A carga parasitária dos animais foi avaliada por diluição limitante ou por sistema de bioimageamento *in vivo* (IVIS), conforme descrito no manuscrito anexo (APÊNDICE A).

Para determinar a dose efetiva 50% (DE₅₀) de cada fármaco, os animais foram tratados com 3,5, 13 e 26 mg/Kg/dia de tamoxifeno; 0,3, 1 e 3 mg/Kg/dia de anfotericina B e 2, 4 e 13 mg/Kg/dia de miltefosina. Os valores de DE₅₀ *in vivo* de cada droga foram determinados a partir de curvas dose-resposta a partir dos valores de espessura de lesão.

O ensaio de associação *in vivo* de tamoxifeno e anfotericina B foi realizado associando as doses referentes aos valores de DE₅₀ e DE₉₉ de cada droga determinadas a partir da curva de dose resposta obtidas anteriormente. As doses de DE₅₀ e DE₉₉ de tamoxifeno e anfotericina B foram, respectivamente, 13 e 26 mg/Kg/dia e 2 e 4 mg/Kg/dia, sendo realizada a associação entre as menores e maiores doses de tamoxifeno e anfotericina B, como segue: 13 mg/Kg/dia de tamoxifeno associado com 2

mg/Kg/dia de anfotericina B e 26 mg/Kg/dia de tamoxifeno associado com 4 mg/Kg/dia de anfotericina B. Os fármacos foram administrados por via intraperitoneal durante 20 dias.

O ensaio de associação *in vivo* de tamoxifeno e miltefosina foi realizado associando as doses referentes aos valores de DE₂₅ e DE₅₀ de cada droga determinadas a partir da curva de dose resposta obtida anteriormente. As doses de DE₂₅ e DE₅₀ de tamoxifeno e miltefosina foram, respectivamente, 6,5 e 13 mg/kg/dia e 2 e 4 mg/kg/dia, sendo realizada a associação entre as menores e maiores doses de tamoxifeno e miltefosina como segue: 6,5 mg/kg/dia de tamoxifeno associado com 2 mg/kg/dia de miltefosina; 13 mg/kg/dia de tamoxifeno associado com 4 mg/kg/dia de miltefosina. Os fármacos foram administrados por via oral durante 15 dias consecutivos.

O ensaio de associação de tamoxifeno e Sb^v foi realizado utilizando-se 13 mg/kg/dia de tamoxifeno (via oral), 40 e 80 mg/kg/dia de Sb^v (via intraperitoneal) de forma isolada por 15 dias consecutivos. Os animais do grupo associado foram tratados com 40 mg/kg/dia de Sb^v e 13 mg/kg/dia de tamoxifeno. A interação entre os fármacos também foi avaliada utilizando tamoxifeno por via tópica. O tratamento foi realizado utilizando tamoxifeno 1% diluído em etanol ou citrato de tamoxifeno 0,1% em creme base *oil-free* (Drogaderma, São Paulo - Brazil) durante 30 dias consecutivos. Tratamentos utilizando 40 e 80 mg/kg/dia de Sb^v foram realizados durante 20 dias consecutivos. As associações foram realizadas da seguinte forma: tamoxifeno 1% diluído em etanol + 40 mg/kg/dia de Sb^v ou citrato de tamoxifeno 0,1% em creme *oil-free* + 40 mg/kg/dia de Sb^v.

Em todos os experimentos foram utilizados grupos controle que receberam o mesmo veículo utilizado para diluir o tamoxifeno.

Os animais foram obtidos do Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Parasitologia (ICB/USP) e todos os ensaios foram realizados de acordo com as normas adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todas as gaiolas dos animais em experimentação foram enriquecidas ambientalmente com um "igloo" (environmental enrichment - Alesco Industry, Brazil).

3.2.6 Marcação metabólica

Ensaios de marcação metabólica foram realizados a partir de 8×10^8 promastigotas de La-WT em fase estacionária. Estes foram centrifugados a 1.000 g por 10 minuto. O precipitado de células foi ressuspenso em PBS contendo glicose (1g/L) em densidade final de 5×10^7 células/mL e tratado com 10 μ M de tamoxifen por 4 horas. Após 90 minutos de tratamento, as células foram marcadas metabolicamente com 2-6 μ Ci de [3 H]-esfingosina [Sphingosine, D-erythro-[3- 3 H], atividade específica: 18,4 Ci/mmol (0,681 TBq/mmol), NET 1072050UC, PerkinElmer®] ou 6 μ Ci de [3 H]-inositol [Inositol, *myo*-[2- 3 H(N)]-, atividade específica: 22,5 Ci/mmol (0,832 TBq/mmol), NET 114A205UC, PerkinElmer®] totalizando 150 minutos de marcação. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de Hank's (NaCl 137 mM, KCl 5,3 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, glicose 10 mM, NaHCO_3 4,2 mM e Na_2HPO_4 0,4 mM, pH 7,2) com a finalidade de remover os precursores marcados não incorporados pelo parasita. Os lipídios de 4×10^8 promastigotas foram extraídos conforme descrito por Boath e colaboradores com algumas modificações (BOATH et al., 2008). Em resumo, o pellet de células foi ressuspenso em 1,24 mL de clorofórmio: metanol: água miliQ (1:1:0,75, v:v:v) e homogeneizado por 30 min em agitador magnético em velocidade máxima. Após centrifugação a 2 g por 10 min, a solução dividiu-se em fase orgânica e fase aquosa. A fase orgânica contendo os lipídios foi separada em novo tubo e a fase aquosa foi utilizada para nova extração com 600 μ L de clorofórmio. Este procedimento foi repetido duas vezes e as fases orgânicas obtidas nas 3 extrações foram reunidas, evaporadas em N_2 gasoso e armazenadas a -20°C .

3.2.7 Análise por cromatografia de alta resolução em camada delgada

As frações lipídicas obtidas na presença ou ausência de tamoxifeno foram analisadas por cromatografia de alta resolução em camada delgada (HPTLC). Os lipídios extraídos foram separados por corrida em placa de Sílica gel 60 (1.05547.0001, Merck), utilizando-se quatro sistemas de corrida: (1) clorofórmio:metanol:água (60:35:8, v/v/v) em 20% da corrida e clorofórmio:metanol:ácido acético (90:2:8, v/v/v) no restante da corrida (sistema de corrida 1) (ICHIKAWA et al., 1994); (2) clorofórmio:metanol:água (60:35:8,

v/v/v) em 50% da corrida e clorofórmio:metanol:ácido acético (90:2:8, v/v/v) no restante da corrida (sistema de corrida 2) (ICHIKAWA et al., 1994 modificado); (3) clorofórmio:metanol:metilamina 40% (58:32:9,3, v:v:v) (sistema de corrida 3) (CASTRO et al., 2013) e (4) clorofórmio:metanol:água (40:40:12, v:v:v) (sistema de corrida 4) (MARTIN; SMITH, 2006).

Foram utilizados padrões de C16-ceramida (d18:1/16:0) (N-palmitoyl-D-*erythro*-sphingosine) (860516P, Avanti®Polar Lipids, INC), PI 18:1 [1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol (ammonium salt)] (85014P, Avanti®Polar Lipids, INC) e Acil-ceramida (1-oleoyl-N-heptadecanoyl-D-*erythro*-sphingosine) (860526P, Avanti®Polar Lipids, INC) para detecção dos valores de retenção (R_f) em cada experimento. O valor de R_f foi calculado dividindo a distância de migração da banda de interesse a partir da origem pela distância total da corrida (a partir da origem até a frente). Os padrões de corrida foram analisados por coloração em vapor de iodo. Os padrões serviram como referência de migração para identificação de bandas obtidas de extrato lipídico de parasitas marcados metabolicamente com substratos radioativos.

Os lipídios marcados foram visualizados após vaporização da placa com En³Hance® (PerkinElmer®) seguido da exposição em filme autoradiográfico (Amersham Hyperfilm™ ECL, 18 x 24 cm) (GE Healthcare) a - 80° C por 5 a 66 dias, dependendo da intensidade de marcação dos extratos.

As imagens obtidas após revelação dos filmes de autoradiografia foram digitalizadas e analisadas através do software ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>) calculando-se o aumento ou redução de intensidade de cada uma das bandas em relação ao grupo controle. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

Amostras lipídicas de parasitas não marcados foram corridas no sistema 1 em paralelo com amostras de parasitas marcados para identificação e coleta de bandas de interesse para análise por espectroscopia de massas.

3.2.8 Re-extração de lipídios da sílica

As bandas de interesse identificadas na placa de sílica foram raspadas e transferidas para tubos COREX® e o produto lipídico foi re-extraído da sílica repetindo 3 vezes o seguinte processo: adição de clorofórmio:metanol:água (3:3:0,8, v:v:v),

homogeneização em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner VWR B2.500A – DTH, VWR North American Cat No 98000-346) por 60 segundos, homogeneização por agitador magnético durante 90 minutos a temperatura ambiente, seguida de nova homogeneização em banho de ultrassom por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas a 2.600 *g* por 10 minutos e a fase orgânica separada em novo tubo. As três fases orgânicas foram secas em N₂ gasoso e armazenadas a – 20 °C.

3.2.8 Análise por Espectrometria de Massas

As amostras não marcadas provenientes das bandas de interesse re-extraídas da sílica foram encaminhadas para análise de ESI-MS. Todas as análises foram realizadas no laboratório do Dr. Norton Heise, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras foram suspensas em 100 µL de clorofórmio: metanol (1:1) contendo 1 mM de cloreto de lítio. Antes da injeção, as amostras foram diluídas 1:10 neste mesmo solvente e analisadas no aparelho AmaZon SL (Electrospray Ionization (ESI) – Ion Trap) com fluxo de injeção de 3 µL/min (seringa Hamilton 100 µL) nos modos positivo e negativo. A análise foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: nebulizadores de gás nitrogênio (10 psi), gás secante (5 L/min), temperatura da fonte (200 °C), fonte de ionização (- 4,5 kV), gás de colisão (Hélio), sendo analisados os picos mais abundantes presentes na faixa de massas de 50 a 900 *m/z*.

3.2.9 Hidrólise alcalina

Produtos lipídicos purificados, provenientes de bandas de interesse extraídas da sílica após corrida em HPTLC, foram ressuspensos em 200 µL de 100 mM NaOH preparado em metanol:água (95:5, v:v) durante 1 hora a 37 ° C. Alternativamente, o mesmo produto foi ressuspenso em 100 mM NaCl preparado em metanol:água (95:5, v:v). O tratamento foi interrompido com adição de 800 µL de 20% de ácido acético diluído em água e 200 µL de 0,5 M de TRIS-HCl pH 7,5. Os produtos foram extraídos duas vezes com 1.200 µL de 1-butanol saturado em água, seguida de homogeneização intensa e recuperação da fase superior. As duas fases contendo 1-butanol e os produtos lipídicos referentes aos produtos de interesse foram homogeneizados com 1.200 µL de água saturada em 1-

butanol para remover o excesso de sal. Posteriormente, as amostras foram secas em N₂ gasoso e analisados por HPTLC utilizando as mesmas condições de detecção utilizadas inicialmente.

3.2.10 Transporte de Inositol

O transporte de *myo*-inositol em promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado conforme descrito em Seyfang e Landfear (1999) com algumas modificações. Resumidamente, promastigotas em fase logarítmica (3º dia de cultura) foram lavados três vezes em PBS pH 7,4 (centrifugações a 3.000 g a 4 °C). Antes da última lavagem, as células foram contadas e ressuspensas em PBS em volume equivalente a 3×10^8 promastigotas por mL. Cem µL de parasitas (3×10^7 promastigotas) foram transferidos para tubo tipo eppendorf®, onde foram realizados os ensaios de transporte. O transporte de *myo*-inositol foi iniciado após adição de 100 µL da Solução de Transporte (concentrações variáveis de *myo*-inositol não marcado mais 0,3 µCi de [³H]*myo*-inositol em PBS, pH 7,4). A Solução de Transporte foi preparada 2 x concentrada. Após 2 minutos de incubação, o transporte de *myo*-inositol foi interrompido adicionando 800 µL de Solução STOP gelada (50 mM de *myo*-inositol não marcado em PBS, pH 7,4) e transferindo o tubo imediatamente ao gelo (SEYFANG; LANDFEAR, 1999). As células foram lavadas três vezes em PBS gelado (centrifugação a 13.000 g por 50 segundos) para remover o [³H]*myo*-inositol livre. Posteriormente, as células foram lisadas em 100 µL de SDS 1% e o material radioativo incorporado foi avaliado por contagem (CPM) em espectrofotômetro de cintilação Beckman LS 5000 TD. Como controles foram utilizadas amostras tempo zero de transporte, as quais foram obtidas adicionando a Solução de Transporte ao mesmo tempo que a Solução STOP, seguindo o ensaio como descrito acima. Os valores de CPM obtidos das amostras de tempo zero foram subtraídos das demais amostras avaliadas.

Os valores de CPM obtidos se referem somente à quantidade de *myo*-inositol marcado incorporado. A massa total de *myo*-inositol transportada para o interior das células foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{myo-inositol incorporado (nmol)} = \frac{\text{myo-inositol (nmol)} \times [\text{}^3\text{H}]\text{myo-inositol (CPM)}}{[\text{}^3\text{H}]\text{myo-inositol total (CPM)}},$$

onde: *myo*-inositol (nmol) corresponde à quantidade de *myo*-inositol não marcado disponível no ensaio; [^3H]*myo*-inositol (CPM) corresponde à contagem obtida para *myo*-inositol marcado que foi transportado para o interior da célula; e [^3H]*myo*-inositol total (CPM) corresponde a quantidade total, em CPM, de *myo*-inositol marcado disponível no ensaio. A massa total de *myo*-inositol transportada para o interior das células foi convertida para pmol e dividida pelo tempo de transporte para obter a quantidade de *myo*-inositol transportado em pmol por minuto (pmol/min).

A curva de saturação de substrato *myo*-inositol foi determinada realizando o ensaio de transporte no tempo fixo de 2 minutos e concentrações variáveis do substrato, como 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 μM de *myo*-inositol (Solução de Transporte: 100, 200, 400, 1.000, 2.000 e 4.000 μM de *myo*-inositol e 0,3 μCi de [^3H]*myo*-inositol). Os valores obtidos foram utilizados para construir uma curva de saturação de *myo*-inositol no software GraphPad Prism 5. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

3.2.11 Interferência do tamoxifeno no transporte de Inositol

Com a finalidade de avaliar a interferência de tamoxifeno na atividade do transportador de inositol em promastigotas de *L. amazonensis*, após as lavagens em PBS, as células foram pré-incubadas com 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno por 10 minutos a 25 °C e o transporte foi realizado nas condições de K_m (200 μM de *myo*-inositol) e na concentração de *myo*-inositol onde se obtém o V_{max} (2.000 μM de *myo*-inositol). Como controle de inibição foram utilizados 2 mM de *myo*- e *scyllo*-inositol. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Para determinar o tipo de inibição que tamoxifeno exerce sobre o transportador de inositol de *L. amazonensis* foi realizada curva de saturação de substrato *myo*-inositol na presença de diferentes concentrações de tamoxifeno. Promastigotas previamente incubados com 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno por 10 minutos a 25 °C foram submetidos ao ensaio de transporte no tempo fixo de 2 minutos e concentrações variáveis do

substrato, como 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 μ M de *myo*-inositol. Os valores obtidos foram utilizados para construir uma curva de saturação de *myo*-inositol na presença de tamoxifeno no software GraphPad Prism 5. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

3.2.12 Marcação com Iodeto de Propídio

Os ensaios de marcação com iodeto de propídio foram realizados nas mesmas condições do ensaio de transporte de *myo*-inositol previamente tratados com tamoxifeno. No entanto, após adição da solução STOP, uma alíquota dos parasitas (10 μ L) foi diluída 10 vezes em PBS e incubada com 5 μ g/mL de iodeto de propídeo por 5 minutos a temperatura ambiente. A fluorescência de iodeto de propídio foi observada por microscopia de fluorescência no filtro de 540 nm (luz verde) e a porcentagem de células iodeto de propídio positivas foram determinadas por contagem de células totais e iodeto de propídio positivas em câmara de Neubauer.

3.2.13 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o teste One way ANOVA com pós-testes de Tukey utilizando-se o software GraphPad Prism 5. Os resultados foram considerados significados quando $p < 0.05$. A análise dos resultados de diluição limitante foi realizada utilizando-se o programa ELIDA (ELIDA Software Carl Tarswel).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Utilização de luciferase como repórter em ensaios de atividade de fármacos

Uma linhagem mutante de *L. amazonensis* expressora de luciferase havia sido obtida em nosso laboratório (MIGUEL, 2011). A fim de facilitar o processo de avaliação de atividade de drogas *in vitro* e *in vivo* para espécies do gênero *Leishmania*, foram padronizados ensaios de detecção de atividade de LUC para promastigotas, amastigotas intracelulares e amastigotas provenientes ou presentes em lesões de camundongos BALB/c infectados com a linhagem mutante de *L. amazonensis*, conforme descrito no artigo **“Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool”**, (Reimão JQ¹, Trinconi CT¹, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Kalil SP, Uliana SR) publicado no periódico *Journal of Microbiological Methods* em 2013 (APÊNDICE A).

Inicialmente, foi avaliada a relação entre o número de promastigotas de *L. amazonensis* expressores de LUC (La-LUC) e a atividade de luciferase. Observamos que a atividade de LUC, avaliada por luminometria ou por bioimageamento, estava diretamente relacionada ao número de promastigotas em cultura.

Para validar sua utilização em ensaios *in vivo*, era essencial que o comportamento da linhagem transfectante fosse comparado com a cepa selvagem parental utilizando diversos parâmetros *in vitro* e *in vivo*. Promastigotas de La-WT e La-LUC apresentaram perfis de crescimento, infecção e sensibilidade a drogas indistinguíveis. O mesmo foi observado em ensaios com a forma amastigota intracelular do parasita em macrófagos de medula. A cepa transgênica também apresentou perfil de progressão da doença no modelo experimental de LC semelhante ao da cepa selvagem.

Com a finalidade de facilitar a avaliação de eficácia de drogas em modelos experimentais *in vivo*, foi realizada a padronização da atividade de LUC, por bioimageamento e ensaio de LUC *ex vivo*, para avaliação da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com La-LUC e tratados com anfotericina B. A quantificação de parasitas através de medida da atividade enzimática foi comparável à

¹ Ambos autores contribuíram igualmente para este trabalho

avaliação por métodos parasitológicos clássicos (diluição limitante). Além disso, foi possível determinar a DE_{50} de anfotericina B em modelo experimental de LC. Em conclusão, a quantificação de parasitas por bioluminescência, *in vivo* e *ex vivo*, mostrou-se eficaz para a determinação da carga parasitária e, portanto, útil na avaliação da eficácia do fármaco (REIMAO et al., 2013, APÊNDICE A).

4.2 Associação de fármacos

A possibilidade de introdução de terapia combinada ao tratamento da leishmaniose tem sido bastante defendida já que as estratégias terapêuticas atuais apresentam diversas desvantagens, como baixa eficácia e elevada toxicidade (AMATO et al., 2008; SUNDAR; SINGH; SINGH, 2014; VAN GRIENSVEN et al., 2010; WHO, 2010). A estratégia de combinação de drogas tem mostrado ser muito eficaz na melhora terapêutica de diversas doenças infecciosas (KREMSNER; KRISHNA, 2004; MITCHISON; DAVIES, 2012; VAN GRIENSVEN et al., 2010). Desta forma, decidimos investigar as interações entre tamoxifeno e os fármacos mais utilizados na quimioterapia das leishmanioses.

4.2.1 Associação de tamoxifeno e anfotericina B

Primeiramente, investigamos a interação de tamoxifeno com o fármaco mais potente disponível atualmente, a anfotericina B. A interação entre os fármacos foi testada *in vitro*, em promastigotas e amastigotas intracelulares, e *in vivo*, em modelo experimental de LC.

Os estudos *in vitro* demonstraram uma interação aditiva entre os fármacos testados. Ensaios realizados com amastigotas intracelulares apresentaram clara redução das CE_{50} s quando diferentes combinações de tamoxifeno:anfotericina B foram utilizadas.

Em modelo animal, o tratamento com esquemas terapêuticos combinados utilizando doses equivalentes às DE_{50} e DE_{99} de cada fármaco indicaram interação aditiva entre tamoxifeno e anfotericina B. Os resultados detalhados referentes à interação entre tamoxifeno e anfotericina B encontram-se descritos no artigo publicado no periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* intitulado “**Combination therapy with**

tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis” (Trinconi CT, Reimão JQ, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Uliana SR) (APÊNDICE B).

4.2.2 Associação de tamoxifeno e miltefosina

A interação *in vitro* e *in vivo* entre tamoxifeno e miltefosina também foi investigada e descrita no manuscrito intitulado **“Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *L. amazonensis*”** (Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC, Uliana SR) recentemente submetido para a revista *Journal of Antimicrobial Agents* (APÊNDICE C). Resumidamente, uma interação indiferente ou aditiva entre tamoxifeno e miltefosina foi demonstrada *in vitro* utilizando formas promastigotas e amastigotas intracelulares de La-WT e La-LUC, respectivamente. Nestes ensaios, foi observado decréscimo nos valores de CE₅₀ quando as drogas foram administradas em combinação. Embora identificado um padrão de interação indiferente, ensaios de curva de crescimento e seleção de parasitas resistentes à miltefosina com formas promastigotas de La-WT demonstraram que tamoxifeno é capaz de impedir o crescimento e seleção de parasitas resistentes à miltefosina em concentrações equivalentes à CE₅₀.

Utilizando o modelo experimental de LC, camundongos BALB/c infectados com La-LUC foram submetidos a esquemas terapêuticos utilizando as DE₂₅ e DE₅₀ de tamoxifeno e miltefosina em forma combinada ou isolada. No fim do tratamento e 30 dias após o término do tratamento, a co-administração de tamoxifeno e miltefosina em doses equivalentes à DE₂₅ apresentou melhor evolução clínica e parasitológica do que o esquema de terapia única com cada um dos fármacos. O regime de dose elevada resultou em resposta clínica e parasitológica tão eficaz quanto a monoterapia com miltefosina, demonstrando claramente que a co-administração de tamoxifeno não perturba a eficácia de miltefosina em modelo animal.

Tomados em conjunto, os dados aqui apresentados indicam que tamoxifeno pode ser um bom parceiro para a terapia combinada com miltefosina na clínica, uma vez que, em baixas concentrações, pode impedir a seleção de parasitas resistente à miltefosina *in vitro* e, ao mesmo tempo, não interfere na eficácia terapêutica da miltefosina quando é co-administrado em um modelo animal desafiador.

4.2.3 Associação de tamoxifeno e Sb^v

O terceiro fármaco avaliado em combinação com tamoxifeno foi o Sb^v, medicamento parenteral com uma variedade de efeitos indesejáveis. A interação entre tamoxifeno e Sb^v foi avaliada em amastigotas intracelulares e camundongos BALB/c infectados com La-LUC. Os resultados estão detalhados no manuscrito **“Oral and topical tamoxifen as a partner to pentavalent antimony therapy”** que será submetido para a revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (APÊNDICE D).

A combinação *in vitro* entre tamoxifeno e Sb^v, avaliada pelo método de isoblograma de razão fixa modificado, demonstrou interação aditiva entre os fármacos.

O efeito de tamoxifeno em combinação ou não com Sb^v foi avaliada em três séries de experimentos *in vivo*. Primeiramente, foi empregado o esquema terapêutico utilizando a DE₅₀ de tamoxifeno (13 mg/kg/dia) por via oral co-administrado com 40 mg/kg/dia de Sb^v por via intraperitoneal durante 15 dias. Os animais tratados com o esquema terapêutico combinado apresentaram melhora clínica e parasitológica equivalente àqueles tratados com as drogas isoladas nas mesmas doses ou com o dobro da dose de Sb^v (isto é, 80 mg/kg/dia). Este perfil clínico e parasitológico se manteve quatro semanas após o fim do tratamento.

Na segunda série de experimentos, a eficácia de tamoxifeno foi avaliada pela via tópica. Diferentes concentrações de tamoxifeno (0,01% a 1%) foram testadas em nanoemulsão ou solução de etanol 100%. De acordo com a avaliação clínica dos animais no fim do tratamento, o esquema terapêutico mais eficaz foi de 1% de tamoxifeno diluído em etanol, seguido de 0,2% de tamoxifeno em nanoemulsão.

Uma vez identificada a atividade de tamoxifeno por via tópica buscamos uma alternativa de formulação previamente testada em pacientes, como 0,1% de citrato de tamoxifeno em creme base *oil-free* (MACENA et al., 2006; PASQUETTI et al., 2010). Desta forma, a interação *in vivo* entre Sb^v e tamoxifeno por via tópica foi avaliada utilizando esquemas de co-administração de 40 mg/kg/dia de Sb^v por via intraperitoneal com 1% de tamoxifeno diluído em etanol ou 0,1% de citrato de tamoxifeno em creme base *oil-free*. Em ambos os casos, os esquemas terapêuticos combinados apresentaram melhor

resposta clínica e parasitológica do que a terapia isolada com 40 ou 80 mg/kg/dia de Sb^v no fim do tratamento e quatro semanas após.

Entre todos os esquemas terapêuticos empregados, aqueles baseados na monoterapia de 0,1% de citrato de tamoxifeno em creme base *oil-free* ou na administração concomitante de 1% de tamoxifeno em solução etanólica e 40 mg/kg/dia de Sb^v apresentaram melhor eficácia clínica e parasitológica no fim do tratamento e quatro semanas após o fim do tratamento.

A melhora clínica e parasitológica observada nos animais tratados com tamoxifeno por via oral ou tópica, co-administrado ou não com Sb^v, subsidia a conclusão de que tamoxifeno pode ser um bom candidato para quimioterapia da LC. Além disso, a formulação de citrato de tamoxifeno 0,1% em creme base *oil-free*, previamente testada em humanos para tratamento de quelóides, mostrou-se segura, estável, de fácil administração e barata (MACENA et al., 2006; PASQUETTI et al., 2010), sendo, portanto, uma alternativa adequada para o tratamento tópico de LC em combinação com Sb^v.

De maneira geral, tamoxifeno se mostrou um bom parceiro quando administrado concomitantemente com os principais fármacos disponíveis na terapêutica atual das leishmanioses. Em todas as situações foram observadas interações indiferentes ou aditivas entre os fármacos, demonstrando que tamoxifeno não interfere negativamente na ação terapêutica dos fármacos analisados.

Existem diversos fatores que apoiam o uso de tamoxifeno na terapia das leishmanioses de forma isolada ou combinada. Primeiramente tamoxifeno é um fármaco seguro, bem tolerado e de perfil clínico bem conhecido em humanos. Além disso, consiste em um fármaco barato, administrado por via oral (ou tópica) com boa estabilidade e de fácil acesso.

Recentemente demonstramos que parece ser impossível gerar parasitas resistentes a tamoxifeno em laboratório (COELHO et al., 2015), o que ressalta os benefícios de utilizá-lo em combinação com fármacos como miltefosina e Sb^v, além de sugerir a possibilidade de ação em múltiplos alvos em *Leishmania*, assim como ocorre em células tumorais humanas.

Um mecanismo de ação bem esclarecido e muito interessante de tamoxifeno em células tumorais é a sensibilização de células resistentes a múltiplas drogas graças à sua ação inibitória sobre a glicoproteína P (gp-P) (HOTTA et al., 1996; LIU et al., 2011; MAO et

al., 2014; SHEN et al., 2005). A gp-P é um transportador transmembrana da família de transportadores ABC que está presente em todos os organismos, incluindo *Leishmania*. Por outro lado, foi demonstrado que o mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais está relacionado com a modulação da gp-P (DO MONTE-NETO et al., 2011; GARG; GOYAL, 2015; SOLEIMANIFARD et al., 2014), no qual cepas resistentes ao fármaco apresentam maior expressão desta proteína e, conseqüentemente, menor acúmulo intracelular de antimônio em comparação às cepas sensíveis. Assim como ocorre em células tumorais resistentes a múltiplas drogas, a co-administração de um inibidor de gp-P com o Sb^v foi capaz de reverter a resistência destes parasitas resultando na cura de camundongos infectados com a cepa resistente (BHATTACHARJEE et al., 2015). A sensibilização de parasitas resistentes ao Sb^v ocorreu devido à redução da expressão e atividade de efluxo de gp-P com conseqüente retenção de antimônio intracelular durante a terapia com Sb^v, tanto *in vitro* como *in vivo*. Desta forma, a possibilidade de tamoxifeno sensibilizar parasitas resistentes a Sb^v por inibição de gp-P torna a hipótese de seu uso em co-administração com Sb^v em animais/pacientes infectados com parasitas resistentes muito interessante para ser testada no futuro.

4.3 Interferência de tamoxifeno na biossíntese de esfingolipídios em *Leishmania*

4.3.1 Marcação metabólica de *L. amazonensis* por [³H]-esfingosina ou [³H]-inositol

Uma estratégia metodológica pertinente para se avaliar a biossíntese de esfingolipídios de *Leishmania* é a marcação de parasitas com precursor metabólico marcado, como [³H]-esfingosina. Ao ser incorporada pela *Leishmania*, a [³H]-esfingosina pode ser acilada com cadeias de ácidos graxos do próprio parasita constituindo ceramidas, às quais podem ser posteriormente adicionados outros componentes polares à hidroxila do C-1 por uma ligação fosfodiéster ou glicosídica formando PSLs ou GSLs (NELSON; COX, 2002). Os lipídios formados a partir do precursor marcado podem ser claramente visualizados após obtenção de extrato lipídico dos parasitas seguida de análise por HPTLC. Além da marcação com [³H]-esfingosina, a marcação com [³H]-inositol também é muito útil na investigação da síntese de esfingolipídios de *Leishmania* uma vez que 15% dos PL de *Leishmania* possuem inositol em sua composição (KANESHIRO;

JAYASIMHULU; LESTER, 1986). A molécula de IPC compreende 40% dos lipídios que contém inositol em *Leishmania* (KANESHIRO; JAYASIMHULU; LESTER, 1986), sendo provável então a incorporação de [^3H]-inositol ao IPC por intermédio da marcação de moléculas de PI que doarão seu grupamento fosforilinositol para a molécula de ceramida e consequente formação de IPC.

Desta forma, incubamos 4×10^8 promastigotas de *L. amazonensis* na presença ou na ausência de 10 μM de tamoxifeno por 90 minutos, seguida de adição de 6 μCi [^3H]-esfingosina ou [^3H]-inositol durante 150 minutos, totalizando 240 minutos (4 horas) de tratamento. Lipídios totais dos parasitas foram extraídos e analisados por HPTLC, como mostrado na Figura 4.

A oferta de um precursor como a esfingosina levou à sua incorporação pelas formas promastigotas de *Leishmania* resultando em biossíntese de diferentes lipídios que apresentaram migração mais lenta correspondente à posição de PLs contendo inositol, esfingosina, ceramida e também outros lipídios com migração mais rápida (Figura 4). A incorporação do precursor inositol proporcionou a formação de três bandas bem definidas na região de migração mais lenta, denominadas como A, B e C (Figura 4). Estas moléculas apresentaram padrão de migração relativa (*R_f*) muito semelhante com aquelas visualizadas na marcação metabólica com esfingosina, sugerindo que ambas possuem os precursores esfingosina e inositol ou seus derivados em sua composição. De acordo com a intensidade das bandas obtidas em nossos ensaios de HPTLC, podemos observar que parasitas tratados com tamoxifeno apresentaram perfil lipídico diferente daqueles do grupo controle (Figura 4). Sob a ação de tamoxifeno, observa-se o redirecionamento de uma importante fração do precursor esfingosina para a síntese de um lipídio de migração rápida que foi denominado banda D. Por outro lado, observa-se a redução da síntese de SLs representados pelas bandas A, B e C nos dois tipos de marcação metabólica (Figura 4).

Figura 4. Efeitos de tamoxifeno na via de biossíntese de esfingolipídios de *L. amazonensis*. Marcação metabólica de 4×10^8 promastigotas de *L. amazonensis* com 6 μCi de $[^3\text{H}]$ -esfingosina ou $[^3\text{H}]$ -inositol tratados com 10 μM de tamoxifeno por 4 horas. Extrato lipídico total referente a 1×10^8 células foi aplicado em cada canaleta e separado por HPTLC utilizando sistema de corrida 1. Tempo de exposição: 20 dias. Sph*: extrato lipídico de parasitas marcados com $[^3\text{H}]$ -esfingosina, Ino*: extrato lipídico de parasitas marcados com $[^3\text{H}]$ -inositol, Ct: amostra de parasitas não tratados, Tam: amostra de parasitas tratados com tamoxifeno, C16-cer: padrão C16-ceramida, PI 18:1: padrão fosfatidilinositol 18:1, O: origem, F: frente.

As bandas A, B e C provenientes de extrato de parasitas marcados com [^3H]-inositol e tratados com tamoxifeno apresentam intensidade 64,6%, 71,1% e 20,3% menor do que aquelas observadas na amostra controle, respectivamente. Bandas de mesmo R_f estão presentes tanto no extrato lipídico de parasitas marcados com [^3H]-esfingosina (fonte para síntese de ceramida) como com [^3H]-inositol (fonte para a síntese de PI e IPC) (Figura 4). Desta forma, as bandas A, B e C podem ser IPC ou outra molécula que contenha a parte da esfingosina que possui a marcação radioativa e inositol.

A molécula de IPC é formada pela transferência de grupamento fosforilinositol proveniente do PI à ceramida, catalizado pela IPC sintase. Uma característica da molécula de IPC é a ausência de ligações éster em sua estrutura (Figura 5B), sendo a metodologia de hidrólise alcalina muito utilizada para confirmar a natureza desta molécula devido sua resistência a bases fortes (FIGUEIREDO et al., 2005; KANESHIRO; JAYASIMHULU; LESTER, 1986). A reação de hidrólise alcalina consiste na hidrólise de ligações ésteres na presença de uma base forte, como o NaOH (Figura 5A). Desta forma, o extrato lipídico da banda B (proveniente de parasitos marcados com [^3H]-esfingosina) eluído da sílica foi incubado com NaOH ou NaCl seguido de análise por HPTLC. Como esperado, as amostras submetidas à hidrólise alcalina apresentaram perfil de migração inalterado em relação às amostras controle (Figura 5C). Em conjunto, estes dados indicam que a banda B se trata de uma molécula de IPC, sendo possível afirmar que a síntese de IPC é reduzida em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno.

Figura 5. Caracterização da banda B por hidrólise alcalina. (A) Desenho esquemático da reação de hidrólise alcalina. (B) Esquema da molécula de IPC. (C) Extratos lipídicos das frações B proveniente de promastigotas de *L. amazonensis* marcados com 2 μ Ci de [3 H]-esfingosina e tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram incubados com 100 mM NaOH (canaleta 3 e 4) ou NaCl (canaleta 1 e 2) em solução aquosa de metanol a 95 % por 1 hora. Amostras equivalentes a 3 x 10⁸ promastigotas de *L. amazonensis* foram aplicadas em cada canaleta e separado por HPTLC utilizando sistema de corrida 2. Ct: parasitas não tratados, Tam: parasitas tratados com tamoxifeno, NaCl: tratamento com 100 mM NaCl, NaOH: tratamento com 100 mM NaOH, O: origem, F: frente.

Devido a baixa abundância de material referente a banda A, não foi possível realizar o procedimento de hidrólise alcalina. No entanto, os lipídios presentes em áreas correspondentes às bandas A e B foram eluídos de amostras não marcadas provenientes da mesma corrida e enviados para análise por espectrometria de massas, realizada pelo

Dr. Norton Heise da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O ESI-MS dos íons $[M-H]^-$ totais isolados de extrato lipídico total de *Leishmania* referente às amostras controle e tratadas com tamoxifeno correspondentes a banda B estão mostrados na Figura 1 do APÊNDICE E. Os íons preponderantes foram os correspondentes ao m/z de 778 e 806 que estão de acordo com íons de IPCs descritos previamente para *L. major* (HSU et al., 2007; ZHANG et al., 2005) (Figura 6). Os produtos provenientes da quebra dos íons presentes na banda B sugerem que o IPC com m/z de 778 seja composto por d16:1/18:0 (Figura 6A) em vez de d18:1/16:0 como descrito por Serrano e colaboradores (SERRANO et al., 1995). De maneira semelhante, a fragmentação MS^2 do ion a m/z 806 originou íons característicos de IPCs, os quais sugerem que o IPC seja composto por d18:1/18:0 (Figura 6B).

Figura 6. Íons preponderantes de extrato lipídico total de *Leishmania* eluído da banda B. Lipídios totais eluídos da banda B proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons referentes a m/z de 778 e 806 foram identificados como IPC-(d16:1/18:0) e IPC-(d18:1/18:0), respectivamente. IPC: inositol fosforil ceramida, m/z : massa/carga.

O ESI-MS dos íons $[M-H]^-$ totais isolados de extrato lipídico de *Leishmania* provenientes de amostras da banda A foram também analisados por espectroscopia de massas, porém os sinais de detecção foram muito mais fracos do que nas demais amostras e pouco abundantes quando comparado ao sinal de ruído (APÊNDICE E, figura 2). Os principais íons foram os correspondentes ao m/z de 598, 778, 796, 806 e 824, sendo a m/z de 806 apenas detectado na amostra tratada com tamoxifeno (APÊNDICE E, figura 2A e B). Baseado nas análises dos espectros MS^2 gerados a partir de cada uma destas espécies (não mostrado), foi possível identificar o ion m/z de 598 como sendo um

C18:1 *lyso*-acil PI (PULFER; MURPHY, 2003) (Figura 7, A). Os demais íons assinalados correspondem a diferentes IPCs compostos por d16:1/18:0-IPC (m/z 778, Figura 7B), t16:0/C18:0-IPC (m/z 796, Figura 7C), d18:1/18:0-IPC (m/z 806, Figura 7D) e t16:0/22:0-IPC (m/z 824, Figura 7E). Esta última espécie também já havia sido detectada em análises de ESI-MS de IPCs isolados de formas promastigotas de *Leishmania major*, mas em quantidades mínimas (HSU et al., 2007).

Figura 7. Íons preponderantes de extrato lipídico total de *Leishmania* eluído da banda A. Lipídios totais eluídos da banda A proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons referentes a m/z de 598, 778, 796, 806 e 824 foram identificados como *lyso*-PI-(18:1), IPC-(d16:1/18:0), IPC-(t16:0/18:0), IPC-(d18:1/18:0) e IPC-(t16:0/20:0), respectivamente. IPC: inositol fosforilceramida, m/z : massa/carga.

A partir destes resultados confirmamos que tamoxifeno é capaz de reduzir a biossíntese de IPC em promastigotas de *L. amazonensis*. O IPC é o SL mais abundante em *Leishmania*, correspondendo a cerca de 5 a 10% dos lipídios totais da célula (KANESHIRO; JAYASIMHULU; LESTER, 1986; MCCONVILLE; BACIC, 1989) e está abundantemente presente nas frações de membranas conhecidas como *lipid rafts* (YONEYAMA et al.,

2006). O IPC também é o SL predominante em fungos (BAGNAT et al., 2000), tendo sido demonstrada a essencialidade da enzima IPC sintase para a síntese de IPC e sobrevivência em fungos (NAGIEC et al., 1997). Por isso, a IPC sintase de fungos tem sido muito estudada como alvo para quimioterapia antifúngica (DICKSON et al., 1997; GEORGOPAPADAKOU, 2000). Em *Trypanosoma bucei*, também se demonstrou que a IPC sintase é essencial para a forma hematogênica do parasita (MINA et al., 2009; SUTTERWALA et al., 2008). Em 2006, o gene que codifica a IPC sintase de *L. major* foi identificado e caracterizado por Denny e colaboradores. Foi demonstrado que a atividade de IPC sintase de *L. major* é inibida pela aureobasidina A, inibidor específico de IPC sintase bem estabelecido em fungos (DENNY et al., 2006). No entanto, essa inibição foi observada em leveduras complementadas funcionalmente com o gene de IPC sintase de *L. major*, sendo observada atividade inibitória com CE_{50} na ordem de 100 μ M (valor quatro vezes superior do observado para IPC sintase de leveduras) (DENNY et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que embora leveduras complementadas com o gene de IPC sintase de *T. brucei* demonstrem sensibilidade à aureobasidina A (MINA et al., 2009), essa enzima não é inibida por esse composto em ensaios enzimáticos livres de células ou realizadas com membranas semi-intactas do parasita (SEVOVA et al., 2010). Acredita-se que esta diferença ocorra pela existência da Kei1p, uma subunidade da IPC sintase de leveduras, essencial para sua atividade enzimática e sensibilidade à aureobasidina A (SATO et al., 2009). Sendo assim, pode ser que esta proteína possa interagir e alterar a atividade de IPC sintase de *T. brucei* quando expressa em leveduras (SEVOVA et al., 2010). Desta forma, embora a toxicidade de aureobasidina A tem sido retratada contra diferentes espécies e formas de *Leishmania* (TANAKA et al., 2007; ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2009), provavelmente esta toxicidade também ocorra de forma independente de sua ação na IPC sintase do parasita (ZHANG; BEVERLEY, 2010). Isto porque foi demonstrado que este composto é capaz de inibir o crescimento de promastigotas de *L. major* com CE_{50} igual a 0,6 μ M, no entanto, a síntese de IPC só é alterada em doses superiores à 5 μ M (ZHANG et al., 2005; ZHANG; BEVERLEY, 2010). Sendo assim, mais estudos são necessários para determinar a essencialidade da IPC sintase em *Leishmania*.

Durante a reação de síntese de IPC pela IPC sintase há a liberação de diacilglicerol (DAG), um importante sinalizador mitogênico (DING et al., 2008). Uma vez que a ceramida

é pró-apoptótica e o DAG mitogênico, a modulação da atividade desta enzima é extremamente importante na manutenção da homeostase celular (MINA et al., 2011).

A banda C apresentou perfil de migração semelhante ao padrão de PI 18:1 no sistema 1 (Figura 4). Uma das estratégias utilizadas para identificar a molécula que estava migrando com *Rf* compatível com o padrão de PI 18:1 nesse sistema de corrida foi avaliar se esse perfil de migração se mantinha em outros dois diferentes sistemas de corrida (Figura 8). Para isto, o extrato lipídico de parasitas marcados com [³H]-esfingosina, foi submetido a dois sistemas de corrida previamente utilizados para a caracterização de PI (Figura 8B e C). Além disto, as amostras também foram re-analisadas no sistema de corrida utilizado previamente (Figura 8A). Nos três sistemas de HPTLC analisados, observamos uma banda com perfil de migração coincidente com o padrão PI 18:1.

Figura 8. Separação de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes sistemas de corrida. Marcação metabólica de 7×10^8 promastigotas de *L. amazonensis* com $2 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]$ -esfingosina durante 2h30min. Extrato lipídico total referente a 1×10^8 células foi aplicado em cada canaleta e separado por HPTLC utilizando 3 sistemas de corrida diferentes: sistema de corrida 2 (A), 3 (B) e 4 (C). Sph*: padrão $[^3\text{H}]$ -esfingosina, PI 18:1: padrão de fosfatidilinositol 18:1, C: banda C, O: origem, F: frente.

Para confirmar a natureza molecular dos componentes da banda C, o produto lipídico eluído da banda C foi analisado por espectrometria de massas, em colaboração com o Dr. Norton Heise (UFRJ), sendo o ESI-MS dos íons $[\text{M}-\text{H}]^-$ totais mostrados na Figura 3 do APÊNDICE E. Os íons preponderantes foram os correspondentes ao m/z de 849 e 863 (APÊNDICE E, Figura 3) que estão de acordo com íons de PI descritos previamente para *L. major* (Figura 9) (HSU et al., 2007; ZHANG et al., 2005). Os espectros de fragmentação MS^2 obtidos dos íons a m/z 849 e 963 sugerem se tratar de PIs compostos por *sn*-1-*O*-

(C_{18:0})alquil-2-O-(C_{18:1})acilglycerol-3-HPO₄-inositol (Figura 9A) e *sn*-1-O-(C_{18:0})acil-2-O-(C_{18:1})acilglycerol-3-HPO₄-inositol (Figura 9B), respectivamente.

Figura 9. Íons preponderantes de extrato lipídico total de *Leishmania* eluído da banda C. Lipídios totais eluídos da banda C proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 µM de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons referentes a *m/z* de 849 e 963 foram identificados como PI-(O-18:0/18:1) e PI-(18:0/18:1), respectivamente. IPC: inositol fosforilceramida, *m/z*: massa/carga.

Desta forma, é possível admitir que tamoxifeno reduz a síntese de PI em promastigotas de *L. amazonensis*. O PI é sintetizado pela ação da PI sintase utilizando *myo*-inositol e CDP-DAG (diacilglicerol CDP), liberando citidina monofosfato (CMP) (MARTIN; SMITH, 2006). A formação de [³H]-PI a partir de [³H]-esfingosina provavelmente ocorreu pela fosforilação da esfingosina pela esfingosina quinase (SK) e sua degradação pela esfingosina-1-fosfato liase (SPL), formando assim etanolamina fosfato e [³H]-hexadecanal. O produto marcado formado, [³H]-hexadecanal, é um álcool graxo que é utilizado como substrato junto com a acil-dihidroxiacetona-fosfato (acil-DHAP) para a síntese de [³H]-alquil-glicerol pela dihidroxiacetona-fosfato alquil sintase (ADS1). Posteriormente, o [³H]-alquil-glicerol é acilado e recebe o inositol-fosfato formando PI (revisado em ZHANG; BEVERLEY, 2010).

O PI é um fosfolipídio essencial em eucariotos que consiste entre 3 a 10 % dos PL de membranas celulares, sendo também precursor fosfolipídico para a síntese de inúmeras moléculas sinalizadoras (revisado em MARTIN; SMITH, 2006; SASAKI et al., 2009). Além disso, é precursor básico para a biosíntese da âncora de GPI, fosfoinositídeos (PIPs), inositol polifosfatos (IPs), glicerofosfoinositol (GroPI) e SLs complexos, como o IPC. O PI e seus metabólitos regulam uma ampla gama de processos celulares como

transdução de sinal (DIVECHA; IRVINE, 1995; OHANIAN; OHANIAN, 2001), saída do RNAm do núcleo (ODOM et al., 2000; SAIARDI et al., 2000), tráfego de vesículas (CZECH, 2000; MARTIN, 2001) e também serve como reservatório de segundos mensageiros (CARMAN; HENRY, 1999; GREENBERG; LOPES, 1996; HENRY; PATTON-VOGT, 1998;).

PI também é substrato das PI quinases (PIKs), enzimas chaves de uma das principais vias de sinalização intracelular das células eucariotas. As PIKs estão envolvidas em diversos processos celulares, como sinalização intracelular, remodelamento de citoesqueleto, “*protein sorting system*” e eventos de tráfego de membrana, como endocitose, maturação do fagossomo e autofagia (LINDMO; STENMARK, 2006; SASAKI et al., 2007; SCHU et al., 1993). Esta via consiste em um dos principais alvos para a quimioterapia de câncer e pode representar um alvo muito interessante para o tratamento de doenças parasitárias (BAHIA et al., 2009; MARONE et al., 2008). Em *T. cruzi*, o tratamento com inibidor de PI3K (wortmannina) resultou em inibição do crescimento e alterações ultraestruturais de formas epimastigotas do parasita em concentrações na faixa de nanomolar (BRAGA; SOUZA, 2006). Por outro lado, o tratamento de células HeLA com este inibidor reduziu a capacidade infectiva de formas amastigotas de *T. cruzi*, sugerindo que a ativação da PI3K seja necessária para a invasão do parasita (FERNANDES et al., 2006). Em *Leishmania*, foi demonstrado que PI3K medeia a entrada de *L. mexicana* em macrófagos e neutrófilos *in vitro* e o recrutamento de fagócitos e células T reguladoras no sítio de infecção em estudos *in vivo* (CUMMINGS et al., 2012; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Desta forma, a redução da síntese de PI em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno pode representar uma importante repercussão na via de PI e PIK tão importante para o estabelecimento da infecção em *Leishmania*.

Promastigotas tratados com tamoxifeno apresentaram banda D com intensidade 204% maior daquela observada no grupo controle (Figura 4). A banda D possui alto valor de R_f ($R_f = 0,97$) condizente com uma molécula de característica apolar. Uma banda com características e valor de R_f semelhantes foi previamente caracterizada por espectrometria de massas como ceramida acilada (MIGUEL, 2011).

Os componentes presentes na banda D foram reextraídos da sílica, submetidos à reação de hidrólise alcalina (FIGUEIREDO et al., 2005) e analisados por HPTLC (Figura 10B). A molécula de acil ceramida possui uma ligação éster que mantém o grupamento

acil ligado à ceramida (Figura 10A). Desta forma, após hidrólise alcalina, a ceramida acilada perde o grupamento acil gerando ceramida, modificando assim o seu padrão de migração (RABIONET et al., 2013). Este fato pode ser claramente observado na figura 10B, onde os extratos de parasitas tratados com tamoxifeno apresentam maior intensidade da banda D quando submetidos à reação controle com NaCl (canaleta 2), enquanto que as amostras submetidas à hidrólise alcalina apresentam maior intensidade de banda de migração semelhante ao padrão de C16-ceramida (Figura 10B, canaleta 4). Como contraprova, o produto lipídico da banda D reextraído da sílica foi enviado para análise por espectrometria de massas em colaboração com Dr. Norton Heise da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Infelizmente, até o momento não foi possível obter material em quantidade e qualidade adequadas para identificação das moléculas, de forma a confirmar inequivocamente a presença de acilceramida nas amostras tratados com tamoxifeno.

Figura 10. Caracterização da banda D por hidrólise alcalina. (A) Esquema da molécula padrão de acil-ceramida. (B) Extratos lipídicos da fração D proveniente de promastigotas de *L. amazonensis* marcados com 2 μ Ci de [3 H]-esfingosina e tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram incubados com 100 mM NaOH (canaleta 3 e 4) ou NaCl (canaleta 1 e 2) em solução aquosa de metanol a 95 % por 1 hora. Os produtos da hidrólise equivalente a 3×10^8 promastigotas de *L. amazonensis* foram aplicados em cada canaleta e separado por HPTLC utilizando sistema de corrida 2. D: banda D, Acil-cer: padrão de Acil-ceramida, C16-cer: padrão de C16-ceramida, Ct: parasitas não tratados, Tam: parasitas tratados com tamoxifeno, NaCl: tratamento com 100 mM NaCl, NaOH: tratamento com 100 mM NaOH, O: origem, F: frente.

Estes resultados sugerem que tamoxifeno induz o aumento da síntese de ceramida acilada em promastigotas de *L. amazonensis*. A ceramida acilada é uma forma incomum de ceramida ainda não descrita em *Leishmania*. Em humanos, a 1-O-acilceramida foi identificada como um componente natural da epiderme humana e murina, a qual contribui para a homeostase da barreira de hidratação da pele (RABIONET

et al., 2013). Foi demonstrado que a epiderme de camundongos deficientes na síntese de glicosilceramida (sintetizada a partir de ceramida) apresenta síntese sete vezes maior de acilceramidas, alcançando a composição de 31 % de todas as ceramidas esterificadas ou 16% dos SLs totais (RABIONET et al., 2013). Ao contrário, epiderme de camundongos deficientes para glicosilceramidases, enzimas responsáveis pela degradação de glicosilceramidas, apresenta redução dos níveis de ceramida e, consequentemente, de acilceramida (RABIONET et al., 2013). O equilíbrio entre acilceramida/acilglicosilceramida e ceramida/glicosilceramida também foi observada em epiderme de camundongos BALB/c por outros autores (TAKAGI et al., 2004).

Desta forma, é aceitável supor que o acúmulo de ceramida acilada em promastigotas tratados com tamoxifeno seja decorrente do aumento da concentração intracelular de ceramida ocorrida em consequência da redução de sua degradação ou utilização para síntese de SL complexos, como o IPC.

Saccharomyces cerevisiae deletados para IPC sintase apresentam acúmulo de ceramida intracelular acompanhado por morte celular (NAGIEC et al., 1997). O efeito anti-proliferativo e indutor de morte celular por autofagia ou apoptose decorrentes do acúmulo de ceramida já está bem caracterizado em células eucariotas (CHAPMAN et al., 2010; JAYADEV et al., 1995; TIRODKAR; VOELKEL-JOHNSON, 2012; WANG et al., 2003). Inversamente, o aumento da esfingosina e esfingosina-1-fosfato está relacionado com sobrevivência e proliferação celular (RODRIGUEZ et al., 2015; SMITH et al., 2000). O equilíbrio entre estes e outros SL ativos e enzimas do metabolismo de SL desempenham papel muito importante na patogênese e progressão do câncer em humanos (OGRETMEN; HANNUN, 2004). Sendo assim, a acilação das ceramidas pode ter ocorrido como mecanismo de defesa do parasita frente a ação pró apoptótica desta molécula.

Somado a isso, diversos trabalhos têm mostrado a ação de tamoxifeno em células tumorais relacionada com o acúmulo de ceramida (MORAD et al., 2013; MORAD; CABOT, 2015). O fato das amostras de parasitas marcados com [³H]-esfingosina apresentarem marcação de um produto com R_f semelhante ao do padrão de C16-ceramida, sem alteração de intensidade de banda entre parasitas tratados ou não com tamoxifeno (Figura 4), leva a acreditar que as ceramidas geradas pelo efeito de tamoxifeno foram aciladas pelo parasita a fim de manter os níveis fisiológicos de ceramida intracelular.

4.4 Investigação do mecanismo de ação de tamoxifeno

Os resultados descritos até o momento indicam que parasitas tratados com tamoxifeno aumentam a síntese de ceramida acilada e reduzem a síntese de IPC e PI. Sendo assim, baseados na via de biossíntese de esfingolipídios de *Leishmania* foram delineadas diferentes hipóteses que podem explicar o mecanismo pelo qual tamoxifeno interfere na biossíntese de SLs em *Leishmania* (Figura 11).

Como descrito anteriormente, o acúmulo de ceramida acilada pode estar relacionado com aumento dos níveis intracelulares de ceramida, o qual está diretamente ligado ao (1) aumento da síntese, (2) redução da degradação ou (3) do consumo desta molécula para a síntese de SL complexos. O efeito de tamoxifeno sobre a síntese de ceramida de *Leishmania* foi avaliada previamente em nosso laboratório em ensaio enzimático de ceramida sintase com extrato microsomal de *L. amazonensis* (TRINCONI, 2011). Neste ensaio, a presença de tamoxifeno não aumentou nem diminuiu a síntese de ceramida, indicando que este fármaco não altera a atividade de ceramida sintase de *L. amazonensis*. Alguns estudos têm demonstrado a ação inibitória de tamoxifeno sobre ceramidases ácidas de células tumorais humanas (MORAD et al., 2013; MORAD; CABOT, 2015). Neste caso, tamoxifeno induziu o aumento de ceramida intracelular por redução da degradação desta molécula. Estas evidências indicam que é possível que o acúmulo de ceramida acilada proveniente do aumento de ceramida intracelular possa ser dependente da ação de tamoxifeno em ceramidases de *Leishmania*. Desta forma, não podemos excluir esta possibilidade. No entanto, observamos que o tratamento com tamoxifeno levou a redução de 64,6% na abundância da banda A e de 71,1% da banda B, ambas identificadas como IPCs. Além disso, sabe-se que IPCs são os PSL de membrana mais abundantes em *Leishmania*. Dessa forma, é razoável supor que o acúmulo de ceramida seja decorrente da redução de seu consumo para a síntese de IPC.

Outras evidentes alterações observadas na biossíntese de esfingolipídios em parasitas tratados com tamoxifeno são a redução da síntese de IPC e PI. Frente às descritas alterações, foram delineadas três hipóteses: (1) tamoxifeno interfere na disponibilidade de inositol para as células tratadas, impedindo a formação de PI, fonte de fosforilinositol para a síntese de IPC; (2) tamoxifeno inibe a enzima IPC sintase; ou (3) tamoxifeno inibe a enzima PI sintase (Figura 11).

Figura 11. Esquema de possíveis alvos de tamoxifeno na biossíntese de esfingolipídios em *Leishmania*. A redução dos níveis de PI e IPC podem ser decorrentes da interferência de tamoxifeno na incorporação de inositol na célula ou por inibição direta ou indireta de PI e/ou IPC sintase de *L. amazonensis*. O aumento de ceramida acilada pode ser resultante do acúmulo de ceramida intracelular devido redução de sua utilização como fonte para a síntese de IPC. DAG: diacilglicerol; CDP-DAG: citidina difosfato diacilglicerol; PIS: fosfatidilinositol sintase; IPC: inositolfosforilceramida; IPCS: inositolfosforilceramida sintase; PI: fosfatidilinositol; ISCL: inositol esfingolipidefosfolipase C-like; CDase: ceramidase; CerS: ceramida sintase; TAM: tamoxifeno.

Com base nessas informações, decidimos investigar se tamoxifeno podia interferir na disponibilidade de inositol em parasitas tratados. O inositol é o precursor para a síntese de PI e outras inúmeras moléculas envolvidas em diversos processos celulares (MARTIN; SMITH, 2006; SASAKI et al., 2009). Diferentemente das células de mamíferos, a grande maioria das moléculas de superfície de *Leishmania* são PLs e glicoproteínas ancoradas na membrana plasmática por âncoras de GPI [McConville, 1993]. Muitas destas moléculas têm sido implicadas na virulência da *Leishmania* em hospedeiros mamíferos e vetor flebotomíneo, como a proteína leishmanolisina (gp63), gp46/PSA2 ou proteofosfoglicanos ligados à membrana (mPPG), assim como lipofosfoglicanos (LPG) e o grupo de GIPLs (BORDIER et al., 1986; CHANG et al., 1986; DESCOTEAUX; TURCO, 1999; ILG, 2000; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). O inositol também pode ser fosforilado ou receber uma molécula de CDP-DAG e/ou fosfato gerando PIs ou IPs, respectivamente. Fica clara, portanto, a relevância desta molécula para os

protozoários do gênero *Leishmania* e, conseqüentemente, a importância do bom funcionamento do sistema de transporte e síntese *de novo* de inositol nestas células.

Existem diversos isômeros de inositol biologicamente ativos, sendo o *myo*-inositol o mais comum (MAJUMDER et al., 1997; MICHELL, 2008). Em *Leishmania* spp., *myo*-inositol pode ser sintetizado *de novo* ou adquirido através de transporte de membrana específico (DREW et al., 1995; ILG, 2002; MAJUMDER; JOHNSON; HENRY, 1997; MICHELL, 2008; REYNOLDS, 2009).

Duas enzimas são requeridas para a síntese *de novo* do inositol, a inositol-1-fosfato sintase e a inositol monofosfatase. A inositol-1-fosfato sintase, codificada pelo gene INO1, converte a glicose-6-fosfato em *myo*-inositol 1-fosfato e constitui um passo limitante na via de síntese *de novo* (DONAHUE; HENRY, 1981). A IMPase desfosforila o *myo*-inositol 1-fosfato para gerar o *myo*-inositol (MICHELL, 2008). Pelo fato de ambas enzimas serem citosólicas e, conseqüentemente, a síntese de inositol ocorrer no citoplasma celular, é pouco provável que tamoxifeno seja um inibidor direto destas enzimas, uma vez que se trata de uma molécula altamente lipofílica (Log P = 5,93). Além disso, sabe-se que tamoxifeno interage e se incorpora facilmente em biomembranas (CUSTODIO et al., 1998). Por essa mesma razão e, considerando-se que o potencial de membrana (citoplasmática e mitocondrial) de promastigotas de *L. amazonensis* é drasticamente alterado quando tratados com raloxifeno, um SERM análogo ao tamoxifeno (REIMAO et al., 2014), consideramos que seria plausível que houvesse interferência no transporte transmembrana de inositol em parasitas tratados com tamoxifeno.

4.4.1 Caracterização do transportador de inositol em promastigotas de *L. amazonensis*

Um transportador de *myo*-inositol foi descrito em promastigotas de *L. donovani* por Drew e colaboradores (1995). Trata-se de uma proteína de membrana *simporter* dependente de hidrogênio (H^+) que transporta ativamente *myo*-inositol para o interior da célula - local de maior concentração do substrato - graças ao gradiente eletroquímico gerado (DREW et al., 1995; KLAMO et al., 1996). Ensaios de cinética enzimática demonstraram a existência de um único transportador específico para *myo*-inositol em promastigotas de *L. donovani* com cinética do tipo Michaelis-Menten (DREW et al., 1995).

Este tipo de cinética representa as reações químicas catalisadas por enzimas que são saturáveis. Neste caso, a velocidade de catálise de uma enzima é diretamente proporcional à disponibilidade do substrato até chegar à sua saturação, onde a velocidade de catálise será constante. A atividade de uma enzima é geralmente descrita através de velocidade máxima (V_{max}) da reação e da constante de Michaelis-Menten (K_m). Na condição de V_{max} todos os transportadores estão saturados com substrato, ou seja, não existe transportador livre para ligar mais substrato. Neste momento, a velocidade de formação do produto é máxima e constante. O K_m representa a concentração de substrato na qual se detecta uma velocidade de reação igual à metade de V_{max} . Cada enzima possui um K_m característico para um dado substrato; este parâmetro é muitas vezes usado para demonstrar a força de ligação de um substrato à enzima (NELSON; COX, 2008).

Ensaio de cinética enzimática de transporte de inositol realizados em promastigotas de *L. amazonensis* exibiram cinética do tipo Michaelis-Menten, com valores respectivos de K_m e V_{max} igual a 163,5 (131,8 – 195,1) μM e 62,5 (58,9 – 66,0) $\text{pmol min}^{-1} 3 \times 10^7 \text{ células}^{-1}$ (média $\pm$ desvio padrão das médias) (Figura 12). Estas características do transportador de inositol de *L. amazonensis* são semelhantes às previamente descritas em *L. donovani* (K_m : $250 \pm 0.05 \mu\text{M}$ e V_{max} : $55,5 \pm 8.8 \text{ pmol min}^{-1} 5 \times 10^7 \text{ células}^{-1}$) (DREW et al., 1995).

Figura 12. Cinética enzimática do transporte de [³H]myo-inositol em promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitas (3×10^7) foram incubados por 2 minutos em soluções de transporte nas concentrações indicadas a 25°C. O resultado provém de um experimento representativo de dois experimentos realizados independentemente. As barras representam o desvio padrão das duplicatas realizadas no experimento. A incorporação de myo-inositol está identificada como picomoles por minuto por 3×10^7 promastigotas.

4.4.2 Interferência de tamoxifeno na atividade do transportador de inositol em *L. amazonensis*

Para verificarmos se tamoxifeno interfere na atividade do transportador de inositol de *L. amazonensis*, promastigotas foram pré-incubados com 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno por 10 minutos e o transporte de inositol foi testado nas concentrações de substrato aproximadamente correspondentes ao K_m (200 μM de [³H]myo-inositol) e na concentração necessária para se atingir a V_{max} (2.000 μM de [³H]myo-inositol) (Figura 13) previamente determinadas durante 2 minutos.

Figura 13. Inibição do transporte de $[^3\text{H}]$ myo-inositol por tamoxifeno nas condições de K_m e V_{max} em promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitas (3×10^7) foram pré-incubados com 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno por 10 minutos e o ensaio de transporte de inositol foi realizado nas condições de K_m e V_{max} com 200 e 2.000 μM de $[^3\text{H}]$ myo-inositol, respectivamente, por 2 minutos a 25°C. Como controle de inibição foram adicionados às células 2.000 μM de *myo*- ou *scyllo*-inositol frio no transporte realizado nas condições normais de K_m . Os resultados representam média e desvio padrão de experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. A incorporação de *myo*-inositol está identificada por porcentagem de transporte de inositol em relação ao controle.

Nas condições de K_m , tamoxifeno em concentrações de 10, 30 e 50 μM inibiu a incorporação de $[^3\text{H}]$ myo-inositol em promastigotas de *L. amazonensis* em 11,4%, 20,9% e 40,9%, respectivamente (Figura 13). Nas condições de V_{max} observou-se inibição de 10,9%, 11,8% e 33,1%, respectivamente (Figura 13). Nota-se que esta inibição é do tipo dose dependente.

Ao final de cada ensaio, o número e viabilidade celular dos parasitas em cada amostra foi determinado, demonstrando-se que as amostras de parasitas tratados com 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno apresentavam condições semelhantes às amostras controle de parasitas não tratados (Tabela 1). Estes dados permitem afirmar que a redução no transporte de inositol, observado em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno não está relacionada com perda ou morte dos parasitas.

Tabela 1. Concentração e viabilidade celular de promastigotas tratados com diferentes concentrações de tamoxifeno por 10 minutos.

Tamoxifeno (μ M)	Promastigotas (células/mL)	Viabilidade celular (%) ^a
0	$2,0 \times 10^7$	91
10	$2,0 \times 10^7$	91
30	$2,2 \times 10^7$	95
50	$2,1 \times 10^7$	92,8

^a Porcentagem de células não marcadas para iodeto de propídio

Como controle dos ensaios de inibição de tamoxifeno, foram utilizando inibidores competitivos *myo*- e *scyllo*-inositol na concentração de 2.000 μ M nos ensaios de transporte nas condições de Km. Nestas condições, *myo*- e *scyllo*-inositol inibiram a atividade de transporte de inositol em 81% e 84%, respectivamente (Figura 13). Tal inibição é maior do que aquela observada em promastigotas tratados com tamoxifeno.

Os resultados de inibição de transporte de inositol acima descritos diferem dos observados em promastigotas de *L. donovani* hiperexpressores do gene que codifica o transportador de inositol desta leishmânia (número de acesso M85072 – GeneBank) (DREW et al., 1995). Neste estudo, a incubação com 10 mM de *myo*-inositol inibiu em 99,5% o transporte de *myo*-inositol, enquanto que a incubação com *scyllo*-inositol inibiu somente 25%. Aparentemente, em *L. donovani*, o transportador identificado parece ser específico para *myo*-inositol. Como nossos resultados foram obtidos com promastigotas de *L. amazonensis* selvagem, há duas possibilidades: (1) parasitos do gênero *Leishmania* possuem mais de um tipo de transportador de inositol, os quais são inibidos de forma específica por diferentes tipos de esteroisômeros de inositol, sendo o transportador caracterizado por Drew e colaboradores específico de *myo*-inositol; ou (2) diferentemente de *L. donovani*, promastigotas de *L. amazonensis* possuem um transportador de inositol não específico, o qual é capaz de transportar todos os esteroisômeros de inositol.

Utilizamos a sequência peptídica do transportador de inositol (MILT) de *L. infantum* (LinJ.24.0690) para uma busca de sequências similares no genoma de *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. donovani* (Gene DB -

<http://www.genedb.org/Homepage>). Em todos os casos encontra-se apenas uma sequência com alta identidade (70 a 80%) com MILT, o que indica a existência de apenas um transportador de inositol nestes organismos. Isto pode sugerir que há diferenças na especificidade do transportador de inositol entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Isto porque observamos que no genoma destas espécies existe apenas uma sequência com alta identidade com a proteína MILT de *L. infantum* e que tal transportador é específico para *myo*-inositol em *L. donovani*, mas não para *L. amazonensis*. Para obter conclusões mais concretas é preciso complementar o estudo de caracterização do transportador de inositol de *L. amazonensis*, incluindo ensaios de inibição com os demais esteroisômeros de inositol existentes na natureza.

4.4.3 Caracterização do tipo de inibição de tamoxifeno sobre a atividade do transportador de inositol de *L. amazonensis*

Nosso próximo passo foi investigar o tipo de inibição que tamoxifeno exerce sobre o transportador de inositol de *L. amazonensis*. Para isto, realizamos uma curva de saturação de substrato *myo*-inositol com 0, 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno. As curvas de saturação de substrato geradas foram plotadas em um único gráfico e os valores de K_m e V_{max} de cada curva foram determinados (Figura 14A, Tabela 2).

Figura 14. Inibição do transporte de $[^3\text{H}]\text{myo-inositol}$ em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno. Parasitas (3×10^7) foram pré-incubados com 0, 10 ou 50 μM de tamoxifeno e, em cada caso, o ensaio de transporte foi realizado com 0, 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 μM de $[^3\text{H}]\text{myo-inositol}$ por 2 minutos a 25°C . Os resultados representam média e desvio padrão de duplicata de experimento representativo de três experimentos independentes. A incorporação de *myo-inositol* está identificada como picomoles por minuto por 3×10^7 promastigotas.

A alteração tanto dos valores de K_m quanto de V_{max} nas condições de 0, 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno, sugere que este fármaco exerce uma inibição do tipo mista no transportador de inositol em promastigotas de *L. amazonensis*. O tipo de gráfico duplo recíproco (Figura 14B) construído a partir da curva de saturação obtida confirma tais afirmações.

Tabela 2. Valores de K_m e V_{max} do transportador de inositol de *L. amazonensis* de parasitas pré-incubados com 0, 10, 30 e 50 μM de tamoxifeno.

Tamoxifeno (μM)	K_m^a [μM (IC95%)]	V_{max}^b [$\text{pmol min}^{-1} 3 \times 10^7 \text{ céls}^{-1}$ (IC95%)]
0	182,9 (155 – 210,9)	76,54 (72,9 – 80,2)
10	193,9 (137,2 – 250,6)	66,8 (60,8 – 72,7)
30	203,2 (146,4 – 260)	63,7 (58,0 – 69,4)
50	197,7 (141,1 – 254,4)	50,9 (46,6 – 55,2)

^a constante de Michaelis-Menten expressa em micromolar com intervalo de confiança de 95%.

^b velocidade máxima do transporte de inositol expressa em picomoles por minuto por 3×10^7 células com intervalo de confiança de 95%.

As informações obtidas de inibição mista do transportador de inositol juntamente com inibição máxima de 40% do transportador utilizando 50 μM do fármaco sugerem que este não é o principal mecanismo de ação de tamoxifeno. Somado a evidências de que tamoxifeno causa distúrbio na membrana (CUSTODIO et al., 1998), hipotetizamos que tamoxifeno promova uma inibição inespecífica no transportador de inositol resultante de danos gerais à membrana.

4.4.4 Interferência de inositol na síntese de IPC e PI de parasitas tratados com tamoxifeno

Para confirmar se a redução de PI e IPC deve-se ou não à indisponibilidade de inositol na célula tratada estabelecemos ensaio de marcação metabólica para avaliar a síntese de PI e IPC na presença de concentrações crescentes de inositol. Desta forma, é possível esclarecer se a redução da síntese de PI e IPC em parasitas tratados é decorrente da falta de inositol ou deve-se à inibição das enzimas PI sintase ou IPC sintase. Para isto, foi realizada marcação metabólica de promastigotas de *L. amazonensis* com [^3H]-esfingosina ou [^3H]-inositol disponibilizando 0,2 ou 2 mM de inositol frio (não marcado) às células (Figura 15). Neste caso, há duas possibilidades: (1) recuperação da síntese de PI e IPC nas amostras tratadas e suplementadas com inositol, o que indicaria que o mecanismo de ação de tamoxifeno estaria relacionado à redução da disponibilidade de

inositol nas células tratadas; ou (2) ausência de alteração na redução de síntese de PI e IPC nas amostras tratadas e suplementadas com inositol frio, o que indicaria provável ação na atividade de PI sintase ou IPC sintase.

Na figura 15 pode-se observar a marcação metabólica com [^3H]-esfingosina ou [^3H]-inositol de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μM de tamoxifeno e suplementados com 0,2 ou 2 mM de inositol frio.

Figura 15. Efeito de inositol na síntese de esfingolípídios de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno. Marcação metabólica de 4×10^8 promastigotas de *L. amazonensis* com 6 μCi de $[^3\text{H}]$ -inositol (canaletas 1 a 6) ou 2 μCi de $[^3\text{H}]$ -esfingosina (7 a 10) tratados com 10 μM de tamoxifeno por 4 horas (4 a 6, 8 a 10) ou não tratados (1 a 3,7). Os promastigotas foram suplementados com 0,2 (2,5,9) ou 2 mM (3,6,10) de inositol frio no momento da marcação. Extrato lipídico total referente a 1×10^8 células foi aplicado em cada canaleta e separado por HPTLC utilizando sistema de corrida 1. Tempo de exposição: 32 dias. Sph*: marcação com $[^3\text{H}]$ -esfingosina, Ino*: marcação com $[^3\text{H}]$ -inositol, Tam: tratamento com tamoxifeno, Ino: inositol frio, O: origem, F: frente.

Nas amostras marcadas com [^3H]-inositol, observa-se redução gradual da síntese de IPC e PI (bandas B e C, respectivamente) conforme se aumenta a disponibilidade de inositol frio (Figura 15). Este efeito ocorre tanto nas amostras controle como nas tratadas, o que provavelmente está relacionado à diluição da marcação radioativa. No entanto, na marcação realizada com [^3H]-esfingosina é evidente a redução equivalente na intensidade das três bandas das amostras tratadas suplementadas ou não com inositol frio, ou seja, o aumento da disponibilidade de inositol não normalizou a síntese de IPC e PI. Estes dados sugerem que a redução da síntese destas moléculas não ocorre por falta de disponibilidade de inositol na célula. Restam então duas hipóteses, tamoxifeno inibe IPC e/ou PI sintase.

4.4.5 Considerações Finais

O grande interesse de utilizar a enzima IPC sintase como alvo terapêutico para novos fármacos leishmanicidas levaram Mina e colaboradores (2010) a desenvolverem um sistema para teste de atividade enzimática de IPC sintase de *Leishmania* para ensaios de *high-throughput screening* de novos candidatos a fármacos para a leishmaniose (MINA et al., 2010). Neste sistema, o composto é incubado com NBD- C_6 -ceramida (substrato receptor) e PI (substrato doador) na presença de extrato microssomal de *Saccharomyces cerevisiae* complementado para expressar a IPC sintase de *L. major*. A quantidade de produto formado, inositol fosforil-NBD- C_6 -ceramida (C_6 -NBD-IPC), é então quantificada (MINA et al., 2010). Em um estudo posterior visando investigar a interação do substrato ceramida com a IPC sintase de *L. major*, uma biblioteca de derivados de ceramida com diferenças na composição da cauda da esfingosina, unidade N-acil e grau de hidroxilação foi utilizada para se identificar possíveis inibidores da enzima IPC sintase utilizando esse sistema de microplaca. Neste caso, o inibidor mais efetivo foi de estrutura mais parecida com o substrato natural, N-octanoil 1-deoxiceramida com valor de IC_{50} de $4,79\ \mu\text{M}$ (MINA et al., 2011).

Em colaboração estabelecida com Dr. Paul Denny da Universidade de Durham, foi avaliada a ação de tamoxifeno sobre a atividade de IPC sintase de *Leishmania in vitro*, conforme Mina e colaboradores. Neste ensaio, tamoxifeno provou ser um inibidor

específico de IPC sintase de *L. major* com valores de CE_{50} de 2,95 μ M (2,08 – 4,18) (dados não publicados). Ou seja, a redução da síntese de IPC por promastigotas tratados com tamoxifeno pode ser atribuída a uma inibição específica da IPC sintase de *Leishmania*.

Como já comentado anteriormente, tamoxifeno interage e causa distúrbios de membrana. Sabe-se que PI e IPC sintase, assim como outras enzimas envolvidas na biossíntese de SLs, são enzimas com vários domínios transmembrana (MARTIN; SMITH, 2006; SUTTERWALA et al., 2008). Desta forma, uma ação indireta de tamoxifeno na membrana celular pode promover alteração na estrutura tridimensional destas proteínas e consequente comprometimento da atividade enzimática das mesmas. Além disso, em relação à redução da síntese de PI, ainda há possibilidade de tamoxifeno inibir a PI sintase diretamente, fato que seria interessante investigar através de ensaio enzimático de PI sintase *in vitro*.

Em resumo, demonstramos que tamoxifeno altera o perfil de incorporação de precursores [3 H]-esfingosina e [3 H]-inositol na via de biossíntese de esfingolipídios em promastigotas de *L. amazonensis*, levando à redução da síntese de PI e IPC, com acúmulo de ceramida acilada. A ação inibitória específica sobre a atividade enzimática de IPC sintase *in vitro*, parece representar o mecanismo chave da ação leishmanicida de tamoxifeno. Trata-se de um alvo quimioterápico muito interessante por ser uma enzima essencial para a síntese do SL mais abundante em *Leishmania* (KANESHIRO; JAYASIMHULU; LESTER, 1986; MCCONVILLE; BACIC, 1989) e estar ausente em mamíferos (DENNY et al., 2004). Além disso, a redução da síntese de IPC parece culminar no acúmulo intracelular de ceramida, uma molécula sabidamente indutora da morte celular programada (TIRODKAR; VOELKEL-JOHNSON, 2012; WANG et al., 2003). Tal fato justifica o acúmulo de sua forma acilada, até então desconhecida em *Leishmania*. Por outro lado, ainda que por mecanismos desconhecidos, foi comprovada a redução da síntese de PI em parasitas tratados com tamoxifeno. Esta ação, certamente resulta em uma ampla gama de efeitos nas funções celulares do parasita, uma vez que inúmeras funções biológicas de PI são conhecidas em células eucariotas (DIVECHA; IRVINE, 1995; HENRY; PATTON-VOGT, 1998; MARTIN, 2001; ODOM et al., 2000; SASAKI et al., 2009). Considerando-se ainda a impossibilidade de se obter parasitas resistentes a tamoxifeno em laboratório (COELHO et al., 2015), consideramos provável que este fármaco apresente diversos mecanismos de

ação capazes de justificar seu efeito leishmanicida, assim como ocorre em células tumorais humanas.

4.5 Participação da aluna em projetos paralelos

Ao longo do período em que esta tese foi desenvolvida nosso grupo participou de diversas colaborações científicas, que resultaram na produção de artigos científicos com a participação direta da aluna:

1. Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene.
Reimão JQ, Miguel DC, Taniwaki NN, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. .PLoS Negl Trop Dis. 2014 May 8;8(5):e2842.
2. *In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis.
Coelho AC, Trinconi CT, Costa CH, Uliana SR. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul 17;8(7):e2999.
3. Generation of luciferase-expressing *Leishmania infantum chagasi* and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging.
Reimão JQ, Oliveira JC, Trinconi CT, Cotrim PC, Coelho AC, Uliana SR. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb 13;9(2):e0003556.
4. *Leishmania* is not prone to develop resistance to tamoxifen.
Coelho AC, Trinconi CT, Senra L, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2015 Jun 17;5(3):77-83
5. Miltefosine efficacy in a mouse model of infection with luciferase-expressing *Leishmania braziliensis*
Coelho AC, Oliveira JC, Espada, CR, Trinconi CT, Reimão JQ, Uliana SR. Em preparação.

5 CONCLUSÕES

Os resultados descritos neste trabalho sugerem tamoxifeno como um candidato interessante para uso clínico na terapêutica da leishmaniose. Ensaios de combinação de fármacos *in vitro* e *in vivo* revelaram uma interação aditiva entre tamoxifeno e os fármacos atualmente utilizados na terapêutica da leishmaniose, como anfotericina B, miltefosina e Sb^V.

Particularmente, tamoxifeno se mostrou muito eficaz por via tópica em associação ou não com Sb^V. Por se tratar de um fármaco de perfil clínico de segurança bem estabelecido, barato, de fácil acesso, efetivo contra diversas espécies de *Leishmania* e em diferentes modelos de leishmaniose experimental, este fármaco se torna muito atrativo para futuros estudos clínicos em humanos.

Promastigotas de *L. amazonensis* tratados com tamoxifeno apresentam redução da biossíntese de IPC e PI e acúmulo de ceramida acilada. A redução na biossíntese de IPC não pode ser atribuída a redução no transporte de inositol mas provavelmente está relacionada à inibição da enzima IPC sintase.

REFERÊNCIAS*

- ALTAN, N.; CHEN, Y.; SCHINDLER, M.; SIMON, S. M. Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 8, p. 4432-4437, 1999.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 2, p. 298-319, 1997.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 61, p. 223-274, 2006.
- ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CANAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; MORENO, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMATO, V. S.; RABELLO, A.; ROTONDO-SILVA, A.; KONO, A.; MALDONADO, T. P.; ALVES, I. C.; FLOETER-WINTER, L. M.; NETO, V. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with lipid formulations of amphotericin B in two immunocompromised patients. **Acta Trop.**, v. 92, n. 2, p. 127-132, 2004.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta Trop.**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ARMIJOS, R. X.; WEIGEL, M. M.; CALVOPINA, M.; MANCHENO, M.; RODRIGUEZ, R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 91, n. 2, p. 153-160, 2004.
- BAGNAT, M.; KERANEN, S.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 7, p. 3254-3259, 2000.
- BAHIA, D.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; SILVEIRA, J. F.; MORTARA, R. A.; RUIZ, J. C. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

new tools for designing specific inhibitors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 390, n. 3, p. 963-970, 2009.

BAIRD, B.; SHEETS, E. D.; HOLOWKA, D. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? **Biophys. Chem.**, v. 82, n. 2-3, p. 109-119, 1999.

BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BEN SALAH, A.; BUFFET, P. A.; MORIZOT, G.; BEN MASSOUD, N.; ZAATOUR, A.; BEN ALAYA, N.; HAJ HAMIDA, N. B.; EL AHMADI, Z.; DOWNS, M. T.; SMITH, P. L.; DELLAGI, K.; GROGL, M. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 5, p. e432, 2009.

BEN SALAH, A.; BEN MESSAOUD, N.; GUEDRI, E.; ZAATOUR, A.; BEN ALAYA, N.; BETTAIEB, J.; GHARBI, A.; BELHADJ HAMIDA, N.; BOUKTHIR, A.; CHLIF, S.; ABDELHAMID, K.; EL AHMADI, Z.; LOUZIR, H.; MOKNI, M.; MORIZOT, G.; BUFFET, P.; SMITH, P. L.; KOPYDLOWSKI, K. M.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; SMITH, K. S.; NIELSEN, C. J.; ULLMAN, D. R.; NORWOOD, J. A.; THORNE, G. D.; MCCARTHY, W. F.; ADAMS, R. C.; RICE, R. M.; TANG, D.; BERMAN, J.; RANSOM, J.; MAGILL, A. J.; GROGL, M. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, n. 6, p. 524-532, 2013.

BERGMAN, L.; BEELEN, M. L.; GALLEE, M. P.; HOLLEMA, H.; BENRAADT, J.; VAN LEEUWEN, F. E. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. **Lancet**, v. 356, n. 9233, p. 881-887, 2000.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 33-38, 2005.

BERN, C.; HIGHTOWER, A. W.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; AMANN, J.; WAGATSUMA, Y.; HAQUE, R.; KURKJIAN, K.; VAZ, L. E.; BEGUM, M.; AKTER, T.; CETRE-SOSSAH, C. B.; AHLUWALIA, I. B.; DOTSON, E.; SECOR, W. E.; BREIMAN, R. F.; MAGUIRE, J. H. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 655-662, 2005.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BHANDARI, V.; KULSHRESTHA, A.; DEEP, D. K.; STARK, O.; PRAJAPATI, V. K.; RAMESH, V.; SUNDAR, S.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SALOTRA, P. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 5, p. e1657, 2012.

BHATTACHARJEE, A.; MAJUMDER, S.; MAJUMDAR, S. B.; CHOUDHURI, S. K.; ROY, S.; MAJUMDAR, S. Co-administration of glycyrrhizic acid with the antileishmanial drug sodium antimony gluconate (SAG) cures SAG-resistant visceral leishmaniasis. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 45, n. 3, p. 268-277, 2015.

BIONDA, C.; PORTOUKALIAN, J.; SCHMITT, D.; RODRIGUEZ-LAFRASSE, C.; ARDAIL, D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? **Biochem. J.**, v. 382, pt. 2, p. 527-533, 2004.

BOATH, A.; GRAF, C.; LIDOME, E.; ULLRICH, T.; NUSSBAUMER, P.; BORNANCIN, F. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 13, p. 8517-8526, 2008.

BORDIER, C.; ETGES, R. J.; WARD, J.; TURNER, M. J.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L. *Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, n. 16, p. 5988-5991, 1986.

BRADY, R. O.; KOVAL, G. J. The enzymatic synthesis of sphingosine. **J. Biol. Chem.**, v. 233, n. 1, p. 26-31, 1958.

BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; J. TEIXEIRA, M.; LIMA, J. W. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRAGA, M. V.; SOUZA, W. D. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, n. 2, p. 209-216, 2006.

BROWN, D. A.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 14, p. 111-136, 1998.

BRUSTOLONI, Y. M.; CUNHA, R. V.; CONSOLO, L. Z.; OLIVEIRA, A. L.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T. Treatment of visceral leishmaniasis in children in the Central-West Region of Brazil. **Infection**, v. 38, n. 4, p. 261-267, 2010.

BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, n. 11, p. 928-934, 2001.

CABOT, M. C.; ZHANG, Z. C.; GIULIANO, A. E. Tamoxifen elicits rapid transmembrane lipid signal responses in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 1995.

CABOT, M. C.; GIULIANO, A. E.; VOLNER, A.; HAN, T. Y. Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 394, n. 2, p. 129-131, 1996.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. G.; CARMEN, M.; CRUZ, L. L.; ALMEIDA, R. G. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo 2006**. São Paulo: 2006, 1-160 p.

CAMPOS-MUNOZ, L.; QUESADA-CORTES, A.; MARTIN-DIAZ, M. A.; RUBIO-FLORES, C.; DE LUCAS-LAGUNA, R. *Leishmania braziliensis*: report of a pediatric imported case with response to liposomal amphotericin B. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 98, n. 1, p. 42-44, 2007.

CARMAN, G. M.; HENRY, S. A. Phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and interrelationship with other metabolic processes. **Prog. Lipid. Res.**, v. 38, n. 5-6, p. 361-399, 1999.

CASTRO, E. V.; YONEYAMA, K. G.; HAAPALAINEN, E. F.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, blocks cytokinesis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 60, n. 4, p. 377-387, 2013.

CHANG, C. S.; INSERRA, T. J.; KINK, J. A.; FONG, D.; CHANG, K. P. Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 18, n. 2, p. 197-210, 1986.

CHANG, J.; POWLES, T. J.; ASHLEY, S. E.; GREGORY, R. K.; TIDY, V. A.; TRELEAVEN, J. G.; SINGH, R. The effect of tamoxifen and hormone replacement therapy on serum cholesterol, bone mineral density and coagulation factors in healthy postmenopausal women participating in a randomised, controlled tamoxifen prevention study. **Ann. Oncol.**, v. 7, n. 7, p. 671-675, 1996.

CHAPMAN, J. V.; GOUAZE-ANDERSSON, V.; MESSNER, M. C.; FLOWERS, M.; KARIMI, R.; KESTER, M.; BARTH, B. M.; LIU, X.; LIU, Y. Y.; GIULIANO, A. E.; CABOT, M. C. Metabolism of short-chain ceramide by human cancer cells--implications for therapeutic approaches. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, n. 3, p. 308-315, 2010.

CHATTERJEE, S.; SMITH, E. R.; HANADA, K.; STEVENS, V. L.; MAYOR, S. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. **Embo. J.**, v. 20, n. 7, p. 1583-1592, 2001.

CHRUSCIAK-TALHARI, A.; DIETZE, R.; CHRUSCIAK TALHARI, C.; DA SILVA, R. M.; GADELHA YAMASHITA, E. P.; DE OLIVEIRA PENNA, G.; LIMA MACHADO, P. R.; TALHARI, S. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 2, p. 255-260, 2011.

COELHO, A. C.; BOISVERT, S.; MUKHERJEE, A.; LEPROHON, P.; CORBEIL, J.; OUELLETTE, M. Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 2, p. e1512, 2012.

COELHO, A. C.; TRINCONI, C. T.; SENRA, L.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ULIANA, S. R. *Leishmania* is not prone to develop resistance to tamoxifen. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.**, v. 5, n. 3, p. 77-83, 2015.

COJEAN, S.; HOUZE, S.; HAOUCHINE, D.; HUTEAU, F.; LARIVEN, S.; HUBERT, V.; MICHARD, F.; BORIES, C.; PRATLONG, F.; LE BRAS, J.; LOISEAU, P. M.; MATHERON, S. *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 4, p. 704-706, 2012.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFTS, M. A. Use of amphotericin B in mucocutaneous leishmaniasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 111-113, 1976.

CUMMINGS, H. E.; BARBI, J.; REVILLE, P.; OGHUMU, S.; ZORKO, N.; SARKAR, A.; KEISER, T. L.; LU, B.; RUCKLE, T.; VARIKUTI, S.; LEZAMA-DAVILA, C.; WEWERS, M. D.; WHITACRE, C.; RADZIOCH, D.; ROMMEL, C.; SEVEAU, S.; SATOSKAR, A. R. Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 4, p. 1251-1256, 2012.

CUSTODIO, J. B.; DINIS, T. C.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, n. 11, p. 1989-1998, 1994.

CUSTODIO, J. B.; MORENO, A. J.; WALLACE, K. B. Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca^{2+} and inorganic phosphate. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 152, n. 1, p. 10-17, 1998.

CUZICK, J.; POWLES, T.; VERONESI, U.; FORBES, J.; EDWARDS, R.; ASHLEY, S.; BOYLE, P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 296-300, 2003.

CZECH, M. P. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 603-606, 2000.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

DASTGHEIB, L.; NASERI, M.; MIRASHE, Z. Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 12, p. 1508-1511, 2012.

DE LA LOMA, A.; ALVAR, J.; MARTINEZ GALIANO, E.; BLAZQUEZ, J.; ALCALA MUNOZ, A.; NAJERA, R. Leishmaniasis or AIDS? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 421-422, 1985.

DEL ROSAL, T.; ARTIGAO, F. B.; MIGUEL, M. J.; DE LUCAS, R.; DEL CASTILLO, F. Successful treatment of childhood cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B: report of two cases. **J. Trop. Pediatr.**, v. 56, n. 2, p. 122-124, 2010.

DENNY, P. W.; GOULDING, D.; FERGUSON, M. A.; SMITH, D. F. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. **Mol. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 313-327, 2004.

DENNY, P. W.; SMITH, D. F. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. **Mol. Microbiol.**, v. 53, n. 3, p. 725-733, 2004.

DENNY, P. W.; SHAMS-ELDIN, H.; PRICE, H. P.; SMITH, D. F.; SCHWARZ, R. T. The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target that defines a new class of sphingolipid synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 38, p. 28200-28209, 2006.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 9, p. 692, 2004.

DI LELLA, F.; VINCENTI, V.; ZENNARO, D.; AFELTRA, A.; BALDI, A.; GIORDANO, D.; PASANISI, E.; BACCIU, A.; BACCIU, S.; DI LELLA, G. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, n. 9, p. 870-872, 2006.

DICKSON, R. C.; NAGIEC, E. E.; SKRZYPEK, M.; TILLMAN, P.; WELLS, G. B.; LESTER, R. L. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 48, p. 30196-30200, 1997.

DING, T.; LI, Z.; HAILEMARIAM, T.; MUKHERJEE, S.; MAXFIELD, F. R.; WU, M. P.; JIANG, X. C. SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis. **J. Lipid. Res.**, v. 49, n. 2, p. 376-385, 2008.

DIVECHA, N.; IRVINE, R. F. Phospholipid signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 269-278, 1995.

DO MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LEGARE, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 5, p. e1167, 2011.

DONAHUE, T. F.; HENRY, S. A. *myo*-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 13, p. 7077-7085, 1981.

DORLO, T. P.; RIJAL, S.; OSTYN, B.; DE VRIES, P. J.; SINGH, R.; BHATTARAI, N.; URANW, S.; DUJARDIN, J. C.; BOELAERT, M.; BEIJNEN, J. H.; HUITEMA, A. D. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 1, p. 146-153, 2014.

DREW, M. E.; LANGFORD, C. K.; KLAMO, E. M.; RUSSELL, D. G.; KAVANAUGH, M. P.; LANDFEAR, S. M. Functional expression of a *myo*-inositol/H⁺ symporter from *Leishmania donovani*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 10, p. 5508-5515, 1995.

EL-ON, J.; SULITZEANU, A.; SCHNUR, L. F. *Leishmania major*: resistance of promastigotes to paromomycin, and susceptibility of amastigotes to paromomycin-methylbenzethonium chloride ointment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 85, n. 3, p. 323-328, 1991.

FERNANDES, A. B.; NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 1, p. 59-68, 2006.

FIGUEIREDO, J. M.; DIAS, W. B.; MENDONCA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; HEISE, N. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 387, n. Pt 2, p. 519-529, 2005.

FISHER, B.; COSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; REDMOND, C. K.; KAVANAH, M.; CRONIN, W. M.; VOGEL, V.; ROBIDOUX, A.; DIMITROV, N.; ATKINS, J.; DALY, M.; WIEAND, S.; TANCHIU, E.; FORD, L.; WOLMARK, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 90, n. 18, p. 1371-1388, 1998.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4097-4102, 2004.

FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C. S.; COSTA, M. A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

GARG, M.; GOYAL, N. MAPK1 of *Leishmania donovani* Modulates Antimony Susceptibility by Downregulating P-Glycoprotein Efflux Pumps. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 7, p. 3853-3863, 2015.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals targeted to sphingolipid synthesis: focus on inositol phosphorylceramide synthase. **Expert. Opin. Investig. Drugs.**, v. 9, n. 8, p. 1787-1796, 2000.

GOSS, P. E.; INGLE, J. N.; MARTINO, S.; ROBERT, N. J.; MUSS, H. B.; PICCART, M. J.; CASTIGLIONE, M.; TU, D.; SHEPHERD, L. E.; PRITCHARD, K. I.; LIVINGSTON, R. B.; DAVIDSON, N. E.; NORTON, L.; PEREZ, E. A.; ABRAMS, J. S.; CAMERON, D. A.; PALMER, M. J.; PATER, J. L. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, n. 17, p. 1262-1271, 2005.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GRADONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M.; TROIANI, M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. **Aids**, v. 10, n. 7, p. 785-791, 1996.

GREENBERG, M. L.; LOPES, J. M. Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 1-20, 1996.

GREGORIADIS, G. Overview of liposomes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 28, p. 39-48, 1991. Suppl B.

GUNDIMEDA, U.; CHEN, Z. H.; GOPALAKRISHNA, R. Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 23, p. 13504-13514, 1996.

HADIGHI, R.; MOHEBALI, M.; BOUCHER, P.; HAJJARAN, H.; KHAMESIPOUR, A.; OUELLETTE, M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PLoS Med.**, v. 3, n. 5, p. e162, 2006.

HENRY, S. A.; PATTON-VOGT, J. L. Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. **Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**, v. 61, p. 133-179, 1998.

HOTTA, T.; TANIMURA, H.; YAMAUE, H.; IWAHASHI, M.; TANI, M.; TSUNODA, T.; TAMAI, M.; NOGUCHI, K.; MIZOBATA, S.; ARII, K.; TERASAWA, H. Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. **J. Surg. Res.**, v. 66, n. 1, p. 31-35, 1996.

HSU, F. F.; TURK, J.; ZHANG, K.; BEVERLEY, S. M. Characterization of inositol phosphorylceramides from *Leishmania major* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 9, p. 1591-1604, 2007.

ICHIKAWA, S.; NAKAJO, N.; SAKIYAMA, H.; HIRABAYASHI, Y. A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 7, p. 2703-2707, 1994.

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 11, p. 489-497, 2000.

ILG, T. Generation of *myo*-inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* mutants by targeted replacement of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 151-156, 2002.

INOCENCIO DA LUZ, R.; ROMERO, G. A.; DORVAL, M. E.; CRUZ, I.; CANAVATE, C.; DUJARDIN, J. C.; VAN ASSCHE, T.; COS, P.; MAES, L. Drug susceptibility of *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, n. 3, p. 677-679, 2011.

JAYADEV, S.; LIU, B.; BIELAWSKA, A. E.; LEE, J. Y.; NAZAIRE, F.; PUSHKAREVA, M.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Role for ceramide in cell cycle arrest. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 5, p. 2047-2052, 1995.

JHA, S. N.; SINGH, N. K.; JHA, T. K. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. **J. Assoc. Physicians. India**, v. 39, n. 4, p. 314-316, 1991.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 164, n. 2, p. 111-117, 2009.

KANESHIRO, E. S.; JAYASIMHULU, K.; LESTER, R. L. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid. **J. Lipid. Res.**, v. 27, n. 12, p. 1294-1303, 1986.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; SCHOLTE, R. G.; GUIMARAES, L. H.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 5, p. e2213, 2013.

KLAMO, E. M.; DREW, M. E.; LANDFEAR, S. M.; KAVANAUGH, M. P. Kinetics and stoichiometry of a proton/*myo*-inositol cotransporter. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 25, p. 14937-14943, 1996.

KREMSNER, P. G.; KRISHNA, S. Antimalarial combinations. **Lancet**, v. 364, n. 9430, p. 285-294, 2004.

KUMAR, N.; SINHA, P. K.; PANDEY, K.; VERMA, N.; LAL, C. S.; RANJAN, A.; VERMA, R. B.; DAS, P. A rare case of Visceral leishmaniasis with multiple relapse and multi-drug unresponsive:

successfully treated with combination therapy. **Int. J. Clin. Pharm.**, v. 33, n. 5, p. 726-729, 2011.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LINDMO, K.; STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **J. Cell Sci.**, v. 119, pt. 4, p. 605-614, 2006.

LINDOSO, J. A.; COTA, G. F.; DA CRUZ, A. M.; GOTO, H.; MAIA-ELKHOURY, A. N.; ROMERO, G. A.; DE SOUSA-GOMES, M. L.; SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; RABELLO, A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 9, p. e3136, 2014.

LIU, Z. H.; MA, Y. L.; HE, Y. P.; ZHANG, P.; ZHOU, Y. K.; QIN, H. Tamoxifen reverses the multi-drug-resistance of an established human cholangiocarcinoma cell line in combined chemotherapeutics. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, n. 3, p. 1769-1775, 2011.

LLANOS-CUENTAS, A.; ECHEVARRIA, J.; CRUZ, M.; LA ROSA, A.; CAMPOS, P.; CAMPOS, M.; FRANKE, E.; BERMAN, J.; MODABBER, F.; MARR, J. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, n. 3, p. 677-684, 1997.

LOPES, M. C.; VALE, M. G.; CARVALHO, A. P. Ca²⁺(+)-dependent binding of tamoxifen to calmodulin isolated from bovine brain. **Cancer Res.**, v. 50, n. 9, p. 2753-2758, 1990.

LOPEZ-VELEZ, R.; PEREZ-MOLINA, J. A.; GUERRERO, A.; BAQUERO, F.; VILLARRUBIA, J.; ESCRIBANO, L.; BELLAS, C.; PEREZ-CORRAL, F.; ALVAR, J. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 4, p. 436-443, 1998.

LOVE, R. R.; MAZESS, R. B.; BARDEN, H. S.; EPSTEIN, S.; NEWCOMB, P. A.; JORDAN, V. C.; CARBONE, P. P.; DEMETS, D. L. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, n. 13, p. 852-856, 1992.

MAAROUF, M.; ADELIN, M. T.; SOLIGNAC, M.; VAUTRIN, D.; ROBERT-GERO, M. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasite**, v. 5, n. 2, p. 167-173, 1998.

MACENA, C.; ÁVILA, D.; MATTAR, C.; DAGUER, E.; RUIZ, R.; FILHO, M. Uso do tamoxifeno no tratamento de quelóide. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 8, n. 4, p. 18-24, 2006.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARAES, L. H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A. T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R. S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E. M. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MAGEE, T.; PIRINEN, N.; ADLER, J.; PAGAKIS, S. N.; PARMRYD, I. Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. **Biol. Res.**, v. 35, n. 2, p. 127-131, 2002.

MAHAJAN, R.; DAS, P.; ISAAKIDIS, P.; SUNYOTO, T.; SAGILI, K. D.; LIMA, M. A.; MITRA, G.; KUMAR, D.; PANDEY, K.; VAN GEERTRUYDEN, J. P.; BOELAERT, M.; BURZA, S. Combination Treatment for Visceral Leishmaniasis Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus in India. **Clin. Infect. Dis.**, 2015.

MAJUMDER, A. L.; JOHNSON, M. D.; HENRY, S. A. 1L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1348, n. 1-2, p. 245-256, 1997.

MANDON, E. C.; EHSES, I.; ROTHER, J.; VAN ECHTEN, G.; SANDHOFF, K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 16, p. 11144-11148, 1992.

MAO, Z.; ZHOU, J.; LUAN, J.; SHENG, W.; SHEN, X.; DONG, X. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, n. 2, p. 179-183, 2014.

MARONE, R.; CMILJANOVIC, V.; GIESE, B.; WYMAN, M. P. Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1784, n. 1, p. 159-185, 2008.

MARSDEN, P. D. Cutaneous leishmaniasis. **Bmj.**, v. 300, n. 6741, p. 1716-1717, 1990.

MARTIN, K. L.; SMITH, T. K. Phosphatidylinositol synthesis is essential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Biochem. J.**, v. 396, n. 2, p. 287-295, 2006.

MARTIN, T. F. PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 13, n. 4, p. 493-499, 2001.

MCCONVILLE, M. J.; BACIC, A. A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. Isolation, characterization, and antigenicity. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 2, p. 757-766, 1989.

MCCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem. J.**, v. 294, pt. 2, p. 305-324, 1993.

MELAKU, Y.; COLLIN, S. M.; KEUS, K.; GATLUAK, F.; RITMEIJER, K.; DAVIDSON, R. N. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 1, p. 89-94, 2007.

MERRIL A. H.; SANDHOFF K. Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In: VANCE, D. E.; VANCE, J. E. (Ed.). **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 373-408.

MICHELL, R. H. Inositol derivatives: evolution and functions. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 9, n. 2, p. 151-161, 2008.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ANDREOLI, W. K.; MORTARA, R. A.; ULIANA, S. R. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, n. 3, p. 526-534, 2007.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ULIANA, S. R. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 6, p. e249, 2008.

MIGUEL, D. C.; ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L.; ULIANA, S. R. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 63, n. 2, p. 365-368, 2009.

MIGUEL, D. C. **Caracterização da atividade de tamoxifeno no tratamento da leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação.** 2011. Tese (Doutorado em parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MINA, J. G.; PAN, S. Y.; WANSADHIPATHI, N. K.; BRUCE, C. R.; SHAMS-ELDIN, H.; SCHWARZ, R. T.; STEEL, P. G.; DENNY, P. W. The *Trypanosoma brucei* sphingolipid synthase, an essential enzyme and drug target. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, n. 1, p. 16-23, 2009.

MINA, J. G.; MOSELY, J. A.; ALI, H. Z.; SHAMS-ELDIN, H.; SCHWARZ, R. T.; STEEL, P. G.; DENNY, P. W. A plate-based assay system for analyses and screening of the *Leishmania major* inositol phosphorylceramide synthase. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 42, n. 9, p. 1553-1561, 2010.

MINA, J. G.; MOSELY, J. A.; ALI, H. Z.; DENNY, P. W.; STEEL, P. G. Exploring *Leishmania major* inositol phosphorylceramide synthase (LmjIPCS): insights into the ceramide binding domain. **Org. Biomol. Chem.**, v. 9, n. 6, p. 1823-1830, 2011.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MITCHISON, D.; DAVIES, G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 16, n. 6, p. 724-732, 2012.

MORAD, S. A.; LEVIN, J. C.; TAN, S. F.; FOX, T. E.; FEITH, D. J.; CABOT, M. C. Novel off-target effect of tamoxifen--inhibition of acid ceramidase activity in cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1831, n. 12, p. 1657-1664, 2013.

MORAD, S. A.; CABOT, M. C. Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolism-Therapeutic implications. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1851, n. 9, p. 1134-1145, 2015.

MUNIARAJ, M. The lost hope of elimination of Kala-azar (visceral leishmaniasis) by 2010 and cyclic occurrence of its outbreak in India, blame falls on vector control practices or co-infection with human immunodeficiency virus or therapeutic modalities? **Trop. Parasitol.**, v. 4, n. 1, p. 10-19, 2014.

MUSA, A. M.; YOUNIS, B.; FADLALLA, A.; ROYCE, C.; BALASEGARAM, M.; WASUNNA, M.; HAILU, A.; EDWARDS, T.; OMOLLO, R.; MUDAWI, M.; KOKWARO, G.; EL-HASSAN, A.; KHALIL, E. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 10, p. e855, 2010.

NAGIEC, M. M.; NAGIEC, E. E.; BALTISBERGER, J. A.; WELLS, G. B.; LESTER, R. L.; DICKSON, R. C. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 15, p. 9809-9817, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lipídios. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leninger: princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 280-300.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leninger: principles of biochemistry**. 50. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008. p. 183-234.

NEUMANN, A.; BAGINSKI, M.; CZUB, J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 51, p. 18266-18272, 2010.

NEVES, L. O.; TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P.; SILVA JUNIOR, R. M.; GUERRA, J. A.; FERREIRA, L. C.; TALHARI, S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Na. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

NICODEMO, E. L.; DUARTE, M. I.; CORBETT, C. E.; NICODEMO, A. C.; MATTA, V. L.; CHEBABO, R.; AMATO NETO, V. Visceral leishmaniasis in AIDS patient. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 32, n. 4, p. 310-311, 1990.

NONATA, R.; SAMPAIO, R.; MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 1, p. 77, 1997.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

ODOM, A. R.; STAHLBERG, A.; WENTE, S. R.; YORK, J. D. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 2026-2029, 2000.

OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. PI3K-gamma inhibitors in the therapeutic intervention of diseases caused by obligate intracellular pathogens. **Commun. Integr. Biol.**, v. 6, n. 2, p. e23360, 2013.

OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, n. 8, p. 604-616, 2004.

OHANIAN, J.; OHANIAN, V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 58, n. 14, p. 2053-2068, 2001.

OLIVEIRA, J. C. **Desenvolvimento de estratégias alternativas para teste de fármacos: obtenção e caracterização de linhagens mutantes estáveis de *Leishmania* expressando luciferase.** 2014. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, M. M.; TIMM, S. L.; COSTA, S. C. Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 58, n. 2, p. 195-199, 1977.

OLIVIER, M.; BADARO, R.; MEDRANO, F. J.; MORENO, J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, p. 79-98, 2003. Suppl 1.

OMOLLO, R.; ALEXANDER, N.; EDWARDS, T.; KHALIL, E. A.; YOUNIS, B. M.; ABUZOID, A. A.; WASUNNA, M.; NJOROGI, N.; KINOTI, D.; KIRIGI, G.; DORLO, T. P.; ELLIS, S.; BALASEGARAM, M.; MUSA, A. M. 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**, v. 12, p. 166, 2011.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PASQUETTI, A.; MOTA, W.; SANTOS, M.; BRITO, H. Uso do tamoxifeno no tratamento de quelóides e cicatrizes hipertróficas. Tamoxifen as treatment to keloids and hypertrophic scars. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 25, n. 2, p. 372-378, 2010.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; GAMARRO, F.; OUELLETTE, M.; CASTANYS, S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 50, p. 49965-49971, 2003.

PIERCE, S. K. Lipid rafts and B-cell activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 96-105, 2002.

PINTADO, V.; MARTIN-RABADAN, P.; RIVERA, M. L.; MORENO, S.; BOUZA, E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. **Medicine (Baltimore)**, v. 80, n. 1, p. 54-73, 2001.

POWLES, T. J. Efficacy of tamoxifen as treatment of breast cancer. **Semin. Oncol.**, v. 24, n. 1, p. S1-48-s41-54, 1997. Suppl 1.

PULFER, M.; MURPHY, R. C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 22, n. 5, p. 332-364, 2003.

RABIONET, M.; BAYERLE, A.; MARSCHING, C.; JENNEMANN, R.; GRONE, H. J.; YILDIZ, Y.; WACHTEN, D.; SHAW, W.; SHAYMAN, J. A.; SANDHOFF, R. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. **J. Lipid. Res.**, v. 54, n. 12, p. 3312-3321, 2013.

RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.

RAKOTOMANGA, M.; BLANC, S.; GAUDIN, K.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P. M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

RAMESH, V.; AVISHEK, K.; SHARMA, V.; SALOTRA, P. Combination therapy with amphotericin-B and miltefosine for post-kala-azar dermal leishmaniasis: a preliminary report. **Acta Derm. Venereol.**, v. 94, n. 2, p. 242-243, 2014.

REIMAO, J. Q.; TRINCONI, C. T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; MIGUEL, D. C.; KALIL, S. P.; ULIANA, S. R. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **J. Microbiol. Methods.**, v. 93, n. 2, p. 95-101, 2013.

REIMAO, J. Q.; MIGUEL, D. C.; TANIWAKI, N. N.; TRINCONI, C. T.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ULIANA, S. R. Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 5, p. e2842, 2014.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REYNOLDS, T. B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 5, p. 1386-1396, 2009.

RIJAL, S.; OSTYN, B.; URANW, S.; RAI, K.; BHATTARAI, N. R.; DORLO, T. P.; BEIJNEN, J. H.; VANAERSCHOT, M.; DECUYPERE, S.; DHAKAL, S. S.; DAS, M. L.; KARKI, P.; SINGH, R.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, n. 11, p. 1530-1538, 2013.

RITMEIJER, K.; DEJENIE, A.; ASSEFA, Y.; HUNDIE, T. B.; MESURE, J.; BOOTS, G.; DEN BOER, M.; DAVIDSON, R. N. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of

visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 3, p. 357-364, 2006.

RODRIGUEZ, A. M.; GRAEF, A. J.; LEVINE, D. N.; COHEN, I. R.; MODIANO, J. F.; KIM, J. H. Association of Sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P Receptor-1 Pathway with Cell Proliferation and Survival in Canine Hemangiosarcoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 29, n. 4, p. 1088-1097, 2015.

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, M. X.; OUELLETTE, M.; SARAVIA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 193, n. 10, p. 1375-1383, 2006.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACEDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

ROWLANDS, M. G.; PARR, I. B.; MCCAGUE, R.; JARMAN, M.; GODDARD, P. M. Variation of the inhibition of calmodulin dependent cyclic AMP phosphodiesterase amongst analogues of tamoxifen; correlations with cytotoxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, n. 2, p. 283-289, 1990.

SADEGHIAN, G.; NILFOROUSHZADEH, M. A. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 45, n. 7, p. 819-821, 2006.

SAIARDI, A.; CAFFREY, J. J.; SNYDER, S. H.; SHEARS, S. B. Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 468, n. 1, p. 28-32, 2000.

SAMPAIO, S. A.; CASTRO, R. M.; DILLON, N. L.; MARTINS, J. E. Treatment of mucocutaneous (American) leishmaniasis with amphotericin B: report of 70 cases. **Int. J. Dermatol.**, v. 10, n. 3, p. 179-181, 1971.

SASAKI, T.; SASAKI, J.; SAKAI, T.; TAKASUGA, S.; SUZUKI, A. The physiology of phosphoinositides. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 9, p. 1599-1604, 2007.

SASAKI, T.; TAKASUGA, S.; SASAKI, J.; KOFUJI, S.; EGUCHI, S.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. **Prog. Lipid Res.**, v. 48, n. 6, p. 307-343, 2009.

SATO, K.; NODA, Y.; YODA, K. Kei1: a novel subunit of inositolphosphorylceramide synthase, essential for its enzyme activity and Golgi localization. **Mol. Biol. Cell.**, v. 20, n. 20, p. 4444-4457, 2009.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHU, P. V.; TAKEGAWA, K.; FRY, M. J.; STACK, J. H.; WATERFIELD, M. D.; EMR, S. D. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. **Science**, v. 260, n. 5104, p. 88-91, 1993.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, 2005.

SEIFERT, K.; MATU, S.; JAVIER PEREZ-VICTORIA, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S. L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, n. 4, p. 380-387, 2003.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SERRANO, A. A.; SCHENKMAN, S.; YOSHIDA, N.; MEHLERT, A.; RICHARDSON, J. M.; FERGUSON, M. A. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 45, p. 27244-27253, 1995.

SEVOVA, E. S.; GOREN, M. A.; SCHWARTZ, K. J.; HSU, F. F.; TURK, J.; FOX, B. G.; BANGS, J. D. Cell-free synthesis and functional characterization of sphingolipid synthases from parasitic trypanosomatid protozoa. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 27, p. 20580-20587, 2010.

SEYFANG, A.; LANDFEAR, S. M. Substrate depletion upregulates uptake of *myo*-inositol, glucose and adenosine in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, n. 1, p. 121-130, 1999.

SHAYMAN, J. A. Sphingolipids. **Kidney Int.**, v. 58, n. 1, p. 11-26, 2000.

SHEN, L. Z.; HUA, Y. B.; YU, X. M.; XU, Q.; CHEN, T.; WANG, J. H.; WU, W. X. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma *in vivo*. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 7, p. 1060-1064, 2005.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569-572, 1997.

SINDERMAN, H.; ENGEL, K. R.; FISCHER, C.; BOMMER, W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 10, p. 1520-1523, 2004.

SINGH, M. N.; STRINGFELLOW, H. F.; PARASKEVAIDIS, E.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; MARTIN, F. L. Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties. **Cancer Treat. Rev.**, v. 33, n. 2, p. 91-100, 2007.

SMITH, E. R.; MERRILL, A. H.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. **Methods Enzymol.**, v. 312, p. 361-373, 2000.

SOLEIMANIFARD, S.; ARJMAND, R.; SABERI, S.; KHAMESIPOUR, A.; KAZEMI, M.; SALEHI, M.; AKBARI, M.; HEJAZI, S. P-glycoprotein A Gene Expression in Glucantime-Resistant and Sensitive *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iran J. Parasitol.**, v. 9, n. 3, p. 423-428, 2014.

SOLOMON, M.; BAUM, S.; BARZILAI, A.; SCOPE, A.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.

SOSA, N.; CAPITAN, Z.; NIETO, J.; NIETO, M.; CALZADA, J.; PAZ, H.; SPADAFORA, C.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; KOPYDLOWSKI, K.; ULLMAN, D.; MCCARTHY, W. F.; RANSOM, J.; BERMAN, J.; SCOTT, C.; GROGL, M. Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 3, p. 557-563, 2013.

SOTO, J.; REA, J.; BALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; SOTO, P.; VALDA, L.; BERMAN, J. D. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 2, p. 210-211, 2008.

STEINER, A. Z.; TERPLAN, M.; PAULSON, R. J. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 6, p. 1511-1515, 2005.

STOFFEL, W.; STICHT, G.; LEKIM, D. Synthesis and degradation of spingosine bases in *Hansenula ciferrii*. **Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.**, v. 349, n. 9, p. 1149-1156, 1968.

SUNDAR, S.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, M. K.; MURRAY, H. W. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 176, n. 4, p. 1117-1119, 1997.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, 2002.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bull World Health Organ.**, v. 83, n. 5, p. 394-395, 2005.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; AGRAWAL, N.; VAILLANT, M.; OLLIARO, P.; MURRAY, H. W. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 8, p. 1000-1006, 2008.

SUNDAR, S.; SINHA, P. K.; RAI, M.; VERMA, D. K.; NAWIN, K.; ALAM, S.; CHAKRAVARTY, J.; VAILLANT, M.; VERMA, N.; PANDEY, K.; KUMARI, P.; LAL, C. S.; ARORA, R.; SHARMA, B.; ELLIS, S.; STRUB-WOURGAFT, N.; BALASEGARAM, M.; OLLIARO, P.; DAS, P.; MODABBER, F. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet.**, v. 377, n. 9764, p. 477-486, 2011.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, O. P. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **J. Trop. Med.**, v. 2014, p. 646932, 2014.

SUTTERWALA, S. S.; HSU, F. F.; SEVOVA, E. S.; SCHWARTZ, K. J.; ZHANG, K.; KEY, P.; TURK, J.; BEVERLEY, S. M.; BANGS, J. D. Developmentally regulated sphingolipid synthesis in African trypanosomes. **Mol. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 281-296, 2008.

TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, H.; MATSUO, N.; NOMURA, T.; TAKIZAWA, M.; IMOKAWA, G. Biosynthesis of acylceramide in murine epidermis: characterization by inhibition of glucosylation and deglucosylation, and by substrate specificity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, n. 3, p. 722-729, 2004.

TANAKA, A. K.; VALERO, V. B.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 3, p. 487-492, 2007.

TIRODKAR, T. S.; VOELKEL-JOHNSON, C. Sphingolipids in apoptosis. **Exp. Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 231-242, 2012.

TREMBLAY, M.; OLIVIER, M.; BERNIER, R. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. **Parasitol. Today.**, v. 12, n. 7, p. 257-261, 1996.

TRINCONI, C. T. **Investigação sobre a atividade de ceramida sintase em *Leishmania amazonensis***. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

VAN GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, n. 3, p. 184-194, 2010.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

WANG, H.; CHARLES, A. G.; FRANKEL, A. J.; CABOT, M. C. Increasing intracellular ceramide: an approach that enhances the cytotoxic response in prostate cancer cells. **Urology**, v. 61, n. 5, p. 1047-1052, 2003.

WARD, H. W. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 5844, p. 13-14, 1973.

WATANABE, M.; KITANO, T.; KONDO, T.; YABU, T.; TAGUCHI, Y.; TASHIMA, M.; UMEHARA, H.; DOMAE, N.; UCHIYAMA, T.; OKAZAKI, T. Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v. 64, n. 3, p. 1000-1007, 2004.

WILLIAMS-BROWN, M. Y.; SALIH, S. M.; XU, X.; VEENSTRA, T. D.; SAEED, M.; THEILER, S. K.; DIAZ-ARRASTIA, C. R.; SALAMA, S. A. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 126, n. 3-5, p. 78-86, 2011.

WINTER, G.; FUCHS, M.; MCCONVILLE, M. J.; STIERHOF, Y. D.; OVERATH, P. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. **J. Cell. Sci.**, v. 107, pt. 9, p. 2471-2482, 1994.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Tamoxifen and related compounds protect against lipid peroxidation in isolated nuclei: relevance to the potential anticarcinogenic benefits of breast cancer prevention and therapy with tamoxifen? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, n. 5, p. 485-488, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO expert committee. **World Health Organ Tech. Rep.**, v. 949, p. 1-186, Set 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. O. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organ Tech. Rep. Ser.**, n. 975, p. v-xii, 1-100, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CONSOLIDATED GUIDELINES ON HIV PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT AND CARE FOR KEY POPULATIONS. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 14 jul. 2014.

YAMEY, G.; TORRELE, E. The world's most neglected diseases. **Bmj.**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 752-756, 1997.

YONEYAMA, K. A.; TANAKA, A. K.; SILVEIRA, T. G.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **J. Lipid. Res.**, v. 47, n. 10, p. 2171-2178, 2006.

ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1225-1233, 2003.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I.; PELLI DE OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 15, n. 1, p. 68-76, 2010.

ZHANG, K.; HSU, F. F.; SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R.; TURK, J.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 5, p. 1566-1578, 2005.

ZHANG, K.; POMPEY, J. M.; HSU, F. F.; KEY, P.; BANDHUVULA, P.; SABA, J. D.; TURK, J.; BEVERLEY, S. M. Redirection of sphingolipid metabolism toward *de novo* synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. **Embo. J.**, v. 26, n. 4, p. 1094-1104, 2007.

ZHANG, K.; BEVERLEY, S. M. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 170, n. 2, p. 55-64, 2010.

ZHANG, O.; WILSON, M. C.; XU, W.; HSU, F. F.; TURK, J.; KUHLMANN, F. M.; WANG, Y.; SOONG, L.; KEY, P.; BEVERLEY, S. M.; ZHANG, K. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 12, p. e1000692, 2009.

APÊNDICE A - Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice:
Validation of luciferase as a quantitative tool

Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool

Juliana Q. Reimão ^{*,1}, Cristiana T. Trinconi ¹, Jenicer K. Yokoyama-Yasunaka, Danilo C. Miguel ², Sandra P. Kalil, Silvia R.B. Uliana

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2013
Received in revised form 22 February 2013
Accepted 23 February 2013
Available online 4 March 2013

Keywords:

Leishmania (L.) amazonensis
Luciferase
Amphotericin B
Ex vivo
In vivo imaging system
Cutaneous leishmaniasis

ABSTRACT

Given the lack of effective and safe alternatives to the drugs already in use, considerable efforts are being applied to the search of new therapeutic options to treat leishmaniasis. A necessary step in the discovery of antileishmanial drugs is the validation of drug candidates in mouse models. The standard methods to quantify the parasite burden in animal models, mainly culture-based, are time consuming and expensive. In recent years, in vivo imaging systems have been proposed as a tool to overcome these problems, allowing parasite detection in living organisms. Here we compared different treatment efficacy evaluation approaches. Recombinant *Leishmania (L.) amazonensis* lines expressing the luciferase gene (La-LUC) were obtained and characterized for biological properties as compared with the wild type (WT) parental line. Bioluminescence generated by La-LUC was shown to correlate with the number of promastigotes in vitro. La-LUC promastigotes and intracellular amastigotes were equally sensitive to amphotericin B (AmB) as the WT parasites. The clinical pattern of lesion development upon infection with the transgenic lines was similar to lesions observed after infection with the WT strain. The half maximal effective dose (ED₅₀) of AmB was determined in La-LUC infected mice through quantification of bioluminescence in vivo and ex vivo, by limiting dilution and using clinical parameters. There was agreement in the ED₅₀ determined by all methods. Quantification of bioluminescence in vivo and/or ex vivo was elected as the best tool for determining parasite burden to assess drug efficacy in infected mice. Furthermore, the detailed analysis of AmB effectiveness in this model generated useful data to be used in drug combination experiments.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Species of the *Leishmania* genus are protozoan parasites responsible for cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis, which occur throughout various parts of the world, mainly in tropical and subtropical areas, representing a major public health problem. *Leishmania* is a digenetic parasite, with extracellular motile promastigotes present in the alimentary tract of their insect vector, and intracellular non-motile amastigotes, which live in the mononuclear phagocytes of mammalian hosts. The etiologic agents of leishmaniasis include many *Leishmania* species. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is responsible for most cases of human cutaneous leishmaniasis in the Amazon region of Brazil and is the most important agent of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in South America (Convit et al., 1993). DCL is a rare form of leishmaniasis, characterized by non-ulcerated nodules with diffuse cutaneous infiltration that can spread over most of the exposed areas of the

body. DCL is a disease of chronic evolution, being considered refractory to all kinds of treatment used at the moment (Zerpa et al., 2007).

Combination therapy has been put forward as the best strategy to overcome the present problems with leishmaniasis chemotherapy. Drug combinations may involve some of the classical agents already in use and the experimental design for testing a given combination may be greatly facilitated by previous knowledge of the half maximal effective concentration (ED₅₀) of the drugs to be tested. Amphotericin B (AmB) has been used in the treatment of human visceral leishmaniasis since the 1950's (Jha et al., 1995). However, this drug has not been so widely used in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Data in the literature on *L. (L.) amazonensis* sensitivity to AmB in experimental models is scarce. The activity of AmB has been previously determined in vivo in different species of *Leishmania* at a single dose level (Mullen et al., 1997, 1998; Al-Abdely et al., 1999). Previous work reported the dose–response effects of AmB in vivo against *Leishmania (Leishmania) donovani* (Yardley and Croft, 2000). However, to the best of our knowledge, the ED₅₀ of AmB in *L. (L.) amazonensis* infected mice has not been reported.

The enzyme luciferase (LUC) represents one of the most efficient biological reporters nowadays. It catalyzes the reaction of the substrate luciferin with adenosine triphosphate (ATP) to generate photons

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917334; fax: +55 11 30917417.

E-mail address: juliana_reimao@yahoo.com.br (J.Q. Reimão).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, Maryland, United States.

(Lang et al., 2005). The expression of the gene encoding *LUC* in *Leishmania* spp., including *L. (L.) amazonensis*, and its use in the evaluation of antileishmanial compounds has been described (Ashutosh et al., 2005; Lang et al., 2005; Ravinder et al., 2012; Roy et al., 2000; Sereno et al., 2001). Of particular interest, is the use of in vivo imaging system (IVIS) which offers several potential advantages over conventional methods of parasite quantification in experimentally infected animals. Because of its non-destructive and non-invasive nature, this technique can be performed repeatedly and permits each animal to be used as its own control over time, overcoming the problem of animal-animal variations (Michel et al., 2011) and reducing the number of animals in each experiment. However, the validation of this novel methodology as a quantitative approach for determining parasite burden is still lacking.

In the present work, we determined the ED₅₀ of AmB in BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* through different methodologies. We used *L. (L.) amazonensis* parasites expressing *LUC* (La-LUC) to quantify *Leishmania* infection in vivo, in the site of inoculation, and ex vivo, in tissue samples from infected mice, in order to compare the achieved ED₅₀ by different approaches. Data presented herein represent an invaluable resource in the design of drug combination experiments with AmB in this model.

2. Methods

2.1. Parasites

The *L. (L.) amazonensis* strain MHOM/BR/1973/M2269 was a kind gift from Dr. Jeffrey Shaw (University of São Paulo). Wild-type *L. (L.) amazonensis* (La-WT) promastigotes were grown in 25 cm² tissue culture flasks containing M199 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco™ Invitrogen Corporation, NY, USA) and 0.25% hemin (Sigma-Aldrich) at 25 °C.

2.2. Transfection and selection of mutants

The 1.7 kb *Photinus pyralis* (firefly) *LUC* open reading frame was excised from the plasmid pT7 (Promega Corporation, Madison, USA) with *Bam* HI and *Sac* I and cloned into the vector pCITE-2a(+) (Novagen, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Transformants were selected and the insert was removed with *Bam* HI and *Bgl* II to be cloned into the *Bam* HI site of the shuttle *Leishmania* vector pXG1 (kindly provided by Dr. Stephen Beverley, Washington University, St. Louis, USA). Cloning was confirmed by restriction digest and sequencing. DNA electroporation in *L. (L.) amazonensis* was done as described (Coburn et al., 1991) and the cells were then plated in M199 medium containing 1% of agar (Gibco™, Invitrogen Corporation) and 20 µg/mL of Geneticin (G418, Sigma-Aldrich). After 2 weeks, colonies were picked, expanded in liquid media and drug concentrations were increased to 32 µg/mL of G418.

2.3. Luciferase in vitro assay

Promastigotes of drug resistant *L. (L.) amazonensis* transfected with the *LUC* construct (La-LUC) were harvested at the late log-phase of growth, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) and resuspended in M199. Parasites were serially diluted and the *LUC* assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, One Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation) and parasites were mixed at 1:5 proportions, respectively. The units of luminescence (UL) were registered in a microplate reader (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Alternatively, plates were read using an in vivo imaging system (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Photons were collected by automatic acquisition with a charge-coupled device (CCD) camera using the high

resolution mode (medium binning) (Ploemen et al., 2009) and values were expressed as photons per second (Ph/s). Each point was tested in duplicate or triplicate in at least two independent experiments.

2.4. Determination of half maximal effective concentration (EC₅₀) in promastigotes and intracellular amastigotes

Stock solutions of amphotericin B deoxycholate (AmB) (5.4 mM) (Cristália, Itapira, SP, Brazil) were prepared in sterile distilled water and diluted in M199 medium. Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer (400× magnification) and seeded at 2×10^7 per mL in a final volume of 200 µL. Parasites were incubated in the presence of increasing drug concentrations for 24 h in 96-well microplates (Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) in triplicate. Viability of promastigotes was assessed by MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) cleavage as described previously (Zauli-Nascimento et al., 2010). Briefly, MTT (5 mg/mL) was dissolved in PBS, sterilized through 0.22 µm membranes and added, 20 µL/well, for 4 h at 25 °C. The reaction was stopped by the addition of 80 µL 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) to each well. Optical density (OD) was determined in a plate reader (BMG Labtech) at 550 nm. Results were expressed as the mean percentage reduction of parasite number compared with untreated control wells calculated for at least three independent experiments. The EC₅₀ was determined by sigmoidal regression curves using Graph Pad Prism 5.0 software.

To determine the EC₅₀ against *L. (L.) amazonensis* intracellular amastigotes, bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from BALB/c mice as previously described (Zamboni and Rabinovitch, 2003). BMDM were counted and distributed in 16-well chamber Glass Lab-Tek® slide™ (NUNC, Rochester, NY, USA) at 4×10^5 per mL with a final volume of 200 µL in RPMI 1640 medium (Gibco™, Invitrogen Corporation) supplemented with 10% FCS (Gibco™, Invitrogen Corporation) and allowed to adhere after being kept in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h at 37 °C. Macrophages were infected with stationary-phase promastigotes (20:1 parasites/macrophage) for 3 h at 33 °C. Non-internalized parasites were removed by washing, followed by the addition of fresh medium containing increasing drug concentrations. After 48 h, cells were fixed and stained. For the evaluation of parasite burden under light microscopy, 16-well chamber slides were fixed in methanol and stained with the Instant Prov kit (Newprov, Pinhais, PR, Brazil). The percentage of infected cells was determined by counting 200 cells in each of the replicates.

EC₅₀ values were determined from sigmoidal regression of the concentration–response curves using GraphPad Prism 5 software. Each point was tested in duplicate or triplicate and the experiments were repeated at least twice.

2.5. Experimental studies with *L. (L.) amazonensis*-LUC infected mice

In vivo experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB/USP). BALB/c mice were obtained from the ICB/USP, kept in mini-isolators (dimensions: 32 cm × 20 cm × 21 cm, 6 animals per cage) with absorbent material in ventilated racks (Alesko Industry, Monte Mor, SP, Brazil), and received unlimited food and water. Each animal cage was enriched with a red igloo (Alesko Industry), which is an environmental enrichment item. This item allows the animal to jump, climb, slide and sleep during the day. The red color is perceived as black by mice thus providing shelter and a secluded place for them to build a nest.

Female BALB/c mice (3 to 5 weeks-old) were infected in the footpad or at the base of the tail with 10^6 stationary phase promastigotes (6th day of culture) of La-WT or La-LUC in a final volume of 20 µL, using a 300 µL syringe fitted with an ultra-fine needle (30 G) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). In order to evaluate

Fig. 1. Correlation between luciferase activity and number of *Leishmania* promastigotes. *L. (L.) amazonensis*-LUC promastigotes were serially diluted and luminescence was measured using a microplate reader (A) or an IVIS (B). Results are the mean and standard deviation of triplicate or duplicate determinations. Figures are representative of one of two experiments with similar results. Ph/s: photons per second.

disease progression, mice were monitored weekly by measuring the difference in the thickness between the infected and contralateral uninfected footpads using a caliper (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Kanagawa, Japan). Tail measurements were registered as the mean of tail base horizontal and vertical diameters and lesion size was estimated by subtracting the tail thickness in the first day of treatment. Ulcer area was expressed in mm². For in vivo half maximal effective dose (ED₅₀) determination, mice were randomly assigned into experimental groups (n = 6) five weeks post-infection. Treated animals received 1.2, 2 or 4 mg/kg/day AmB intraperitoneally (i.p.). The treatment was administered for four weeks comprising a total of 20 doses, with two day interval each five consecutive days. Drugs were prepared daily and disease progression was evaluated once a week. After the end of the treatment, mice were monitored during four weeks to evaluate drug effectiveness.

The La-LUC light emission in the tail of infected animals was recorded by bioimaging (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences), 9 and 13 weeks post-infection. Previous to the imaging, mice received 75 mg/kg VivoGlo™ Luciferin (Promega Corporation) (i.p.) and were anesthetized in a 2.5% isoflurane atmosphere (Cristália). Animals were then transferred to the imaging chamber and kept in a 1.5% isoflurane atmosphere. Emitted photons were collected using the high resolution (medium binning) mode. Total photon emission from a defined region of interest (ROI) corresponding to the lesion in the tail was registered. The same ROI was applied to all animals. The images were acquired 20 min after luciferin injection. Total photon emission from the dorsal image of each mouse tail was quantified with Living Image software version 4.3.1 (Caliper Life Sciences), and results were expressed as the number of photons/s/ROI. The photon signal from the tail was presented as a pseudocolor image representing light intensity (red = most intense and blue = least intense) and superimposed on the gray scale reference image (Lecoeur et al., 2007).

At the end of the experiment, mice were euthanized and the lesions were removed using scissors and scalpel blades, and then macerated in PBS using an automatic homogenizer (OMNI TH International, Kennesaw, GA, USA). An aliquot of this macerate was utilized to quantify the number of parasites ex vivo, using LUC assay according to the manufacturer's instructions. Briefly, One Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation), tissue macerate and PBS were mixed at 1:1:3 proportions, respectively. The UL were registered in a microplate reader (POLARstar Omega, BMG Labtech) and the recorded emission was multiplied by the dilution factor. Each point was tested in triplicate. Another aliquot of this macerate was used to perform the limiting dilution method as previously described (Lima et al., 1997).

Drug inhibition curves were drawn from each method and effective dose 50% (ED₅₀) was determined from sigmoidal regression of the dose-response curves.

Fig. 2. AmB activity against wild type *L. (L.) amazonensis* (La-WT) and *L. (L.) amazonensis* expressing luciferase (La-LUC) in vitro. The in vitro activity of AmB against promastigotes (A) and intracellular amastigotes (B) was determined by MTT and by microscopic counting, respectively, as described in the Determination of half maximal effective concentration (EC₅₀) in promastigotes and intracellular amastigotes section. Results are the mean and standard deviation of triplicate samples. Figures are representative of one of three experiments with similar results.

Table 1

Half maximal effective concentration (EC₅₀) of AmB against *L. (L.) amazonensis* wild type (La-WT) and *L. (L.) amazonensis* expressing luciferase (La-LUC).

Form	EC ₅₀ (nM) (95% CI) ^c	
	La-WT	La-LUC
Promastigotes ^a	111.0 (104.5–117.8)	98.11 (90.21–106.7)
Amastigotes ^b	69.22 (65.42–73.23)	65.02 (55.15–76.65)

^a In vitro activity of AmB against promastigotes was determined by MTT. The results are expressed as the mean of duplicate experiments, each one performed with triplicate samples.

^b Activity against intracellular amastigotes was determined in infected macrophages by microscopic counting. The results are expressed as the mean of duplicate experiments, each one performed with triplicate samples.

^c 95% CI: 95% confidence interval of the EC₅₀ values, given in nM.

Fig. 3. Infectivity of *L. (L.) amazonensis* expressing luciferase. BALB/c mice were inoculated in the left hind footpad with 10^6 stationary phase promastigotes of *L. (L.) amazonensis* wild type (La-WT) or luciferase expressing (La-LUC). Lesion size represents the average difference between infected and contralateral non-infected hind footpads ($n = 6$ per group). Statistical analysis was performed with the Student's *t* test and did not show any significant difference between groups.

2.6. Statistical analysis

Data on lesion/ulcer progression, limiting dilution, and in vivo and ex vivo LUC quantification was analyzed for statistical significance by One Way ANOVA, followed by the Tukey post-test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

3. Results

3.1. Characterization of LUC transformed *L. (L.) amazonensis* lines

LUC expression was evaluated in independent lines selected after transfection of the pXG1[LUC] construct. A clear correlation was observed between the number of parasites and luminescence (Fig. 1). The lower limit of detection when promastigotes were analyzed in a luminometer was 10 with luminescence values of 73.5 ± 6.5 units. In the same standard curve, discrete values were obtained in the range of 10 to 10^6 parasites (Fig. 1A). Standard curves with increasing number

of parasites were also evaluated by direct imaging of plates using IVIS (Fig. 1B). A linear correlation between parasite number and photons registered was also observed. However, in this case the range of detection was narrower, varying from 10^3 to 10^6 promastigotes.

The growth curves of WT and La-LUC parasites were indistinguishable. La-LUC promastigotes were infective to macrophages leading to the development of the typically large parasitophorous vacuoles observed when cells are infected with *L. (L.) amazonensis* (data not shown).

To further validate La-LUC parasite as a drug screening tool, in vitro susceptibility to AmB of WT parental strain and La-LUC lines was compared (Fig. 2). Transgenic and WT *L. (L.) amazonensis* promastigotes presented similar sensitivity to AmB, as observed in Fig. 2A. The same reduction in the percentage of macrophage infection was observed upon treatment with increasing concentrations of AmB in both La-LUC and La-WT infected cultures (Fig. 2B). The EC_{50} of AmB against La-LUC promastigotes and amastigotes, measured by MTT and by microscopic examination, respectively, was in accordance with the values obtained for La-WT (Table 1), confirming the suitability of La-LUC for studying the effectiveness of antileishmanial drugs.

In order to compare the infectivity of La-LUC and La-WT in vivo, LUC-expressing or WT stationary phase promastigotes were inoculated into BALB/c mice. In both cases, the onset of cutaneous clinical signs was detectable around week four, and progressively increased during the period studied (Fig. 3). No significant difference was observed in the lesion size between the two groups. Thus, La-LUC and La-WT presented the same disease progression in infected mice.

3.2. Evaluation of AmB treatment in *L. (L.) amazonensis*-LUC infected mice

We then set out to characterize AmB response in the *L. (L.) amazonensis*-BALB/c infection model. Effectiveness of treatment was evaluated by clinical and parasitological criteria. Different approaches were used to determine the parasite burden in an attempt to compare

Fig. 4. AmB treatment of BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* expressing luciferase. Mice were inoculated in the tail with 10^6 stationary phase promastigotes of La-LUC. Treatment with AmB (1.2, 2 or 4 mg/kg/day) was initiated five weeks post-infection. Lesion size (A) and ulcer size (B) were recorded in AmB treated or untreated (NT) groups ($n = 6$ per group) during and until 4 weeks after the end of treatment. Horizontal bars indicate the period of AmB administration. (C) and (D) show individual measures of lesion (C) and ulcer sizes (D) at the end of the experiment (four weeks after the end of treatment). Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA with the Tukey post-test; statistical results are shown for the group treated with AmB4 as compared with the control group (*), with AmB 1 (#) or with AmB 2 (δ). ● NT; ■ AmB 1.2; ▲ AmB 2; ◆ AmB 4.

Fig. 5. Bioluminescence of lesions in untreated and AmB treated mice. BALB/c mice were inoculated in the tail with 10^6 La-LUC stationary phase promastigotes and treated with AmB at 1.2, 2 or 4 mg/kg/day for 20 days. Images were acquired at the end of AmB treatment (nine weeks post-infection) (A and C) and in the end of the experiment (13 weeks post-infection) (B and D). Images illustrate the macroscopical aspect of lesions (A and B) and bioluminescence imaging (C and D) from representative mice in each group ($n = 6$ per group). Ph/s: photons per second.

these methods in the evaluation of drug responses in the mouse model.

The progression of the clinical signs of disease, such as lesion and ulcer sizes (Fig. 4A and B), was followed up for 13 weeks. Treated mice showed reductions in lesion and ulcer sizes in a dose-dependent manner (Fig. 4C and D). At the end of treatment, lesion size was reduced by 100% and 58.3% in groups treated with 4 and 2 mg/kg/day AmB, respectively, in comparison with untreated mice. Lesion size was not reduced in the group treated with 1.2 mg/kg/day AmB (Fig. 4A and C). Similar results were observed for ulcer size (Fig. 4B and D). The group treated with 4 mg/kg/day AmB was significantly different from 1.2 mg/kg/day AmB and untreated groups (Fig. 4C and D).

During follow up after the end of treatment, clinical signs worsened in all groups (Fig. 4A and B) indicating that no treatment scheme was completely effective. The group treated with 4 mg/kg/day AmB was the least unstable of all with only a small increase in lesion and ulcer sizes after the interruption of treatment.

LUC quantification through bioimaging showed correlation with the macroscopical examination of lesions (Fig. 5). Light emission was reduced in a dose-dependent manner in AmB-treated mice at both time points. In each group, light emission increased at the end of the evaluation as compared to the values obtained at the end of treatment (Fig. 5C and D).

To quantitatively validate the data obtained by bioimaging, parasite burden was evaluated by limiting dilution. At the same time, an alternative method, ex vivo quantitation of LUC expression in parasites recovered from the lesion, was assessed (Fig. 6). When quantified by limiting dilution, the average reduction in the group treated with 4 mg/kg/day AmB was 93.52% as compared with the untreated group (Fig. 6A and Table 2). Bioimaging and ex vivo LUC quantitation for the same groups showed 87.38 and 79.89% reductions, respectively (Fig. 6B, C and Table 2). Therefore, although there were differences in the quantitative results between the three methods (Table 2), all techniques produced the same profile and indicated that only the group treated with 4 mg/kg/day AmB was significantly different from the untreated group.

Sigmoidal dose-response curves were derived to calculate the ED_{50} of AmB for each of the parameters used to evaluate the response to treatment (Table 3). For lesion size, LUC quantification (in vivo and ex vivo) and limiting dilution, values obtained varied from 1.19 to 2.86 mg/kg/day and the average ED_{50} was 2.09 mg/kg/day. An overlapping of 95% confidence intervals (95% CI) was observed for lesion size and LUC quantification (in vivo and ex vivo) and for LUC

quantification in vivo and limiting dilution (Table 3). The differences in ED_{50} values obtained with the data from these different evaluation methods are well within the acceptable range for this type of determination. Therefore, the results of LUC quantification are congruent with the limiting dilution and lesion size results. For ulcer size, the AmB ED_{50} was 0.61 mg/kg/day (95% CI = 0.35–1.05) and was different when compared with all the other parameters.

4. Discussion

L. (L.) amazonensis lines expressing LUC were obtained in order to quantify parasite loads in infected animals. Bioluminescence generated by La-LUC was evaluated either in a microplate reader or in an IVIS. In both cases, luminescence correlated with the number of parasites, confirming that LUC activity is a reliable method to quantify transfected promastigotes in vitro, as previously reported (Gupta, 2005; Lang et al., 2005; Roy et al., 2000). Transfected parasites were equally sensitive to AmB as the WT parasites, as shown by the EC_{50} for promastigotes and intracellular amastigotes of both strains. These values were also in accordance with the previous reports for *L. (L.) amazonensis* (Zauli-Nascimento et al., 2010).

Reports exist on the use of *L. (L.) donovani* and *Leishmania (Leishmania) major* expressing the LUC gene either as part of extra-chromosomal circular molecules or integrated into the parasite genome (Roy et al., 2000). The authors found that for prolonged growth in the absence of drug selection, such as within animal models, quantitation of parasites was more reliable when the LUC gene was stably integrated in the parasite genome. In fact, when reporters are part of plasmids, the relative output of the reporter may depend on the copy number of the transfected plasmid, which varies from cell to cell (Kutzleb et al., 1973). However, several observations suggest that episomal DNA is maintained during the amastigote stage for long periods, irrespective of drug pressure (Uliana et al., 1999). In our model, LUC expression was maintained after infection in mice, regardless of the absence of antibiotic pressure, since amastigotes recovered from the tail of infected *L. (L.) amazonensis* BALB/c mice 13 weeks post-infection were still expressing luciferase. The clinical pattern of lesion development was also similar when the WT strain was compared to the lines expressing LUC, indicating that both strains are driving a similar clinical course, as previously reported (Lang et al., 2005).

Aiming to validate the use of La-LUC infected mice for experimental studies with antileishmanial drugs and to quantitatively evaluate results obtained from IVIS, we tested the efficacy of AmB given at

Fig. 6. Evaluation of parasite burden after AmB treatment by different techniques. AmB was administered at 1.2, 2 and 4 mg/kg/day for 20 days and the treatment was evaluated at the end of the experiment (four weeks after the end of treatment) by limiting dilution (A), bioluminescence quantification in vivo (B) and ex vivo (C). Untreated (NT) animals were used as control ($n = 6$ per group). Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA with the Tukey post-test: statistical results are shown for the groups treated with 2 or 4 mg/kg/day (AmB2 or AmB4) as compared with the control group (*), or with AmB 1.2 (#). ● NT; ■ AmB 1.2; ▲ AmB 2; ◆ AmB 4. Each symbol corresponds to one mouse. Ph/s: photons per second.

three different doses. Criteria used to evaluate drug response included lesion and ulcer sizes and parasite burden, determined by three different methods: limiting dilution, IVIS and ex vivo LUC quantification. Evaluation at the end of treatment indicated that all these parameters were in accordance.

To date the most widely used criteria to evaluate effectiveness in cutaneous leishmaniasis models have been lesion size and limiting dilution-determined parasite burden. Limiting dilution is a highly laborious and time consuming technique and is subject to errors due to loss of parasites during cell isolation steps. It can take days or weeks until parasites are observed. Moreover, the cultures may become contaminated (Kobets et al., 2012). Therefore, limiting dilution results are difficult to reproduce. Attempts to overcome these difficulties include the determination of parasite burden based on reverse transcription and real-time PCR, for example (Nicolas et al., 2002) but this alternative is not devoid of difficulties itself. With the availability of bioimaging, new attractive alternatives

Table 2

Effectiveness of AmB in vivo measured by different criteria evaluated four weeks after the interruption of treatment.

Method ^a	NT	AmB 1.2 ^b	AmB 2	AmB 4
Lesion size (mm)	2.43 (100%)	2.53 (104.12%)	1.98 (81.48%)	0.57 (23.46%)
Ex vivo LUC quantification (UL $\times 10^4$)	14.17 (100%)	11.71 (82.64%)	9.35 (65.98%)	2.85 (20.11%)
In vivo LUC quantification (Ph/s $\times 10^6$)	4.04 (100%)	2.99 (74.01%)	1.96 (48.51%)	0.51 (12.62%)
Number of parasites ($\times 10^7$)	9.88 (100%)	4.87 (49.29%)	1.10 (11.13%)	0.64 (6.48%)
Ulcer size (mm ²)	0.71 (100%)	0.87 (122.54%)	0.63 (88.73%)	0.16 (22.54%)

^a Treatment of BALB/c mice infected with La-LUC was initiated five weeks after the infection. Clinical parameters or parasite burden was determined four weeks after the end of treatment. UL: units of luminescence; Ph/s: photons per second; number of parasites was determined by limiting dilution.

^b AmB was given at 1.2, 2 or 4 mg/kg/day. Columns show the average value for each group expressed as the absolute measurement and as a percentage as compared with the untreated group (in parenthesis). NT: untreated control group.

to quantify parasites in tissues became apparent but there is still a need to validate bioimaging as a quantitative measure of parasite loads (Thalhofer et al., 2010). Also, no data comparing different methodologies to evaluate drug effectiveness at the ED₅₀ level is available.

We found that luminescence measured in vivo and ex vivo was directly correlated to parasite burden estimated by the limiting dilution method and to lesion and ulcer sizes, validating the use of LUC as a quantitative tool in this model.

IVIS possess several advantages, such as the possibility to monitor the disease progression in the same animal and the consequent reduction of the number of animals in each experimental group. There are also some limitations to this methodology, such as the use of expensive substrate. Also, mixing of reagents and injection into animals needs to be timed with anesthesia and image acquisition, as the luminescent read out is transient (Gupta, 2005). On the other hand, we found that the analysis of luminescence ex vivo was a rapid and simple mean for measuring parasite burden in infected mice and was compatible with both lesion size measurements and in vivo bioimaging. The ex vivo method is relatively low-cost and can be performed in most laboratories if bioimaging equipment is unavailable.

As compared to the limiting dilution assay, the ex vivo quantification has the advantage of determining the number of parasites in the crude extract of lesion macerate, eliminating the washing steps, which avoids loss of parasites. Furthermore, limiting dilution will only detect amastigotes capable of transforming into promastigotes and surviving in culture in the presence of antibiotics. High concentrations of toxic products in necrotic tissues, frequently seen in leishmaniasis lesions, may impair the differentiation and growth of parasites when placed in culture. In contrast, ex vivo and in vivo LUC quantification derive from all parasites capable of expressing the *LUC* gene at that particular point in time.

Table 3

AmB half maximal effective dose (ED₅₀) in *L. (L.) amazonensis* infected mice as measured by different techniques.

Method	ED ₅₀ ^a	95% CI ^b
Lesion size	2.86	2.42–3.37
Ex vivo LUC quantification	2.43	1.82–3.25
In vivo LUC quantification	1.89	1.35–2.65
Limiting dilution	1.19	0.82–1.71
Ulcer size	0.61	0.35–1.05

^a ED₅₀ (mg/kg/day) was calculated based on parameters obtained four weeks after the interruption of treatment.

^b 95% CI: 95% confidence interval.

Ulcer size was the least reliable numerical parameter, as expected. Ulcer formation is a late effect of disease and results from a complex interplay among the parasite burden, the activated state of the immune system, and the repair system (Oliveira et al., 2011). Nevertheless, we consider ulcer size as a valid parameter to be used in qualitative terms rather than as a quantitation tool.

Only limited data regarding AmB ED₅₀ for *L. (L.) amazonensis* infection are available in the literature. In our model, even the highest AmB dose (4 mg/kg/day), did not lead to cure. Parasite load was only reduced and the treatment did not result in long-lasting resolution of the disease. Toxic effects limit the testing of higher doses.

To improve the management of leishmaniasis, new drugs or alternative therapeutic strategies are required. Combination therapy of antileishmanial drugs is currently considered as one of the most rational approaches to decrease treatment failure rates and limit the spread of drug resistance. Results presented herein will be useful in the design of in vivo drug combination experiments including AmB and may contribute to the study of new therapies for leishmaniasis using *LUC* expressing parasites.

In conclusion, the quantification of bioluminescence in vivo and ex vivo seems to be the most effective method for the determination of parasite burden to assess drug efficacy in infected mice. Furthermore, this approach is a reliable model to evaluate drug therapy at the ED₅₀ level.

Acknowledgment

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2011/20484-7) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The authors thank the FAPESP scholarship given to JQR (2011/21970-2) and to CMT (2011/18858-6). The authors also thank Thiago A. Souza and Susan I. Silva for the bioimaging technical assistance and Eliane M. Teixeira for scientific discussions.

References

- Al-Abdely, H.M., Graybill, J.R., Loebenberg, D., Melby, P.C., 1999. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2910–2914.
- Ashutosh, Gupta, S., Ramesh, Sundar, S., Goyal, N., 2005. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3776–3783.
- Coburn, C.M., Otteman, K.M., McNeely, T., Turco, S.J., Beverley, S.M., 1991. Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 169–179.
- Convit, J., Ulrich, M., Fernandez, C.T., Tapia, F.J., Caceres-Dittmar, G., Castes, M., Rondon, A.J., 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 444–448.
- Gupta, S., 2005. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J. Med. Res.* 133, 27–39.
- Jha, T.K., Giri, Y.N., Singh, T.K., Jha, S., 1995. Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 536–538.
- Kobets, T., Grekov, I., Lipoldova, M., 2012. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr. Med. Chem.* 19, 1443–1474.
- Kutzleb, R., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F., 1973. Extrachromosomal inheritance of paromomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetic and biochemical characterization of mutants. *Mol. Gen. Genet.* 125, 91–98.
- Lang, T., Goyard, S., Lebastard, M., Milon, G., 2005. 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.* 7, 383–392.
- Lecoeur, H., Buffet, P., Morizot, G., Goyard, S., Guigon, G., Milon, G., Lang, T., 2007. Optimization of topical therapy for *Leishmania major* localized cutaneous leishmaniasis using a reliable C57BL/6 Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e34.
- Lima, H.C., Bleyenbergh, J.A., Titus, R.G., 1997. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol. Today* 13, 80–82.
- Michel, G., Ferrua, B., Lang, T., Maddugoda, M.P., Munro, P., Pomares, C., Lemichez, E., Marty, P., 2011. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1323.
- Mullen, A.B., Carter, K.C., Baillie, A.J., 1997. Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2089–2092.
- Mullen, A.B., Baillie, A.J., Carter, K.C., 1998. Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: a comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2722–2725.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1666–1669.
- Oliveira, F., Bafica, A., Rosato, A.B., Favali, C.B., Costa, J.M., Cafe, V., Barral-Netto, M., Barral, A., 2011. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 70–73.
- Ploemen, I.H., Prudencio, M., Douradinha, B.G., Ramesar, J., Fonager, J., van Gemert, G.J., Luty, A.J., Hermesen, C.C., Sauerwein, R.W., Baptista, F.G., Mota, M.M., Waters, A.P., Que, I., Lowik, C.W., Khan, S.M., Janse, C.J., Franke-Fayard, B.M., 2009. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLoS One* 4, e7881.
- Ravinder, Bhaskar, Gangwar, S., Goyal, N., 2012. Development of luciferase expressing *Leishmania donovani* axenic amastigotes as primary model for in vitro screening of antileishmanial compounds. *Curr. Microbiol.* 65, 696–700.
- Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A.K., Tremblay, M.J., Ouellette, M., Olivier, M., Papadopoulos, B., 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 195–206.
- Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J.L., Papadopoulos, B., Ouellette, M., 2001. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1168–1173.
- Thalhofer, C.J., Graff, J.W., Love-Homan, L., Hickerson, S.M., Craft, N., Beverley, S.M., Wilson, M.E., 2010. In vivo imaging of transgenic *Leishmania* parasites in a live host. *J. Vis. Exp.* 41, 1980. <http://dx.doi.org/10.3791/1980>.
- Uliana, S.R., Goyal, N., Freymuller, E., Smith, D.F., 1999. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp. Parasitol.* 92, 183–191.
- Yardley, V., Croft, S.L., 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13, 243–248.
- Zamboni, D.S., Rabinovitch, M., 2003. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1225–1233.
- Zauli-Nascimento, R.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Pereira, L.I., Pelli de Oliveira, M.A., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M.L., Uliana, S.R., 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Health* 15, 68–76.
- Zerpa, O., Ulrich, M., Blanco, B., Polegre, M., Avila, A., Matos, N., Mendoza, I., Pratlong, F., Ravel, C., Convit, J., 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br. J. Dermatol.* 156, 1328–1335.

APÊNDICE B - Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in
experimental cutaneous leishmaniasis

Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis

Cristiana T. Trinconi, Juliana Q. Reimão, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, Danilo C. Miguel,* Silvia R. B. Uliana

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Leishmaniasis chemotherapy remains very challenging. The high cost of active drugs, along with the severity of their side effects and the increasing failure rate of the current therapeutic schemes, calls for the discovery of new active drugs and schemes of treatment. The use of combination therapy has gained much attention in recent years as a possible strategy for overcoming the various shortcomings in the present arsenal. We recently described the effectiveness of tamoxifen in murine models of leishmaniasis, and here, we investigated the interactions between tamoxifen and amphotericin B, one of the most potent drugs used in leishmaniasis treatment. The *in vitro* interactions were indifferent for the association of tamoxifen and amphotericin B. The association was also assayed *in vivo* in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice and was found to yield at least additive effects at low doses of both drugs.

Leishmaniasis affects 12 million people worldwide in 98 countries. Clinical presentations are highly variable, ranging from localized cutaneous lesions to severe diffuse tegumentary forms or to the life-threatening visceral form. The treatment of both cutaneous and visceral leishmaniasis depends heavily on expensive and toxic drugs, most of which have to be administered by the parenteral route. The first-line treatment is still based on pentavalent antimonials in many areas, but parasite resistance is now widespread in some regions of the Indian subcontinent. Evidence of decreased efficacy of antimonials in other regions of the world (1–3) and of geographical variations in parasite susceptibility to drugs is also emerging (4). In regions with a high incidence of antimonial resistance, amphotericin B and miltefosine became first-choice drugs, but there are also difficulties with these drugs, related to toxicity or to the possibility of selecting resistant strains (5).

Difficulties in treatment of the various clinical forms of leishmaniasis and the spread of resistance to drugs, mainly observed in areas where anthroponotic transmission is predominant, led to the present trend of utilizing combination therapy, as has been the case for many other infectious diseases. In leishmaniasis, this trend is justified because the available drugs belong to different chemical classes and are believed to have different targets on the parasite and combined therapy has the potential to reduce collateral effects and therefore increase treatment compliance. Furthermore, combination therapy may improve the efficacy of therapeutic schemes in patients with concomitant infections, as is the case in HIV-infected patients, who generally do not respond well to classical therapy.

Several combinations have been tried or are under trial in India and East Africa. For example, a shorter therapeutic scheme of combined sodium stibogluconate (SSG) and paromomycin has been tried in Africa and shown to be as effective as a longer scheme of SSG alone (6). A trial is under way in East Africa to determine the efficacy of miltefosine in combination with SSG and liposomal amphotericin B (7). However, there is concern about the emergence of resistance even for combination therapy (8), since it has been shown that stepwise *in vitro* selection is an efficient method to obtain resistant lines of *Leishmania donovani* against all drugs in use today, including

amphotericin B (9). Amphotericin B resistance has also been detected in clinical isolates (10).

Therefore, the search for new alternative drugs useful for treating leishmaniasis is still necessary. We have previously shown that the selective estrogen receptor modulator (SERM) tamoxifen is effective in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis in animal models (11, 12). Here we investigated the interactions of tamoxifen and amphotericin B, one of the drugs most widely used for the treatment of leishmaniasis.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and macrophages. *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) promastigotes were grown in M-199 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES (pH 6.9), 12 mM NaHCO₃, 7.6 mM hemin, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin at 25°C. Promastigotes of a *L. amazonensis* transgenic line expressing luciferase (La-LUC) (13) were grown in the same medium supplemented with 32 µg/ml G418 and incubated at 25°C. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from BALB/c mice as described previously (14).

Drugs. Amphotericin B deoxycholate was a gift from Cristália (São Paulo, Brazil). Tamoxifen and tamoxifen citrate were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of amphotericin B (10 mM) were prepared in sterile water and kept at –20°C. Tamoxifen stock solutions (10 mM) were prepared in ethanol. Dilutions from the stock solutions were done in culture media. For *in vivo* experiments, stock solutions of tamoxifen citrate and amphotericin B were prepared in saline every day.

Evaluation of *in vitro* antileishmanial activity. Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 2×10^6 /well in a final volume of 200 µl. The plates were incubated for 24 h at 25°C, and the

Received 20 June 2013 Returned for modification 3 November 2013

Accepted 10 February 2014

Published ahead of print 18 February 2014

Address correspondence to Silvia R. B. Uliana, srbulian@icb.usp.br.

* Present address: Danilo C. Miguel, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01315-13

viability of promastigotes was verified by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay (15). Data analysis and 50% effective concentration (EC₅₀) determinations were performed with Graph-Pad Prism 5.0 software.

For assays with intracellular amastigotes, macrophages were seeded in 96-well plates (8×10^4 macrophages per well) containing RPMI 1640 medium with 10% FCS and allowed to adhere overnight at 37°C and 5% CO₂. Infections were initiated by adding La-LUC stationary-phase promastigotes at a ratio of 20 promastigotes per macrophage. Infected macrophage cultures were kept at 33°C and 5% CO₂ for 3 h in RPMI 1640 medium with 10% FCS and then were washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS) to remove free promastigotes. Infected BMDM were treated for 48 h. Enzyme detection was performed with the One-Glo luciferase assay system (Promega Corporation) according to the manufacturer's instructions. Briefly, medium was removed without disturbing the adherent cells and replaced by 100 μ l of PBS. To each well, 20 μ l of One-Glo reagent was added at room temperature followed by homogenization by pipetting the mixture up and down six times. Luminescence units were determined immediately after adding the substrate in a POLARstar Omega reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The luminescence reading from treated wells was used to calculate sigmoidal regression curves using untreated infected macrophages as a control.

Determination of drug interactions. The interactions between drugs were evaluated *in vitro* by a modified isobologram method (16, 17). EC₅₀s were used to determine the maximum concentrations of individual drugs, ensuring that the EC₅₀ was at the midpoint of the serial dilution. The highest concentrations of solutions were prepared in proportions of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, and 0:5 of tamoxifen and amphotericin B, respectively, which were serially diluted (base 2) to the seventh well of the microplate in triplicate. Sigmoidal regression curves were used to determine the EC₅₀ as described above. For each ratio, an EC₅₀ was calculated for each of the drugs. Two or three independent experiments were performed for each drug combination and susceptibility assay.

Determination of FIC index and isobologram construction. Fractional inhibitory concentrations (FICs) at the EC₅₀ were calculated as [EC₅₀ when in combination]/[EC₅₀ of drug alone]. The sum of the FICs (Σ FIC) was calculated with the equation Σ FIC = FIC drug A + FIC drug B (17). The mean sum of the FICs ($x\Sigma$ FIC) was calculated as the average of the Σ FICs. Isobolograms were built by plotting the FIC for each drug ratio. The Σ FIC was used to classify the interaction as recommended by Odds (18). Interactions were considered synergic for an $x\Sigma$ FIC of ≤ 0.5 , indifferent with an $x\Sigma$ FIC between 0.5 and ≤ 4 , and antagonistic for an $x\Sigma$ FIC of > 4 .

Evaluation of drug interactions *in vivo*. Animal experiments were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (protocol 178/2012). Female BALB/c mice (4 to 5 weeks old) were inoculated with 1×10^6 stationary-phase La-LUC promastigotes at the base of the tail. Five weeks after infection, mice were randomly assigned to experimental groups ($n = 6$). Doses used *in vivo* were 6.5 or 26 mg/kg of body weight/day tamoxifen and 1.2 or 4 mg/kg/day amphotericin B. Combinations were tested using a low-dose scheme (1.2 mg/kg/day amphotericin B plus 6.5 mg/kg/day tamoxifen) and a high-dose scheme (4 mg/kg/day amphotericin B plus 26 mg/kg/day tamoxifen). Treated groups received intraperitoneal injections containing the drugs in a 200- μ l final volume. All animals received 20 doses of the assigned scheme, given on weekdays.

Disease progression was evaluated once a week by recording the average diameter of the tail measured as the mean of tail base diameters in horizontal and vertical directions. Measurements were taken with a caliper (Mitutoyo Corp., Japan). The treatment outcome was evaluated at the end of the treatment (9 weeks postinfection) through luciferase detection by bioimaging (IVIS Spectrum; Caliper Life Sciences, Inc., MA) as described previously (13). Briefly, prior to imaging, mice received 75 mg/kg luciferin (VivoGlo Luciferin; Promega) intraperitoneally. Imaging was

FIG 1 EC₅₀ for *L. amazonensis* intracellular amastigotes. Infected BMDM were treated with tamoxifen (A) or amphotericin B (B) for 48 h at 33°C. The numbers of amastigotes were determined by luciferase quantification. Relative light units for control untreated cells were considered 100%. Values shown are the means and standard deviations of triplicates from one experiment representative of at least three independent experiments. The EC₅₀s and 95% confidence intervals are indicated in the upper right corners.

performed 20 min later, through the high-resolution mode from a fixed-size region of interest. Results were quantified with Living Image software, version 4.3.1 (Caliper Life Sciences, Inc.), and results are expressed as the number of photons/s/cm².

Statistical analysis. Data were analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Fisher posttest. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

RESULTS

***In vitro* associations of amphotericin B and tamoxifen.** Wild-type or luciferase-expressing parasites were used to determine the EC₅₀s against *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, respectively. The transgenic parasites express luciferase constitutively and show the same infectivity *in vitro* and *in vivo* as well as susceptibility to drugs as the parental line (13). Tamoxifen EC₅₀s against promastigotes and amastigotes were 13.3 and 4.5 μ M, respectively. Amphotericin B EC₅₀s were determined to be 118.5 and 63.5 nM for promastigotes and amastigotes, respectively (Fig. 1 and data not shown).

The associations between tamoxifen and amphotericin B against *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes were evaluated using the fixed-ratio isobologram method (16, 17). This experimental setup allowed the determination of FIC values for each combination (Table 1). The $x\Sigma$ FICs for all combinations were calculated as 1.23 when tested against promastigotes and 0.74 against intracellular amastigotes. Accord-

TABLE 1 EC₅₀s and FICs of tamoxifen-amphotericin B combinations against *L. amazonensis*

Form	Combination ratio (%) ^a		EC ₅₀ (95% CI) of ^b :		FIC of ^c :		ΣFIC ^d
	Tam	AmB	Tam (μM)	AmB (nM)	Tam	AmB	
Promastigotes ^e	100	0	13.3 (12.6–14.1)				
	80	20	13.2 (12.5–13.9)	23.6 (22.5–24.7)	0.99	0.20	1.19
	60	40	11.2 (10.4–12.1)	53.0 (50.0–56.2)	0.84	0.45	1.29
	40	60	7.7 (6.8–8.7)	82.7 (75.1–91.0)	0.58	0.70	1.28
	20	80	3.7 (3.1–4.3)	105.9 (91.6–122.5)	0.27	0.90	1.17
	0	100		118.5 (111.3–126.2)			
Intracellular amastigotes ^f	100	0	4.5 (4.0–5.1)				
	80	20	2.6 (2.1–3.3)	2.2 (1.7–2.8)	0.57	0.04	0.61
	60	40	1.7 (1.4–1.9)	11.7 (10.0–13.8)	0.37	0.20	0.57
	40	60	0.8 (0.7–1.0)	36.7 (29.6–45.6)	0.18	0.63	0.81
	20	80	0.1 (0.1–0.2)	55.3 (49.6–61.8)	0.03	0.95	0.98
	0	100		63.5 (57.6–70.0)			

^a Tam, tamoxifen; AmB, amphotericin B.^b CI, confidence interval.^c FIC, fractional inhibitory concentration at the indicated EC₅₀.^d ΣFIC, sum of FICs.^e *In vitro* activities of tamoxifen and amphotericin B against promastigotes was determined by the MTT assay.^f Activity against intracellular amastigotes was determined in infected macrophages by luminescence.

ing to Odds (18), this indicates an indifferent interaction. This observation was confirmed by plotting the individual FICs in isobolograms (Fig. 2), where all points are close to the additivity line.

Tamoxifen in combination with amphotericin B *in vivo*. The *L. amazonensis*-infected BALB/c mouse was the experimental model employed for *in vivo* efficacy studies. The half-maximal effective dose (ED₅₀) was initially determined for each of the drugs given alone. Tamoxifen and amphotericin B ED₅₀s were determined to be 13.2 mg/kg/day (95% confidence interval, 12.2 to 15.2 mg/kg/day) and 2.2 mg/kg/day (95% confidence interval, 1.1 to 4.4 mg/kg/day), respectively (reference 13 and data not shown).

The therapeutic efficacy of the association was evaluated by comparing animals treated with doses close to the maximal tolerated doses of tamoxifen and amphotericin B in this model (26 mg/kg/day and 4 mg/kg/day, respectively) with those treated with the association scheme employing half of the calculated ED₅₀ for each drug (6.5 mg/kg/day tamoxifen and 1.2 mg/kg/day amphotericin B).

Representative animals from each group are shown in Fig. 3, together with the parasite burden determination through luciferase quantification. The mean sizes of the lesions in groups treated with the combination schemes were reduced compared with the sizes of lesions in animals treated with each of the drugs alone (Fig. 4A). As for the parasite burden evaluated through luciferase quantification, a significant reduction was observed in the group treated with the combined low-dose scheme compared with that in the amphotericin B alone or untreated group (Fig. 4B). The data clearly show that the association of 1.2 mg/kg/day amphotericin B and 6.5 mg/kg/day tamoxifen produced an improved outcome compared with that for tamoxifen or amphotericin B given alone at the same doses.

For groups treated with amphotericin B and tamoxifen at the highest dose, combined therapy produced better clinical outcomes than those for the untreated or treated with each drug alone groups. The parasite burden for the combination treatment at

FIG 2 Isobolograms representing *in vitro* interactions between tamoxifen and amphotericin B against *L. amazonensis* promastigotes (A) and intracellular amastigotes (B). Assays were performed by a fixed-ratio method based on the EC₅₀s, with the combinations being tested at constant ratios of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, and 0:5. Results shown are from one experiment performed in triplicate, representative of at least two independent experiments. Plots were compared to a theoretical line that produced a sum of the FICs of 1 at all ratios tested (dashed line), which represents an additive effect of both compounds. The mean sum of the FICs (xΣFIC) for all interactions tested is shown at the upper right corner.

FIG 3 *In vivo* evaluation of parasite burden after combined therapy with tamoxifen and amphotericin B. Treatment was initiated 5 weeks postinfection. Images were collected after the end of treatment at 9 weeks postinfection. Images are of representative animals treated with tamoxifen and amphotericin B (alone or in association). The bar on the right shows a pseudo-color scale representing light intensities. NT, untreated; Tam6.5, Tam26, treated with 6.5 or 26 mg/kg/day tamoxifen alone; AmB1.2, AmB4, treated with 1.2 or 4 mg/kg/day amphotericin B alone; Tam+AmB, treated with combinations of the two drugs in the doses indicated.

high doses was not significantly different from that for the groups treated with single drugs at the same doses (Fig. 4).

DISCUSSION

Combination therapy has been advocated for the treatment of several infectious diseases such as malaria, tuberculosis, AIDS, and, more recently, leishmaniasis. The combination approach may increase effectiveness, especially in immunocompromised patients (19), and may reduce the length of treatment and administered doses. Consequently, the undesirable effects and costs are decreased. Combination therapy is also important in delaying the selection of resistant parasites (20).

Tamoxifen is a SERM that has been in use as a therapeutic and prophylactic agent in breast cancer therapy for decades. Tamoxifen has also been studied as an alternative treatment in other conditions such as retroperitoneal fibrosis (21) and bipolar disease (22, 23). It is a low-cost orally administered drug with a good safety profile, especially in short-term therapeutic schemes, such as the ones proposed in the treatment of bipolar disorder. We previously described the effectiveness of tamoxifen given for 15 to 20 days in the treatment of established cutaneous and visceral leishmaniasis in animal models (11, 12). The work described herein was performed to investigate whether tamoxifen would be a good partner in combination therapy. We chose to test tamoxifen in combination with amphotericin B, one of the most widely used drugs in leishmaniasis treatment nowadays. Amphotericin B is effective, especially for visceral leishmaniasis, but toxicity is considerable (24). The selection of amphotericin B-resistant strains was considered unlikely until recently when some reports suggested that it was possible (9, 10).

In vitro interactions between tamoxifen and amphotericin B, studied through fixed-ratio dilutions and isobologram analysis, were shown to be indifferent or additive. Parameters for the anal-

FIG 4 Combined therapy with tamoxifen and amphotericin B. Evaluation of lesion size (A) and parasite burden (B) in mice ($n = 6$) treated with tamoxifen (6.5 or 26 mg/kg/day) and/or amphotericin B (1.2 or 4 mg/kg/day) at the end of treatment. NT, untreated; Tam6.5, Tam26, treated with 6.5 or 26 mg/kg/day tamoxifen alone; AmB1.2, AmB4, treated with 1.2 or 4 mg/kg/day amphotericin B alone; Tam+AmB, treated with combinations of the two drugs in the doses indicated; Ph/sec/cm², photons per second per square centimeter. *, $P < 0.05$ versus the untreated group and versus amphotericin B 1.2 mg/kg/day; •, $P < 0.05$ versus tamoxifen 6.5 mg/kg/day.

ysis and classification of drug interaction profiles *in vivo* are less clear-cut than those for *in vitro* studies. *In vivo* synergism has been suggested to occur when the effect of the drug combination is significantly more pronounced than the sum of the effects of each agent alone (25). In an attempt to quantify *in vivo* the effects of combining tamoxifen and amphotericin B, we calculated the percentages of reduction in lesion size and parasite burden for each treated group compared with those for the untreated controls. While the lesion size was reduced by 25% in the 6.5 mg/kg/day tamoxifen group and by 0% in the 1.2 mg/kg/day amphotericin B group, there was a 55% reduction in the group assigned to low-dose combined therapy. When parasite burdens were considered, there was a 36% reduction in the 6.5 mg/kg/day tamoxifen group and an increase in the 1.2 mg/kg/day amphotericin B group, while a 75% reduction was noted in the group treated with the low-dose combined scheme. Therefore, in both cases, the effect of combined therapy was superior to the sum of effects of the individual drugs, suggesting that tamoxifen and amphotericin B have additive and possibly synergistic behavior *in vivo*.

A potential lack of correlation between *in vitro* (additive) and *in vivo* (additive/synergistic) interaction profiles is not unexpected since several factors come into play *in vivo* that cannot have an effect *in vitro*, such as pharmacokinetics, metabolism, distribution, and a possible role of the immune system in controlling the infection.

In mice, the elimination half-life of micellar amphotericin B is 89 min (26), while the rate of elimination from serum following a single dose of tamoxifen in mice is 11.9 h (27). Tamoxifen is rapidly metabolized into *N*-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen, both of which are active and have plasma half-lives of 9.6 and 6.0 h, respectively. The different rates of elimination may provide an extended effect for the combination scheme.

Another factor that needs to be taken into account is the mechanism of action. It is generally accepted that amphotericin B interacts with membrane sterols and with higher affinity with ergosterol, which is abundant in parasite membranes (28). That results in membrane disorganization, possibly through pore formation (28, 29). Amphotericin B also leads to lipid peroxidation and generation of free radicals (30–32).

Tamoxifen's mechanism of action against *Leishmania* is still unclear, but in mammalian cells this highly lipophilic molecule interacts with the membrane lipids (33). Therefore, altered membrane physiology might extend the lesions caused by amphotericin B. On the other hand, tamoxifen has been shown to prevent lipid peroxidation (34) and to behave as an antioxidant (35, 36), which might reduce the adverse effects of amphotericin B.

In conclusion, the data presented herein indicate clearly that tamoxifen does not hinder amphotericin B activity and that lower doses of the two drugs combined result in good clinical and parasitological responses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CEFAP-ICB for making the bioimaging equipment available.

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grant 2011/20484-7), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 473343/2012-6), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). C.T.T. is supported by the FAPESP (fellowship 2011/18858-6).

REFERENCES

- Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. 2007. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195:1846–1851. <http://dx.doi.org/10.1086/518041>.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, Da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. 2011. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84:255–260. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0155>.
- Neves LO, Talhari A, Gadelha EP, Silva Junior RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol.* 86:1092–1101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005>.
- Hailu A, Musa A, Wasunna M, Balasegaram M, Yifru S, Mengistu G, Hurissa Z, Hailu W, Weldegebreal T, Tesfaye S, Makonnen E, Khalil E, Ahmed O, Fadlalla A, El-Hassan A, Raheem M, Mueller M, Koummuki Y, Rashid J, Mbui J, Mucee G, Njoroge S, Manduku V, Musibi A, Mutuma G, Kirui F, Lodenyo H, Mutea D, Kirigi G, Edwards T, Smith P, Muthami L, Royce C, Ellis S, Alobo M, Omollo R, Kesusu J, Owiti R, Kinuthia J. 2010. Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e709. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000709>.
- Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, Stark O, Prajapati VK, Ramesh V, Sundar S, Schonian G, Dujardin JC, Salotra P. 2012. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1657. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001657>.
- Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R, Edwards T, Rashid J, Mbui J, Musa B, Abuzaid AA, Ahmed O, Fadlalla A, El-Hassan A, Mueller M, Mucee G, Njoroge S, Manduku V, Mutuma G, Apadet L, Lodenyo H, Mutea D, Kirigi G, Yifru S, Mengistu G, Hurissa Z, Hailu W, Weldegebreal T, Tafes H, Mekonnen Y, Makonnen E, Ndegwa S, Sagaki P, Kimutai R, Kesusu J, Owiti R, Ellis S, Wasunna M. 2012. Sodium stibogluconate (SSG) and paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1674. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001674>.
- Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EA, Younis BM, Abuzaid AA, Wasunna M, Njoroge N, Kinoti D, Kirigi G, Dorlo TP, Ellis S, Balasegaram M, Musa AM. 2011. 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* 12:166. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6215-12-166>.
- García-Hernández R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. 2012. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1974. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001974>.
- Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M. 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:352–357.
- Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P. 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1031–1041. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00030-11>.
- Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. 2008. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2:e249. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000249>.
- Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbieri CL, Uliana SR. 2009. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:365–368. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn509>.
- Reimão JQ, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Kalil SP, Uliana SR. 2013. Parasite burden in *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *J. Microbiol. Methods* 93:95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.02.007>.
- Zamboni DS, Rabinovitch M. 2003. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* 71:1225–1233. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.3.1225-1233.2003>.
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. 2010. In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Health* 15:68–76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02414.x>.
- Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4097–4102. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004>.
- Seifert K, Croft SL. 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:73–79. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.1.73-79.2006>.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:1. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg301>.

19. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:334–359. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00061-07>.
20. Olliaro PL. 2010. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23:595–602. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833fca9d>.
21. van Bommel EF, Pelkmans LG, van Damme H, Hendriksz TR. 2013. Long-term safety and efficacy of a tamoxifen-based treatment strategy for idiopathic retroperitoneal fibrosis. *Eur. J. Intern. Med.* 24:444–450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2012.11.010>.
22. Yildiz A, Vieta E, Leucht S, Baldessarini RJ. 2011. Efficacy of antimanic treatments: meta-analysis of randomized, controlled trials. *Neuropsychopharmacology* 36:375–389. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.192>.
23. Yildiz A, Guleryuz S, Ankerst DP, Ongur D, Renshaw PF. 2008. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. *Arch. Gen. Psychiatry* 65:255–263. <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.43>.
24. Alvar J, Croft S, Olliaro P. 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 61:223–274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61006-8).
25. Fantin B, Carbon C. 1992. *In vivo* antibiotic synergism: contribution of animal models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:907–912. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.36.5.907>.
26. Falk R, Grunwald J, Hoffman A, Domb AJ, Polacheck I. 2004. Distribution of amphotericin B-arabinogalactan conjugate in mouse tissue and its therapeutic efficacy against murine aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3606–3609. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.9.3606-3609.2004>.
27. Robinson SP, Langan-Fahey SM, Johnson DA, Jordan VC. 1991. Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab. Dispos.* 19:36–43.
28. Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. 1986. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19:195–200. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90001-0](http://dx.doi.org/10.1016/0166-6851(86)90001-0).
29. Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. 1996. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J. Membr. Biol.* 152:65–75. <http://dx.doi.org/10.1007/s002329900086>.
30. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:183–188. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.34.2.183>.
31. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 154:76–83. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/154.1.76>.
32. Lamy-Freund MT, Ferreira VF, Schreier S. 1985. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* 38:753–757.
33. Custódio JB, Almeida LM, Madeira VM. 1993. The active metabolite hydroxytamoxifen of the anticancer drug tamoxifen induces structural changes in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1153:308–314. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90420-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(93)90420-5).
34. Wiseman H, Laughton MJ, Arnstein HR, Cannon M, Halliwell B. 1990. The antioxidant action of tamoxifen and its metabolites. Inhibition of lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 263:192–194.
35. Custódio JB, Dinis TC, Almeida LM, Madeira VM. 1994. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxyl radical scavenging activity. *Biochem. Pharmacol.* 47:1989–1998.
36. Thangaraju M, Vijayalakshmi T, Sachdanandam P. 1994. Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative system in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer* 74:78–82. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(19940701\)74:1<78::AID-CNCR2820740114>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(19940701)74:1<78::AID-CNCR2820740114>3.0.CO;2-L).

APÊNDICE C - Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *L. amazonensis*

Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *L. amazonensis*

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Trinconi, Cristiana; Universidade de Sao Paulo, Parasitology Reimão, Juliana; Adolfo Lutz Institute, Parasitology Coelho, Adriano; Universidade de São Paulo, Parasitologia Uliana, Silvia; Universidade de São Paulo, Parasitologia
Keywords:	Leishmaniasis, Drug resistance, Combination treatment

SCHOLARONE™
 Manuscripts

1 **Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous**
2 **leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis***

3
4
5 Cristiana T. Trinconi, Juliana Q. Reimão, Adriano C. Coelho, Silvia R. B. Uliana[#]

6
7 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São
8 Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo, Brazil

9
10 [#]Corresponding author: Tel: +55-11-30917334; Fax: +55-11-30917417; E-mail:
11 srbulian@icb.usp.br

12
13 **Running title:** Combined therapy with tamoxifen and miltefosine

14
15 **Keywords:** cutaneous leishmaniasis, tamoxifen; miltefosine; drug resistance; combined
16 therapy; luciferase.

17

18 Synopsis

19 **Objectives:** The aim of this study was to characterize *in vitro* interactions and evaluate
20 the antileishmanial activity of tamoxifen and miltefosine combinations.

21 **Methods:** Interactions between drugs were evaluated *in vitro* against *Leishmania*.
22 *amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes by a modified isobologram
23 method. Four different drug ratios were used to calculate the fractional inhibitory
24 concentration index (FICI) and the mean sum of FICI. Treatment of *L. amazonensis*
25 infected BALB/c mice was initiated four weeks post-infection. Mice were treated with
26 the ED₅₀ or half the ED₅₀ of tamoxifen and miltefosine orally for 15 days. Efficacy was
27 evaluated by lesion growth and parasite burden measured through luciferase detection at
28 the end of treatment and 30 days later. Characterization of growth curves and stepwise
29 increase of drug concentrations *in vitro* were used to measure survival and resistance
30 selection of parasite populations submitted to combination treatment.

31 **Results:** *In vitro* interactions between tamoxifen and miltefosine were shown to be
32 indifferent. In infected mice, the combination of tamoxifen and miltefosine at doses
33 corresponding to half the ED₅₀ was more effective than monotherapy with either
34 tamoxifen or miltefosine. When the ED₅₀ was employed, the efficacy of the
35 combination was equivalent to miltefosine monotherapy. *In vitro*, tamoxifen was able to
36 retard or suppress the growth of parasites treated with miltefosine.

37 **Conclusions:** *In vitro* and *in vivo* studies revealed an indifferent pattern of interaction
38 between tamoxifen and miltefosine. Tamoxifen was able to hinder the emergence of
39 miltefosine resistance.

40

Introduction

Leishmaniasis is a neglected disease caused by more than 20 species of protozoan parasites of the *Leishmania* genus. This infection causes a complex of diseases with clinical manifestations ranging from localized cutaneous lesions to severe diffuse tegumentary forms or to the fatal visceral disease in untreated patients. About 12 million people are infected worldwide in a widespread geographic distribution that places 350 million people at the risk of acquiring this parasitic infection.^{1,2}

Treatment of leishmaniasis relies on a limited drug arsenal with substantial limitations on efficacy, tolerability, cost and more recently, problems derived from the emergence of parasite resistance. Miltefosine, an alkyl phospholipid, has recently emerged as an effective drug against visceral leishmaniasis^{3,4} and was incorporated into the therapeutic routine in South Asia (India, Nepal and Bangladesh). However, treatment failures have been reported, at alarming rates in some instances.⁵ Altered susceptibility of parasites after treatment with miltefosine was found in some instances of drug failure⁶ but not in others.^{5,7} On the other hand, selection of miltefosine resistance *in vitro* is easily achieved.⁸⁻¹¹

According to the World Health Organization (WHO), strategies to improve leishmaniasis therapy include the search for new drugs, repurposing of existing drugs and combination therapy.¹² Combination therapy is employed extensively for other infectious diseases, such as malaria, AIDS and tuberculosis¹³⁻¹⁵ and the need to consider drug combinations in antileishmanial therapy has been pointed out by several authors.¹⁶⁻¹⁸

The interactions of miltefosine with other standard anti-leishmanial drugs have been investigated *in vitro* and *in vivo*^{19,20} and are under testing in clinical trials.²¹⁻²³

In this context, tamoxifen, an antitumoral oral compound, was recently proposed as a potential drug candidate for visceral and cutaneous leishmaniasis chemotherapy.^{24,25} In an experimental model of extreme susceptibility, represented by the infection of BALB/c mice with *L. amazonensis*, tamoxifen given for 15 days at doses of 20 mg/kg resulted in significant decrease in lesion size and parasite burden.²⁴ Moreover, multiple attempts of generating tamoxifen-resistant *L. amazonensis in vitro* and *in vivo* upon drug selection were unsuccessful indicating that the drug's mode of action probably involves multiple targets.²⁶

Considering the present risks for selecting miltefosine resistance in the field, we decided to characterize the properties of the association of tamoxifen and miltefosine. Therefore, the aim of this work was to investigate the efficacy of the combination of miltefosine and tamoxifen against *L. amazonensis*, *in vitro* and in infected mice.

Materials and Methods

Parasites and macrophages

Promastigotes of a *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) transgenic line expressing luciferase (La-LUC)²⁷ were grown in M-199 medium supplemented with 10% heat-fetal calf serum (FCS, Gibco™, Invitrogen Corporation), 25 mM HEPES (pH 6.9), 12 mM NaHCO₃, 7.6 mM hemin, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 32 µg/mL G418 at 25 °C. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were obtained from BALB/c mice as described.²⁷

Drugs

Tamoxifen, tamoxifen citrate and miltefosine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tamoxifen and miltefosine stock solutions (10 mM) were prepared in ethanol and sterile water, respectively, and subsequent dilutions were done in culture media. Stock solutions were kept at -20 °C. For *in vivo* experiments, stock solutions of miltefosine were prepared in sterile water, while tamoxifen citrate was diluted in 45% Cremophor® A25 (Sigma-Aldrich) solution as vehicle. Both drugs were prepared daily immediately before the treatment.

Evaluation of in vitro antileishmanial activity

To determine the half maximal effective concentration 50% (EC₅₀) in *L. amazonensis* promastigotes, cells were plated in 96-well plates (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA) in a density of 2×10⁷/mL (final volume of 200 µL) and incubated in the presence of increasing concentrations of miltefosine (from 3.75 to 44 µM) or tamoxifen (from 3.4 to 27 µM) for 24 hours at 25 °C. The viability of promastigotes was verified by the MTT assay as previously described.²⁸ Data analysis and calculation of EC₅₀ was performed with Graph Pad Prism 5.0 software.

For assays with intracellular amastigotes, bone marrow derived macrophages were distributed in 96-wells plates (Costar®) at 8×10^4 macrophages per well. The cells were incubated for 24 hours at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Thereafter, macrophages were infected with La-LUC stationary phase promastigotes in a ratio of 20:1 promastigotes per macrophage. Infected macrophage cultures were kept at 33 °C in the presence of 5% CO₂ for 3 h in RPMI 1640 medium containing 10% FCS and then washed twice with sterile PBS to remove free promastigotes. Treatment of infected bone marrow derived macrophages was performed for 48 hours with different concentrations of tamoxifen (from 1.5 to 12 µM) and/or miltefosine (from 1.9 to 15 µM). At the end of the experiment, quantification of macrophage infection was performed with the One-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation), according to the manufacturer's instructions. Briefly, in each well the medium was replaced by 100 µL of PBS plus 20 µL of OneGlo reagent at room temperature followed by homogenization. Luminescence was evaluated in a microplate reader (Polarstar Omega, BMG Labtech). The luminescence reading from treated wells was used to calculate sigmoidal regression curves using untreated infected macrophages as controls. Experiments were performed in triplicate.

Determination of drug interactions

The interactions between drugs were evaluated *in vitro* by a modified isobologram method.^{19,29} Top concentrations of individual drugs were determined assuring that the EC₅₀ was at the serial dilution midpoint. Top concentrations were prepared in proportions of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 of tamoxifen and miltefosine, respectively, followed by serial dilutions (base 2) until the seventh well of the microplate. For each ratio, an EC₅₀ was calculated for each of the drugs. Two independent experiments in triplicate were performed for each drug combination and susceptibility assay.

Determination of FIC index and isobologram construction

Fractional inhibitory concentration index (FICI) at the EC₅₀ were calculated as the [EC₅₀ when in combination]/[EC₅₀ of drug alone]. The sum of FICI ($\sum$ FICI) was calculated as $\sum$ FICIs = FICI drug A + FICI drug B.¹⁹ The mean sum of FICI ($\bar{x}\sum$ FICI) was calculated as the average of $\sum$ FICI. Isobolograms were built plotting the FICI for each drug ratio. The $\sum$ FICI was used to classify the interaction as recommended by Odds.³⁰ Interactions

were considered synergic for $x\Sigma\text{FICI} \leq 0.5$, indifferent when $0.5 > x\Sigma\text{FICI} \leq 4$ and antagonic if $x\Sigma\text{FICI} > 4$.

Evaluation of drug interactions in vivo

In vivo experiments were performed in BALB/c mice (4–5 week-old) inoculated with 1×10^6 stationary-phase La-LUC promastigotes at the base of the tail (final volume: 30 μL). Four weeks after infection, when the lesion was already established, mice were assigned into experimental groups of 5 to 6 animals according to the lesion size. Animals received treatment by oral gavage in 100 μL final volume during 15 consecutive days. Tamoxifen was given as 6.5 or 13 mg/kg/day and miltefosine at 2 or 4 mg/kg/day. These doses correspond approximately to half of the ED_{50} and to the ED_{50} for each drug, respectively. Miltefosine was also used at doses of 13 mg/kg/day in dose-finding studies. Combination schemes were given as an ED_{50} -dose scheme (4 mg/kg/day miltefosine plus 13 mg/kg/day tamoxifen) and 0.5ED_{50} -dose scheme (2 mg/kg/day miltefosine plus 6.5 mg/kg/day tamoxifen). Animals were also treated with the vehicle used to dissolve tamoxifen citrate. Treatment outcome was determined through lesion growth and parasite burden at the end of treatment and 30 days after the end of treatment. Lesion growth was expressed as the mean of the tail base diameters in horizontal and vertical directions minus the tail measurement value obtained one day before the initiation of treatment (d-1). Measurements were obtained using a caliper (Mitutoyo Corp., Japan). Parasite load was determined through luciferase detection by bioimaging (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences, Inc. MA/USA) as described.²⁷ Briefly, bioimaging was obtained 20 min after luciferin intraperitoneal administration (75 mg/kg of VivoGloTM Luciferin, Promega). Images were taken through high-resolution mode with 2 minutes of time exposure from a fixed-size region of interest. Results were analyzed in a Living Image software version 4.3.1 (Caliper Life Sciences, Inc. MA/USA) and expressed as the number of photons/second/ cm^2 /steradian.

L. amazonensis growth curve in the presence of tamoxifen and/or miltefosine

L. amazonensis promastigotes at late logarithmic phase were seeded in medium 199 at a concentration of 2×10^5 cells/mL. Cells were incubated with 7 or 14 μM tamoxifen and 18 or 24 μM miltefosine, or with the combinations of the two drugs. The number of

170 promastigotes was determined daily by microscopic counting in a Neubauer
171 hemocytometer.

172

173 ***Miltefosine resistance selection in combination with tamoxifen***

174 Selection of resistant parasites was performed using a stepwise selection as previously
175 reported.⁹ For stepwise selection with miltefosine, drug concentrations applied to *L.*
176 *amazonensis* promastigotes were 20 μ M followed by 40 and 80 μ M. The combined
177 stepwise selection was performed in the presence of 2, 4, 6, 8, or 14 μ M as fixed
178 concentrations of tamoxifen and varying the concentration of miltefosine. Selection was
179 performed with at least three successive passages for each dose in combination or not.
180 At each step, miltefosine's and tamoxifen's EC₅₀ for the selected parasites were
181 determined.

182

183 ***Ethics statement***

184 Animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal
185 Experimentation (Protocol: 178/138/02) in agreement with the guidelines of the
186 Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) and of the
187 Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

188

189 ***Statistical analysis***

190 Data were analyzed for statistical significance by One-way ANOVA, followed by the
191 Tukey post-test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

192

193 **Results**

194 ***Interaction between tamoxifen and miltefosine in vitro***

195 To evaluate the behavior of the association of tamoxifen and miltefosine, we
196 first established the EC₅₀ for each drug against the *L. amazonensis* line expressing
197 luciferase (La-LUC), to confirm that the drug susceptibility was unchanged as compared
198 with the parental line. The EC₅₀ of tamoxifen was calculated as 13.51 ± 0.10 and $4.25 \pm$
199 0.80 μ M (Table 1) for promastigotes and amastigotes respectively. Miltefosine's EC₅₀
200 was determined as 16.82 ± 1.74 and 2.61 ± 0.30 μ M for promastigotes and amastigotes
201 respectively (Table 1). For both drugs, EC₅₀ values were in accordance with previously
202 published data for the wild type parasite and for La-LUC.^{9,31} Tamoxifen and miltefosine

were combined in four different ratios (4:1, 3:2, 2:3 and 1:4). The EC_{50} values obtained for each drug ratio were used to calculate the FICIs and $\Sigma FICI$ as shown in Table 1. For promastigotes and intracellular amastigotes, $\bar{x}\Sigma FICI$ was calculated as 1.32 and 0.63 respectively (Table 1). According to Odds³⁰, these values are indicative of indifferent interactions. The isobolograms representing tamoxifen and miltefosine interactions when used against promastigotes and amastigotes are shown in Figure 1.

Figure 1. *In vitro* drug interactions between tamoxifen and miltefosine. Drug activity was measured against *L. amazonensis* promastigotes (A) and intracellular amastigotes (B). Isobolograms represent activity at the EC_{50} s. Results shown are from one experiment performed in triplicates, representative of at least two independent experiments. Plots were compared to a theoretical line that produced a sum of the FICIs of one at all ratios tested (dashed line), which represents an indifferent/additive interaction. The mean sum of FICI ($\bar{x}\Sigma FICI$) for all interactions tested is shown at the upper right corner.

Combination of tamoxifen and miltefosine in vivo

The *in vivo* drug combination assay was performed in a BALB/c mice experimental model of infection with La-LUC. Tamoxifen's ED_{50} was previously determined in this model as 13.2 mg/kg/day.³¹ Miltefosine was shown to be effective for the treatment of *L. amazonensis* infections in BALB/c mice when used at 13 mg/kg/day for 15 days.⁹ To determine the dose-response curve for miltefosine in this model, mice were treated with 2, 4 and 13 mg/kg/day and the ED_{50} was calculated as 3.5 mg/kg/day (Fig. 2).

Figure 2. Miltefosine’s ED₅₀ in a cutaneous leishmaniasis animal model. BALB/c mice were infected with 1×10^6 promastigotes of *L. amazonensis* at the base of the tail. Starting four weeks post-infection, animals were treated with 2, 4 and 13 mg/kg/day of miltefosine during 15 consecutive days by oral gavage. To determine the ED₅₀ of miltefosine, normalized lesion growth at the end of treatment was plotted and analysed as sigmoidal dose-response curves with variable slopes using GraphPad Prism 5 software. NT, untreated; M2, M4, M13, treated with 2, 4 or 13 mg/kg/day miltefosine. * $P < 0.0001$ versus untreated group.

The combined treatment schemes were designed using doses corresponding to the approximate ED₅₀ of each drug (13 mg/kg/day tamoxifen plus 4 mg/kg/day miltefosine) or half the ED₅₀ of each drug (6.5 mg/kg/day tamoxifen plus 2 mg/kg/day miltefosine), always given orally. Progression of disease was evaluated by measuring the lesion growth and parasite burden. No differences were observed in these parameters when untreated mice were compared with the control group treated with the vehicle alone (data not shown).

At the end of the treatment, the mean lesion growth in the group treated with the 0.5ED₅₀ dose scheme (6.5 mg/kg/day tamoxifen plus 2 mg/kg/day miltefosine) was significantly reduced when compared with the untreated group (Fig. 3A). Lesions in this combination group were also reduced, although not at statistically significant levels, when compared to animals treated with each one of the drugs alone. Mice treated with the 0.5ED₅₀ combination scheme also displayed a significant decrease in parasite burden in comparison with the untreated group (Fig. 3B). As observed for lesion size, the decrease in parasite burden observed in animals treated with the combination at the 0.5ED₅₀ dose was larger than in animals treated with monotherapy at the same doses (Fig. 3B), but the difference was not statistically significant. The combination employing the approximate ED₅₀ of each drug (13 mg/kg/day tamoxifen plus 4

mg/kg/day miltefosine) was as effective as miltefosine alone at the end of the treatment, considering clinical and parasitological parameters (Fig. 3A and B).

Figure 3. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy in *L. amazonensis* infections. Evaluation of lesion growth (A and C) and parasite burden (B and D) of La-LUC infected BALB/c mice treated with tamoxifen (6.5 or 13 mg/kg/day) and/or miltefosine (2 or 4 mg/kg/day) at the end of treatment (A and B) and 30 days after the end of the treatment (C and D). NT, untreated animals; T6.5 and T13, animals treated with 6.5 or 13 mg/kg/day tamoxifen; M2 and M4, animals treated with 2 or 4 mg/kg/day miltefosine. * $P < 0.005$ versus untreated group. Ph/sec/cm²/sr, photons per second per square centimeter per steradian.

To assess the long-term efficacy of the combination treatment, lesion growth and parasite load were determined 30 days after the end of treatment. At this time, lesions and parasite burden in animals treated with the combination schemes remained significantly reduced as compared with the control untreated group (Fig. 3C and D). The 0.5ED₅₀ combination scheme resulted in better clinical and parasitological outcomes than miltefosine or tamoxifen as single drugs (Fig. 3C and D). Animals treated with the ED₅₀ combination scheme presented a clinical and parasitological

275 outcome equivalent to miltefosine single therapy (Fig. 3C and D). The parasite burden
276 through luciferase quantification of representative animals for each group at the end of
277 treatment and 30 days later is shown in Figures 4A and B.

278

281 **Figure 4. Parasite burden after combined therapy with tamoxifen and miltefosine,**
282 **evaluated by bioluminescence.** Representative animals of groups treated with single
283 and combined schemes of tamoxifen and miltefosine at the end of treatment (A) and 30
284 days after the end of treatment (B). NT, untreated animals; T6.5 and T13, treated
285 animals with 6.5 or 13 mg/kg/day tamoxifen; M2 and M4, treated animals with 2 or 4
286 mg/kg/day miltefosine. The bar on the right shows a pseudo-color scale representing
287 light intensities.

288

289 ***Influence of sub-effective doses of tamoxifen on selection of resistance to miltefosine***

290 *In vitro* selection of miltefosine resistant parasites can be easily obtained in
291 different species of *Leishmania* by stepwise increase in drug concentrations.⁸⁻¹¹ Having
292 shown that tamoxifen and miltefosine can be used in combination without any
293 undesirable antagonism, we next tried to verify whether the use of the combination
294 would have an impact on restraining or delaying the selection of miltefosine resistant

parasites. To this effect, we evaluated the survival and growth of parasites in the presence of different concentrations of miltefosine or tamoxifen used alone or in combination. Promastigotes grown in the presence of 18 μ M miltefosine (the approximate EC_{50}) achieved the stationary phase at day 8, while untreated cultures achieved the stationary phase at day 7, at a maximum density 25% higher than miltefosine-treated cultures (Fig. 5). A higher miltefosine dose (24 μ M) resulted in a similar growth profile to that presented by parasites cultured in the presence of 18 μ M miltefosine.

On the other hand, in the presence of 14 μ M tamoxifen (the approximate EC_{50}), there was no growth until the experimental endpoint (60 days) (Fig. 5). When cultured in a lower concentration of tamoxifen (7 μ M), promastigotes presented a delayed growth and achieved the stationary phase at day 8. *L. amazonensis* promastigotes were also grown in the presence of both drugs. When parasites were kept in the presence of 7 μ M tamoxifen plus 18 or 24 μ M miltefosine, a delay in parasite's growth was observed with the stationary phase been reached after 16 or 20 days, respectively. As expected, parasites cultured in the presence of 14 μ M tamoxifen plus 24 μ M miltefosine did not grow until the 60th day of incubation (Fig. 5).

Figure 5. *L. amazonensis* growth curve in the presence of tamoxifen and/or miltefosine. *L. amazonensis* promastigotes (2×10^5 cells/mL) were treated with 7 and 14 μ M tamoxifen and 18 and 24 μ M miltefosine, as single or combined schemes. Parasite numbers were determined daily by microscopic counting in a Neubauer hemocytometer. C: control group; M18, M24: promastigotes treated with 18 and 24 μ M miltefosine; T7, T14: promastigotes treated with 7 and 14 μ M tamoxifen. Results shown are from one experiment performed in triplicates, representative of two independent experiments.

322 To evaluate if resistance to miltefosine could be selected in the presence of
323 tamoxifen, a classical strategy for drug resistance selection was used. Parasites were
324 incubated initially with 20 μ M miltefosine, followed by increases to 40 and 80 μ M.
325 Miltefosine's EC_{50} against selected parasites, determined after at least three passages at
326 20, 40 or 80 μ M, were 67.2 (64.4-70.1), 106.6 (100.9-112.6) and 117.9 (91.0-152.9)
327 μ M, respectively (Table 2). On the other hand, and confirming previously reported data
328 ²⁶, selection with tamoxifen 2, 4, 6 and 8 μ M, did not result in altered EC_{50} values in
329 selected parasites when compared with the EC_{50} prior to selection (Table 2 and data not
330 shown). Furthermore, the recovery of living parasites was not possible when tamoxifen
331 concentrations were raised to 14 μ M (Fig. 5, Table 2).²⁶

332 To evaluate whether tamoxifen would impair the selection of miltefosine
333 resistant parasites, a miltefosine stepwise selection was performed in the presence of
334 fixed concentrations of tamoxifen. In these experiments, parasites were seeded in the
335 presence of at 2, 4, 6, 8 or 14 μ M tamoxifen and 20 μ M miltefosine. When these
336 cultures reached stationary phase, they were subcultured in the same drug
337 concentrations twice. When the third stationary phase was reached, these parasites were
338 seeded in medium containing tamoxifen and 40 μ M miltefosine. For each step, time to
339 register culture growth and the susceptibility to miltefosine and tamoxifen of selected
340 parasites was evaluated (Table 2 and data not shown).

341 Selection of miltefosine resistance in the presence of tamoxifen was possible in
342 the presence of tamoxifen concentrations up to 8 μ M. In these circumstances,
343 miltefosine resistant parasites were eventually selected but after longer periods than in
344 the absence of tamoxifen (Table 2). However, when these parasites grew and reached
345 stationary phase, their susceptibility to miltefosine was decreased in the same manner as
346 parasites selected in the absence of tamoxifen. For example, the EC_{50} against selected
347 promastigotes grown with 20, 40 and 80 μ M of miltefosine in combination with 8 μ M
348 of tamoxifen was 65.4 (64.3 - 66.6), 113.4 (110.9 - 116.0) and 127.0 (112.9 - 142.7)
349 μ M. Tamoxifen's EC_{50} against these parasites was not different from values observed
350 against the wild type promastigotes (Table 2 and data not shown). On the other hand,
351 when we attempted to select for miltefosine resistance in the presence of tamoxifen at
352 approximately the EC_{50} (14 μ M), no growth was observed, indicating that tamoxifen at
353 its half effective concentration can prevent selection of miltefosine resistant parasites *in*
354 *vitro*.

355

356 **Discussion**

357 Together with complete compliance, combined therapy is the most important
358 strategy to increase efficacy and prevent drug resistance in infectious diseases. Its
359 advantages include increased effectiveness, reduction in the administered doses and in
360 the length of treatment, with consequent reduction of undesirable side effects and cost.
361 The possibility of delaying the selection of resistant parasites is another interesting
362 advantage of combination therapy.¹⁸

363 In this paper, we have characterized the interaction properties of the combination
364 of tamoxifen and miltefosine. In amastigotes, a shift from right to left in the sigmoidal
365 dose-response curves, indicating a decrease in EC₅₀ values, was observed when drugs
366 were administered in combination (data not shown). Isobologram and FICI
367 determinations indicated that the combination is indifferent. The use of combined
368 therapy with tamoxifen and miltefosine *in vivo* employing doses corresponding to half
369 the EC₅₀ of each drug resulted in better clinical and parasitological outcomes than
370 monotherapy with either drug, both at the end of treatment and 30 days after treatment
371 interruption. The EC₅₀ combination scheme was clinically and parasitologically as
372 effective as the single therapy with miltefosine. While the association was not synergic,
373 these results clearly demonstrated that tamoxifen does not disrupt miltefosine efficacy.

374 The approval of miltefosine as an antileishmanial drug brought much hope to the
375 endemic areas for its oral administration and remarkable efficacy.⁴ However, parasite
376 resistance to miltefosine can be easily detected upon drug selection.^{8,10} Moreover, and
377 perhaps for unrelated reasons, a reduction in clinical efficacy has already been observed
378 in visceral leishmaniasis patients with 7 to 10% relapses observed within 6 months after
379 treatment in India and Nepal, respectively.^{32,33} Twelve months after the end of
380 treatment, relapse rates of up to 20% were seen in Nepal.³³ While most of the relapses
381 identified so far are not due to changes in parasites' susceptibility to miltefosine,
382 treatment failure can also be associated with drug resistance, as described in a
383 miltefosine resistant-*L. infantum* isolated from an HIV-coinfected patient previously
384 treated with the drug³⁴ or in *L. braziliensis* patients.⁶ Therefore, it seems obvious that
385 miltefosine should not be used as a single drug in the field.

386 Tamoxifen is a safe, low-cost, orally administered drug that has been widely
387 used as a therapeutic and prophylactic agent in breast cancer therapy for over 40 years

388 ³⁵. The drug proved to be effective in the treatment of established cutaneous and visceral
389 leishmaniasis in animal models.^{24,25} It has also been shown to be effective in association
390 with amphotericin B.³¹

391 The antileishmanial mechanisms of action for these two drugs have not been
392 completely elucidated but data available so far suggest that they have different targets.
393 Our preliminary results indicate that tamoxifen alters parasites membranes' properties
394 and interferes in sphingolipid metabolism (unpublished). Miltefosine's leishmanicidal
395 mode of action is also not completely understood, but its activity has been linked to
396 apoptosis^{36,37} and to fatty-acid and sterol metabolism.^{38,39}

397 Even in the absence of synergic interactions between tamoxifen and miltefosine
398 *in vivo*, the use of this combination offers advantages such as oral administration, low
399 cost, multi-target mode of action and it is likely to have a strong impact preventing the
400 emergence of drug resistance. As mentioned previously, miltefosine resistance in
401 *Leishmania* can be easily selected upon drug pressure. Selection of miltefosine resistant
402 *Leishmania* seems to be possible even when the drug was combined to amphotericin B
403 or paromomycin.⁴⁰ However, we have been unable to select for tamoxifen resistance,
404 even after mutagenesis or selection *in vivo*.²⁶ Taking advantage of tamoxifen's activity,
405 we also showed that miltefosine resistance could not be selected if parasites were grown
406 in the presence of tamoxifen at its EC₅₀.

407 Taken together, the data presented herein indicates that tamoxifen can be a good
408 clinical partner to miltefosine's therapy, once it can hinder the selection of miltefosine-
409 resistant parasites. Furthermore, this combination presented good efficacy when used in
410 a challenging experimental animal model, indicating that it deserves further testing.

411

412 **Acknowledgments**

413 We thank CEFAP-ICB for making available the bioimaging equipment. The authors
414 thank Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka for technical assistance.

415

416 **Funding**

417 This work was supported by grant #2011/20484-7, São Paulo Research Foundation
418 (FAPESP), grant # 473343/2012-6, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
419 e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
420 Superior (CAPES). CTT (2011/18858-6) and ACC (2012/14629-5) were supported by

421 FAPESP fellowships; JQR was supported by a FAPESP (2011/21970-2) and PNPd-
422 CAPES fellowships. SRBU is the recipient of a senior researcher scholarship from
423 CNPq.

424

425 **Transparency declarations.** None to declare.

426

427 **References**

428

429 1. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H et al. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*
430 *Infectious diseases* 2007; **7**: 581-96.

431 2. Alvar J, Velez ID, Bern C et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its
432 Incidence. *PLoS One* 2012; **7**: e35671.

433 3. Jha TK, Sundar S, Thakur CP et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of
434 Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1795-800.

435 4. Sundar S, Jha TK, Thakur CP et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N*
436 *Engl J Med* 2002; **347**: 1739-46.

437 5. Rijal S, Ostyn B, Uranw S et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of
438 kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, re-infection or non-
439 compliance. *Clin Infect Dis* 2013.

440 6. Obonaga R, Fernandez OL, Valderrama L et al. Treatment failure and miltefosine
441 susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viannia* species.
442 *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 144-52.

443 7. Prajapati VK, Sharma S, Rai M et al. In vitro susceptibility of *Leishmania donovani* to
444 miltefosine in Indian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2013; **89**: 750-4.

445 8. Coelho AC, Boisvert S, Mukherjee A et al. Multiple Mutations in Heterogeneous
446 Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome
447 Sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**: e1512.

448 9. Coelho AC, Trinconi CT, Costa CH et al. In Vitro and In Vivo Miltefosine
449 Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse
450 Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e2999.

451 10. Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F et al. Characterisation of *Leishmania*
452 *donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J*
453 *Antimicrob Agents* 2003; **22**: 380-7.

- 454 11. Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M et al. Inactivation of the miltefosine transporter,
455 LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of
456 *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 229-35.
- 457 12. WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and
458 leishmaniasis. *World Health Organization technical report series* 2012: v-xii, 1-100.
- 459 13. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet* 2004; **364**: 285-94.
- 460 14. Mitchison D, Davies G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int*
461 *J Tuberc Lung Dis* 2012; **16**: 724-32.
- 462 15. Yazdanpanah Y, Sissoko D, Egger M et al. Clinical efficacy of antiretroviral
463 combination therapy based on protease inhibitors or non-nucleoside analogue reverse
464 transcriptase inhibitors: indirect comparison of controlled trials. *BMJ (Clinical research*
465 *ed)* 2004; **328**: 249.
- 466 16. Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of
467 drug resistance. *Trop Med Int Health* 2001; **6**: 928-34.
- 468 17. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001;
469 **6**: 849-54.
- 470 18. Oliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2010;
471 **23**: 595-602.
- 472 19. Seifert K, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other
473 antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 73-9.
- 474 20. Aguiar MG, Pereira AM, Fernandes AP et al. Reductions in skin and systemic parasite
475 burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of
476 mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Antimicrob*
477 *Agents Chemother* 2010; **54**: 4699-704.
- 478 21. Omollo R, Alexander N, Edwards T et al. Safety and efficacy of miltefosine alone and
479 in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the
480 treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a
481 randomized controlled trial. *Trials* 2011; **12**: 166.
- 482 22. Sundar S, Sinha PK, Rai M et al. Comparison of short-course multidrug treatment with
483 standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority,
484 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; **377**: 477-86.

- 485 23. Mahajan R, Das P, Isaakidis P et al. Combination Treatment for Visceral
486 Leishmaniasis Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus in India. *Clin*
487 *Infect Dis* 2015.
- 488 24. Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Uliana SR. Tamoxifen is effective in the
489 treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; **2**:
490 e249.
- 491 25. Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK et al. Tamoxifen as a
492 potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and
493 *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 365-8.
- 494 26. Coelho AC, Trinconi CT, Senra L et al. *Leishmania* is not prone to develop resistance
495 to tamoxifen. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2015; **5**: 77-83.
- 496 27. Reimao JQ, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JK et al. Parasite burden in *Leishmania*
497 (*Leishmania*) *amazonensis*-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool.
498 *J Microbiol Methods* 2013; **93**: 95-101.
- 499 28. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK et al. In vitro sensitivity
500 of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*
501 Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health*
502 2010; **15**: 68-76.
- 503 29. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for
504 studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin
505 against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*
506 2004; **48**: 4097-102.
- 507 30. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J*
508 *Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1.
- 509 31. Trinconi CT, Reimao JQ, Yokoyama-Yasunaka JK et al. Combination therapy with
510 tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob*
511 *Agents Chemother* 2014; **58**: 2608-13.
- 512 32. Sundar S, Singh A, Rai M et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral
513 leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical infectious diseases : an official*
514 *publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; **55**: 543-50.
- 515 33. Rijal S, Ostyn B, Uranw S et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of
516 Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or
517 noncompliance. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 1530-8.

- 518 34. Cojean S, Houze S, Haouchine D et al. *Leishmania* resistance to miltefosine associated
519 with genetic marker. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 704-6.
- 520 35. Jordan VC. Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. *Nature Reviews Drug*
521 *Discovery* 2003; **2**: 205-13.
- 522 36. Paris C, Loiseau PM, Bories C et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in
523 *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 852-9.
- 524 37. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania*
525 *donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3010-5.
- 526 38. Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid and
527 sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and
528 consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*
529 2005; **49**: 2677-86.
- 530 39. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K et al. Miltefosine affects lipid metabolism in
531 *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007; **51**:
532 1425-30.
- 533 40. Garcia-Hernandez R, Manzano JI, Castanys S et al. *Leishmania donovani* develops
534 resistance to drug combinations. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**: e1974.
535

Table 1. EC₅₀ and FICI of tamoxifen/miltefosine combinations against *L. amazonensis*.

	Drug ratio	EC ₅₀ ± SD (μM) ^a		FICI ^b		ΣFICI ^c	xΣFICI ^d
		Tamoxifen: miltefosine	Tamoxifen	Miltefosine	Tamoxifen	Miltefosine	
Promastigotes ^e	5:0		13.51 ± 0.10				
	4:1		13.49 ± 0.21	4.32 ± 1.00	1.00	0.26	1.26
	3:2		11.39 ± 0.13	9.43 ± 2.13	0.84	0.56	1.40
	2:3		7.27 ± 0.88	13.74 ± 1.87	0.54	0.82	1.36
	1:4		3.35 ± 0.56	17.20 ± 2.04	0.25	1.02	1.27
	0:5			16.82 ± 1.74			
Intracellular amastigotes ^f	5:0		4.25 ± 0.80				
	4:1		2.36 ± 0.41	0.15 ± 0.03	0.56	0.06	0.61
	3:2		1.30 ± 0.27	0.68 ± 0.14	0.30	0.26	0.57
	2:3		0.42 ± 0.06	1.40 ± 0.19	0.10	0.53	0.63
	1:4		0.09 ± 0.01	2.55 ± 0.36	0.02	0.97	1.00
	0:5			2.61 ± 0.30			

537

538 ^aSD: Standard deviation of the EC₅₀ values.

539 ^bFICI: Fractional inhibitory concentration indices at the EC₅₀.

540 ^cΣFICI: sum of FICI.

541 ^dxΣFICI: mean of ΣFICI.

542 ^e*In vitro* activities of tamoxifen and miltefosine against promastigotes was determined by the
543 MTT assay.

544 ^fActivity against intracellular amastigotes was determined in infected macrophages by
545 luminescence.

546

Table 2. Tamoxifen and miltefosine selection applied to *L. amazonensis* as single drugs or combined.

Parasites ^a	EC ₅₀ (μM) (95% CI) ^b		Time to stationary phase (days) ^c		
	Tamoxifen	Miltefosine	M20	M40	M80
WT	14.4 (12.5-16.6)	18.2 (17.5-19.0)			
T8	14.6 (13.6-15.5)	-			
T14	NS ^d				
M20		67.2 (64.4-70.1)	10		
M40		106.6 (100.9-112.6)		17	
M80		117.9 (91.0-152.9)			39
T8+M20	16.0 (14.8-17.3)	65.4 (64.3-66.6)	48		
T8+M40	ND ^e	113.4 (110.9-116.0)		23	
T8+M80	ND	127.0 (112.9-142.7)			81
T14+M20	NS	NS			

^aWild type or drug selected parasites by exposure to tamoxifen (T) and/or miltefosine (M).

^bEC₅₀, effective concentration 50% against promastigotes, representative of at least two independent experiments. 95% CI, confidence interval.

^cTime in days required for the cultures to reach the stationary phase on the third passage when submitted to drug concentrations of 20 (M20), 40 (M40) or 80 (M80) μM miltefosine.

^dNS, no survival;

^eND, not determined.

237x96mm (300 x 300 DPI)

276x96mm (300 x 300 DPI)

238x182mm (300 x 300 DPI)

179x135mm (300 x 300 DPI)

195x87mm (300 x 300 DPI)

APÊNDICE D - Oral and topical tamoxifen as partners to pentavalent antimony in
the therapy of cutaneous leishmaniasis

Oral or topical tamoxifen as partners to pentavalent antimony in the therapy of cutaneous leishmaniasis

Running title: Combination therapy with tamoxifen and pentavalent antimony

Cristiana T. Trinconi¹, Juliana Q. Reimão¹, Vivian I. Bonano¹, Caroline R. Espada¹, Danilo C. Miguel^{1, #}, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka¹, Lucas A. Ferreira², Silvia R. B. Uliana^{1, *}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-000 São Paulo, Brazil

²Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais; Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author: Tel: +55-11-30917334; Fax: +55-11-30917417; E-mail: srbulian@icb.usp.br

[#]Present address: Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT (250 words)

Objectives: The aim of the present work was to test the therapeutic efficacy of tamoxifen and meglumine antimoniate combinations in an experimental model of cutaneous leishmaniasis.

Methods: *In vitro* interactions between tamoxifen and meglumine antimoniate were tested against intracellular amastigotes using variable drug ratios and determining the fractional inhibitory concentration index (FICI) and the mean sum of FICI. Mice infected with a luciferase expressing line of *L. amazonensis* were treated with meglumine antimoniate co-administered with oral or topical tamoxifen. Three different topical formulations were evaluated: ethanolic solutions, nanoemulsions and an oil-free cream containing different concentrations of tamoxifen. Treatment efficacy was evaluated by lesion size and parasite burden, quantified through luminescence, at the end of treatment and 30 days after the end of treatment.

Results. The interaction between tamoxifen and meglumine antimoniate was additive *in vitro*. Treatment of *L. amazonensis* infected mice with combined schemes containing tamoxifen and meglumine antimoniate was effective in reducing lesion size and parasite burden. Tamoxifen contributed to the therapeutic response when given by the oral route or when applied topically. Topical use of tamoxifen formulated in ethanol or as a cream were shown to be effective. Co-administration of tamoxifen and meglumine antimoniate was superior to monotherapy with the antimonial.

Conclusions. Clinical and parasitological improvement were observed in animals submitted to tamoxifen therapy by oral or topical routes, co-administered or not with antimonial.

Keywords: *Leishmania (L.) amazonensis*; tamoxifen; pentavalent antimony; cutaneous leishmaniasis, luciferase.

Introduction

Leishmaniasis is a neglected vector-borne tropical infection found in 98 countries in tropical and subtropical regions of the world. About 350 million people live in areas characterized by active transmission of *Leishmania*, with 14 million people directly affected by the disease (Alvar, et al., 2012).

Leishmaniasis is often considered a disease complex with two major manifestations, visceral and cutaneous leishmaniasis (VL and CL). Additionally, other clinical presentations do occur, including the mucocutaneous (MCL) and diffuse (DCL) forms of CL and post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) (Barrett and Croft, 2012).

There is a limited number of proven treatment options for CL. Pentavalent antimony (Sb^V) is still the first line drug, with variable efficacy reported for different *Leishmania* species {Yardley, 2006 #1402}(Neves, et al., 2011). This variability can sometimes be attributed to parasite resistance (Hadighi, et al., 2006). Pentamidine and amphotericin B represent second line drugs, which are of limited use due to their toxicity and cost (Alvar, et al., 2006). Paromomycin has shown variable clinical results and toxicity problems in different topical formulations (Asilian, et al., 1995, Ben Salah, et al., 1995, el-On, et al., 1992, Garnier and Croft, 2002, Soto, et al., 1995). Oral miltefosine shows species-dependent efficacy against CL and treatment failures have been reported (Soto, et al., 2004, Yardley, et al., 2005). Overall, chemotherapeutic agents available for leishmaniasis treatment are limited by problems such as toxicity, variable efficacy and cost but are still used due to the lack of other options. Therefore, the development of new strategies for CL treatment remains essential.

Drug combination schemes have been strongly recommended with the aim of increasing therapy efficacy and preventing resistance emergence while the reduction in dose and time of treatment would result in lower toxicity and greater patient's acceptance (Modabber, et al., 2007). On the other hand, topical therapy for cutaneous leishmaniasis has been also recommended due to its theoretical local potentiation, low cost and easy administration, without the requirements for a complex health system infrastructure (Modabber, et al., 2007).

With these elements in mind, we investigated the effect of tamoxifen as single therapy or in co-administration schemes for CL. Tamoxifen is an anticancer agent with *in vitro* activity against all Old and New World *Leishmania* species tested so far, and

effective in experimental models of cutaneous and visceral leishmaniasis (Eissa, et al., 2011, Miguel, et al., 2008, Miguel, et al., 2009).

Herein, we investigated the interactions of tamoxifen with Sb^V *in vitro* and *in vivo*, using a model of infection with *Leishmania amazonensis*.

Material and Methods

Parasites and macrophages. *L. amazonensis* (La-WT) (MHOM/BR/1973/M2269) promastigotes were grown in M-199 medium supplemented with 10% heat inactivated-fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES (pH 6.9), 12 mM NaHCO₃, 7.6 mM hemin, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin at 25 °C. Promastigotes of a *L. amazonensis* transgenic line expressing luciferase (La-LUC) (Reimao, et al., 2013) were grown in the same medium supplemented with 32 µg/mL G418 and incubated at 25 °C. Bone marrow derived macrophages (BMDM) were obtained from BALB/c mice as described (Reimao, et al., 2013).

Drugs. Meglumine antimoniate (Glucantime[®] Aventis-Pharma/Brazil - Sb^V) was kindly donated by the Brazilian Ministry of Health. Glucantime solution contained 300 mg/ml meglumine antimoniate corresponding to 81 mg/ml Sb^V. Antimonial doses mentioned henceforth refer to the concentration of Sb^V. For *in vivo* experiments, stock solutions of Glucantime[®] were prepared in sterile water. Tamoxifen and tamoxifen citrate were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Stock solutions of tamoxifen (10 mM) were prepared in DMSO and kept at -20 °C. Subsequent dilutions were done in culture media. For *in vivo* experiments, tamoxifen citrate was diluted in the following vehicle: 5% DMSO, 15% Cremophor^{EL}Fluka (Sigma-Aldrich) and 80% saline, prepared daily immediately before use.

For topical administration, three preparations were used: (a) tamoxifen was prepared as a 1% solution in 100% ethanol; (b) nanoemulsions containing tamoxifen were prepared as described below; (c) tamoxifen citrate was formulated in 0.1% oil-free cream (Drogaderma, São Paulo - Brazil).

Nanoemulsions preparation. Nanoemulsions (NE) containing tamoxifen were developed using a hot homogenization method (ref). Briefly, the components of the nanoemulsions were separated into oily and aqueous phase. Both phases were heated to

80-85 °C, at which point the aqueous phase was added to the oily phase and homogenized using an Ultraturrax at 8000 rpm for 1min. Then particle size was reduced with an ultrasonic probe adjusted to 20% amplitude for 5 minutes. Emulsions were cooled, adjusted to pH 7, and gelified using Sepigel. Then they were characterized for size and entrapment efficiency. The particle size of tamoxifen-loaded NE was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer 3000MHS (Malvern Instruments, UK), at a fixed angle of 90° and at a temperature of 25°C. The results were expressed as effective diameter (mean diameter evaluated through intensity). The maximum value acceptable for the polydispersity index (PI) was 0.3. The entrapment efficiency for tamoxifen was determined by high performance liquid chromatography, with detection at 240 nm.

Assessment of tamoxifen and Sb^V interaction in intracellular amastigotes. Bone marrow derived macrophages were infected with La-LUC stationary phase promastigotes as described previously (Coelho, et al., 2014). Infected macrophages were treated with tamoxifen (0.19 to 12 µM) and Sb^V (18.75 to 1,200 µg/mL) for 120 hours. The viability of intracellular amastigotes was determined using the One GloTM Luciferase Assay System (Promega Corporation), as previously described (Coelho, et al., 2014). Briefly, at the end of the experiment the medium was replaced with 100 µL of PBS plus 20 µL of OneGlo reagent at room temperature followed by homogenization. Luminescence was recorded in a microplate reader (Polarstar Omega, BMG Labtech). The luminescence reading from treated wells was used to calculate sigmoidal regression curves using untreated infected macrophages as controls. Each point was tested in triplicate. The interactions between drugs were evaluated by a modified isobologram method (Fivelman, et al., 2004, Seifert and Croft, 2006). Briefly, a dose-response curve was constructed for each drug, with the 50% effective concentration (EC₅₀) located at the midpoint of the serial dilution. The highest concentrations of drugs were prepared in different combinations: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 (tamoxifen: Sb^V). These combinations were serially diluted (base 2) seven times. The EC₅₀ of tamoxifen and Sb^V were determined for each ratio. The fractional inhibitory concentrations index (FICI), the sum of FICI ($\sum FICI$) and the mean sum of FICI ($\bar{x}\sum FICI$) were calculated based on the ratio between the EC₅₀ of the drug in combination and the EC₅₀ of the drug alone (Fivelman, et al., 2004) (Seifert and Croft, 2006). Isobolograms were built plotting the FICI values for each drug ratio. The $\sum FICI$

was used to classify the interactions as follows: $x\Sigma FICI \leq 0.5$ indicates synergism, $0.5 > x\Sigma FICI \leq 4$ indicates indifferent/additive interaction and $x\Sigma FICI > 4$ indicates antagonism (Odds, 2003). Two independent experiments were performed in duplicate for each drug combination assay.

In vivo evaluation of tamoxifen and Sb^V interactions. Female BALB/c mice (60 days-old) were inoculated with 10^6 stationary-phase La-WT or La-LUC promastigotes at the base of the tail. The treatment started three to eight weeks after infection, when the lesions were apparent. Mice were assigned into experimental groups (n = 5-8) so that the average lesion size was equivalent in all groups.

One group of experiments evaluated the effect of tamoxifen by the oral route in combination with Sb^V . Treatment was performed with 13 mg/kg/day tamoxifen (x mg tamoxifen citrate), which corresponds to tamoxifen's 50% effective dose (ED_{50}) value (Trinconi, et al., 2014), in combination with 40 mg/kg/day of Sb^V , corresponding to twice the Sb^V dose recommended for human therapy. The efficacy of the combined treatment was compared with monotherapy with each drug and with 80 mg/Kg/day of Sb^V . During 15 consecutive days, groups treated with tamoxifen received oral gavage in a 100 μ L final volume, while groups treated with Sb^V received intraperitoneal injections in a 200 μ L final volume. The control group was treated with the vehicle used to dilute tamoxifen.

A second series of experiments evaluated the activity of tamoxifen by the topical route. The treatment was always compared to treated control groups receiving the same vehicles used to dilute tamoxifen. Forty-four microliters of 1% tamoxifen in ethanol (0.44 μ g or 20 mg/kg) were applied over the lesion daily. The ethanolic solution was applied dropwise slowly, until completely dried. Animals treated with tamoxifen in nanoemulsions received about 50 μ L of the nanoemulsions over the lesion. Topical treatment was performed once a day during 15 consecutive days.

In the third set of experiments, drug interaction was evaluated between topical tamoxifen and Sb^V . Treatment was performed with a solution of 1% tamoxifen diluted in ethanol or 0.1% tamoxifen equivalent in tamoxifen citrate formulated oil-free cream. Control groups received the same vehicles used to dilute tamoxifen. Animals treated with the cream were individualized in cages covered with filter paper to avoid mechanical removal of topical treatment. Treatment with tamoxifen 1% in ethanol was

done as described above. Both topical treatments were applied during 30 consecutive days. Treatment with Sb^V was performed with 40 or 80 mg/kg/day by the intraperitoneal route in 200 µL final volume during 20 consecutive days. Combined therapeutic schemes used in this set of experiments were: 1% tamoxifen in ethanol plus 40 mg/kg/day Sb^V and 0.1% tamoxifen oil-free cream plus 40 mg/kg/day Sb^V.

Treatment efficacy was evaluated by clinical and parasitological parameters. The lesion size was recorded weekly as the mean of tail base diameters (in horizontal and vertical directions). Lesion growth was considered as the lesion size on the day of observation subtracted from the lesion size at day 0 (the day before starting the treatment) for the same animal. Measurements were taken with a caliper (Mitutoyo Corp., Japan). The parasite burden was evaluated at the end of treatment and 4 weeks after the end of treatment by limiting dilution (Lima, et al., 1997) or through luciferase detection by bioimaging as described (Reimao, et al., 2013, Trinconi, et al., 2014). In brief, the luminescence intensity of a fixed-size region of interest was determined 20 min after luciferin administration (75 mg/kg, i.p.) (VivoGloTM Luciferin, Promega). Imaging was collected through high-resolution mode with 2 min of exposure time (IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences, Inc. MA/USA). Results were quantified with Living Image software version 4.3.1 (Caliper Life Sciences, Inc. MA/USA) and expressed as the number of photons/sec/cm²/sr.

Ethics statement. Animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol: 178/2012) in agreement with the guidelines of the Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) and of the Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Statistical analysis. Data were analyzed for statistical significance by One-way ANOVA. Post hoc tests were performed using Tukey correction in GraphPad Prism 5 software. *P* values ≤0.05 were considered statistically significant.

Results

Combination of tamoxifen and Sb^V in vitro

The interaction between tamoxifen and Sb^V was evaluated by a modified fixed-ratio isobologram method (Fivelman, et al., 2004, Seifert and Croft, 2006) in assays

employing intracellular amastigotes. Since the activity of Sb^V against amastigotes is only completely developed after long incubation times, these assays were performed using 120 hours as endpoints. The EC₅₀ of tamoxifen and Sb^V as single drugs were calculated as 2.0 ± 0.14 µM and 196.6 ± 30.4 µg/mL, respectively. Tamoxifen and Sb^V were combined in different ratios (5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5), generating five dose-response curves for each drug. This experimental setup allowed the determination of the EC₅₀ and FICI for each combination (Table 1). The $\chi\Sigma$ FICI was calculated as 1.05, which indicates an indifferent interaction between tamoxifen and Sb^V against *L. amazonensis* intracellular amastigotes. This result was confirmed by plotting the individual FICIs in an isobologram (Fig. 1), where all points were positioned close to the additivity line.

Table 1. EC₅₀ and FICI of tamoxifen and Sb^V combinations against *L. amazonensis* intracellular amastigotes.

Drug ratio (Tam:Sb ^V)	EC ₅₀ ± SD ^a		FICI ± SD ^c		ΣFICI ^d	ΣFICI ^e
	Tam ^b (µM)	Sb ^V (µg/mL)	Tam	Sb ^V		
5:0	2.0 ± 0.1	-	-	-		
4:1	1.9 ± 0.3	31.4 ± 13.9	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.01	
3:2	1.5 ± 0.6	63.0 ± 8.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.2	
2:3	1.3 ± 0.9	98.1 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.05
1:4	0.6 ± 0.4	126.3 ± 15.1	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.02	0.9 ± 0.1	
0:5	-	196.6 ± 30.4	-	-		

^a 50% effective concentration ± standard deviation of two independent experiments. Values were determined by luminescence against intracellular amastigotes in infected macrophages.

^b Tam: tamoxifen; Sb^V: pentavalent antimonial.

^c FICI: fractional inhibitory concentration ± standard deviation of two independent experiments.

^d ΣFICI: sum of FICIs.

^e $\chi\Sigma$ FICI: mean sum of FICIs.

Figure 1. Interaction between tamoxifen and Sb_v in vitro against *L. amazonensis* intracellular amastigotes. Assays were performed using a fixed-ratio method, with the combinations being tested at constant ratios of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, and 0:5 of tamoxifen and Sb_v. Results shown are the mean from two independent experiments. Plots were compared to a theoretical line that produced FICIs of 1 at all ratios (dashed line), representing an additive combination.

In vivo efficacy of oral tamoxifen co-administered with Sb^V

Tamoxifen and Sb^V interaction *in vivo* was evaluated using La-LUC-infected BALB/c mice as an experimental model. Treatment was initiated four weeks after infection, when lesions were already apparent at the site of inoculation. Mock treatment with tamoxifen's vehicle did not alter the progression of lesions or parasite burden as compared with untreated animals (data not shown). Groups treated with oral tamoxifen and intraperitoneal Sb^V as monotherapy or in co-administration schemes presented significant improvement of clinical and parasitological parameters in comparison with the control, vehicle-treated group, at the end of treatment (Fig. 2A and B). The combined scheme led to a reduction in the mean size of lesion and parasite load when compared to monotherapy groups, although not at statistically significant levels. Results observed with the combination scheme were superior than with Sb^V monotherapy at high doses (80 mg/Kg/day).

Figure 2. Efficacy of oral tamoxifen combined with Sb^v in the treatment of *L. amazonensis*-infected mice. Treatment was initiated 4 weeks post-infection and was administered for 20 days. Evaluation of lesion size (A, C) and parasite burden (B, D) in mice treated with tamoxifen (13 mg/kg/day, p.o.) and/or Sb^v (40 or 80 mg/kg/day, i.p.) at the end of treatment (A, B) and four weeks after the end of the treatment (C, D). Vehicle: animals treated with tamoxifen's vehicle; S40, S80: treatment with 40 or 80 mg/kg/day Sb^v; T13: treatment with 13 mg/kg/day tamoxifen. n = 6/group. One-way ANOVA with Tukey post-test, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ and ∞ $P < 0.001$ versus vehicle group. Ph/sec/cm²/sr: photons per second per square centimeter per steradian.

Four weeks after the end of the treatment, animals were re-evaluated to ascertain the stability of the drug response. All treated groups retained the reduction in lesion size but only the group treated with the co-administration scheme remained significantly different to the control vehicle group (Fig. 2C). On the other hand, no significant differences were noted between groups when the parasite load was quantified by luminescence (Fig. 2D). Figure 3 shows representative animals from each group at the end of treatment (Fig. 3A) and four weeks later (Fig. 3B).

Figure 3. Parasite burden of *L. amazonensis*-infected mice treated with tamoxifen and/or pentavalent antimonial. Representative animals from groups treated with single or combined schemes of tamoxifen (13 mg/kg/day, v.o.) and pentavalent antimonial (40 or 80 mg/kg/day, i.p.) at the end of treatment (A) and 4 weeks after the end of treatment (B). Vehicle, animals treated with tamoxifen's vehicle; S40 and S80, animals treated with 40 or 80 mg/kg/day of Sb^v; T13, animals treated with 13 mg/kg/day tamoxifen; Ph/sec/cm²/sr: photons per second per square centimeter per steradian. The bar on the right shows a pseudo-color scale representing light intensities.

Efficacy of tamoxifen administered topically

In theory, topical treatment would be advantageous in the management of cutaneous leishmaniasis patients, especially when a combination therapy is employed. The efficacy of topically administered tamoxifen was investigated in *L. amazonensis* infected BALB/c mice. Preliminary experiments were performed applying 1% tamoxifen solutions prepared in ethanol to *L. amazonensis* infected mice, daily, for 15 days. At the end of treatment, lesion size was significantly reduced in animals treated with the drug as compared with animals treated only with ethanol (data not shown).

Since the crude application of tamoxifen in ethanol had a positive effect, we next tried a formulation of tamoxifen in nanoemulsions. Characteristics of the nanoemulsions are presented on Table 2. Groups were assigned to be treated with 1% tamoxifen either in ethanol or in nanoemulsions. At the 8th day of treatment, animals treated with nanoemulsions containing 1% tamoxifen showed signs of local toxicity, with dryness, scaling and abrasion of the skin at the administration site (data not shown). These effects led to the interruption of treatment in these animals.

Table 2. Properties of control and tamoxifen loaded nanoemulsions.

Nanoemulsion	Blank	With tamoxifen
Particle Size (nm)	190.3 ± 9.8	191.5 ± 2.0
Polydispersity index ^a	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Entrapment efficiency (%) ^b	NA	101.1 ± 0.4
pH	7.03 ± 0.02	7.05 ± 0.01

^a Results expressed as effective diameter (mean diameter evaluated through photon correlation spectroscopy).

^b The maximum value acceptable for the polydispersity index (PI) was 0.3.

^c Determined by high performance liquid chromatography, with detection at 240 nm.

A new setting was then tested, using nanoemulsions containing from 0.2 to 0.01% tamoxifen. In this instance, treatment of *L. amazonensis*-infected BALB/c mice was initiated 8 weeks after infection, when swelling at the injection site and, in some cases, ulcers were already apparent. Animals were treated topically either with tamoxifen diluted in ethanol or with the loaded nanoemulsions. Treatment was administered once a day, topically, for 20 days. Treated groups did not show signs of systemic or local toxicity, apart from superficial and local desquamation of the skin around the application site towards the end of treatment. At the end of the treatment, a delay in the development of lesions and ulcers was noted for all treated animals. No decrease in lesion size was noted in animals treated with the empty nanoemulsion (Fig. 4). The most effective scheme, as evaluated by lesion size, was 1% tamoxifen in ethanol, followed by nanoemulsions containing 0.2% tamoxifen (Fig. 4A). The therapeutic effect was sustained since 4 weeks after the interruption of treatment, significant reductions in lesion size were observed in the groups treated with 1% and 0.2% tamoxifen (Fig. 4B).

Figure 4. Efficacy of topical tamoxifen in the treatment of *L. amazonensis*-infected mice. Mice were treated topically with tamoxifen formulated as a nanoemulsion or in ethanolic solution. Treatment started 8 weeks post-infection and was given for 20 days. Data represent the mean size and standard deviation (n=8) of lesions at the end of treatment (A) and 4 weeks after the end of treatment (B). NT: untreated group; NE: treated with empty nanoemulsion (vehicle control group); NE0.01, NE0.1 and NE0.2: treated with nanoemulsions containing 0.01, 0.1 or 0.2% tamoxifen; E1: treated with 1% tamoxifen in ethanolic solution. One-way ANOVA with Tukey post-test, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ against NT and NE groups. Results from one experiment representative of two independent experiments.

Efficacy of topical tamoxifen co-administered with Sb^V

Having observed the efficacy of topical administration of tamoxifen, we decided to test the combination of topical tamoxifen with systemic Sb^V . Given the lack of experience with tamoxifen nanoemulsions in humans, we decided to employ another formulation for topical tamoxifen, which had been previously used in patients (Macena, et al., 2006, Pasquetti, et al., 2010). Therefore, in combination experiments tamoxifen was tested as an ethanolic solution or formulated as a cream.

In this experiment, there were two vehicle control groups: one treated with ethanol and the other with the base used to prepare tamoxifen's cream. The outcome in the group that received the ethanolic solution was not different from untreated animals (data not shown). The second vehicle control group, which received the base cream, presented a reduction in lesion size at the end of the treatment (Fig. 5), probably due the moisturizing effect of the cream.

Figure 5. Efficacy of topical tamoxifen in the treatment of *L. amazonensis*-infected mice. Evaluation of lesion size (A, C) and parasite burden (B, D) in mice treated with topical tamoxifen (1% ethanolic solution or 0.1% oil-free cream) and/or Sb^v (40 or 80 mg/kg/day, i.p.) at the end of treatment (B), one (A) and 4 weeks after the end of the treatment (C, D). The mean (n=5) and standard deviation of the data are indicated. NT: untreated; Cream: treated with oil-free cream (vehicle control group); S40, S80: treated with 40 or 80 mg/kg/day Sb^v i.p.; TE1: treated with 1% tamoxifen in ethanol; TC0.1: treated with 0.1% tamoxifen in oil-free cream. One-way ANOVA with Tukey post-test, * $P < 0.05$ against NT group, # $P < 0.01$ against NT group, [∞] $P < 0.001$ against NT group, • $P < 0.0001$ against NT group, ^δ $P < 0.05$ against identified groups. Ph/sec/cm²: photons per second per square centimeter per steradian.

Immediately at the end of the treatment, animals treated with 0.1% tamoxifen cream presented a discrete dermal reaction at the application site, which resulted in local edema (data not shown). The localized edema had completely disappeared a few days later. One week after the end of treatment, the clinical evaluation showed that all treated groups had significant reductions in lesion size compared to the untreated group, with the exception of 40 mg/Kg/day Sb^v monotherapy (Fig. 5A). As compared with monotherapy groups, animals treated with the combination schemes presented smaller lesions, but not at statistically significant levels (Fig. 5A). Importantly, the co-administration of tamoxifen and Sb^v resulted in a more pronounced reduction in lesion size and parasite load than 40 or 80 mg/kg/day Sb^v single therapy (Fig. 5A and B).

Parasite burden one week after the end of treatment was reduced in all treated groups but, due to a large standard deviation in the control group, not to statistically significant levels (Fig. 5B). The parasite burden of representative animals from each group is shown in Fig. 6A.

Figure 6. Parasite burden in *L. amazonensis*-infected mice treated with tamoxifen topical formulations and/or pentavalent antimonial. Representative animals treated with single or combined tamoxifen topical formulations (1% ethanolic solution or 0.1% oil-free cream) and pentavalent antimonial (40 or 80 mg/kg/day, i.p.) at the end of treatment (A) and 4 weeks later (B). NT: untreated; Cream: treated with oil-free cream (vehicle control group), TE1: treated with 1% tamoxifen in ethanolic solution; TC0.1: treated with 0.1% tamoxifen oil-free cream, S40, S80: treated with 40 or 80 mg/kg/day Sb^V. Ph/sec/cm²/sr: photons per second per square centimeter per steradian. The bar on the right shows a pseudo-color scale representing light intensities.

The long-term efficacy was verified four weeks after the end of the treatment through lesion size evaluation and parasite load determination (Fig. 5C and D). Groups treated with tamoxifen, co-administered or not with Sb^V, showed statistically significant reductions in lesion size when compared with the untreated group and showed improved outcome when compared with animals treated with Sb^V alone (Fig. 5C). Single therapy with 0.1% tamoxifen cream also resulted in a sustained clinical improvement and was statistically different from untreated, vehicle and Sb^V groups. At this time, only single therapy with 0.1% tamoxifen cream and co-administrated schemes presented improvement of parasite burden with statistically significant differences as compared with the untreated group (Fig. 5D). The bioluminescence images of representative animals from each group are shown in Fig. 6B.

Discussion

Tamoxifen has been widely used in the prevention and treatment of breast cancer in women for over 40 years. It has also been shown to be active against several species of *Leishmania in vitro* (Miguel, et al., 2007) and effective in the treatment of established CL and VL in animal models (Miguel, et al., 2008, Miguel, et al., 2009). Additive interactions between tamoxifen and amphotericin B (Trinconi, et al., 2014) and tamoxifen and miltefosine (Trinconi et al., submitted) have been described leading to possible applications of tamoxifen in combination therapy for VL and CL.

Here, we investigated the effect of meglumine antimoniate, the main pentavalent antimonial used in Latin America and in many other countries, in combination with tamoxifen given by the oral or topical routes. *In vitro* studies with fixed-ratio dilutions and isobologram analysis demonstrated an indifferent or additive interaction between Sb^V and tamoxifen against intracellular amastigotes. *In vivo* interaction between Sb^V and tamoxifen was tested in BALB/c mice infected with *L. amazonensis*, the most challenging animal model for CL. The first scheme of co-administration employed tamoxifen and Sb^V given by their usual routes: oral and parenteral, respectively. The co-administration of 13 mg/kg/day tamoxifen and 40 mg/kg/day Sb^V led to clinical and parasitological improved outcomes in comparison with groups treated with the same doses of each drug alone and with twice as much Sb^V (80 mg/kg/day). Sustained efficacy was observed, with significant differences remaining between groups treated with the co-administration scheme and control animals four weeks after the end of the treatment. The observation that the co-administration of tamoxifen and 40 mg/kg/day Sb^V is at least as effective as monotherapy with 80 mg/kg/day Sb^V indicates that the combination would lead to better clinical and parasitological effects with lower doses of Sb^V when associated with tamoxifen, which could result in lower toxicity to the patients.

Combined therapy for leishmaniasis has been increasingly advocated by the World Health Organization because current treatments are frequently unpredictable and unsatisfactory due to high toxicity, parenteral administration (in the majority of the cases) and unresponsiveness or relapses sometimes related to resistant parasites (Amato, et al., 2008, Sundar, et al., 2008, van Griensven, et al., 2010). Some drug combinatory studies have been performed as an alternative for CL, MCL and PKDL current therapy using Sb^V in combination with allopurinol, pentoxifylline, paromomycin, imiquimod in different countries as Peru, Iran and Sudan (Esfandiarpour and Alavi, 2002, Firooz, et

al., 2006, Melaku, et al., 2007, Miranda-Verastegui, et al., 2009, Sadeghian and Nilforoushzadeh, 2006).

Drug delivery through the skin has been recommend for CL due many advantages over others routes of drug delivery. It provides a convenient and pain-free self-administration for patients, lower risk of systemic side effects, avoidance of hepatic first-pass metabolism resulting in reduction of the amount of drug to be administered and reduced costs due the avoidance of hospitalization. All this features leads to greater acceptance of patients (Paudel, et al., 2010, WHO, 2012). All this advantages result in a better patient compliance, mainly when the painfully intralesional Sb^V therapy is considered. However, due to the barrier function of the stratum corneum, only a relatively small number of lipophilic drugs with low molecular weight are suitable for delivery by the topical route, with passive penetration through skin (Magnusson, et al., 2004). As tamoxifen is a small and highly lipophilic drug (MW= 371.51456 g/mol and xLog P = 7.1), the topical route could be a good strategy for tamoxifen delivery for CL therapy. Therefore, the effectiveness of tamoxifen was evaluated by the topical route using different permeation-enhancers: ethanol and nanoemulsions.

Ethanol was used due to its capability to increase drug solubility enhancing tamoxifen partitioning into the stratum corneum (Williams and Barry, 2004). Ethanol has been widely used in pharmaceutical preparations and cosmetic products as a transdermal delivery system (Lachenmeier, 2008). Some studies have been performed to evaluate the topical activity of tamoxifen in breast cancer using alcoholic solutions and other permeation-enhancers (Lee, et al., 2011, Mansel, et al., 2007, Rouanet, et al., 2005). Topical use of ethanolic solutions has been applied to CL experimental treatment with buparvaquone being as effective as other vehicles (Garnier, et al., 2007). However, the use of topic ethanol has some potential adverse effects, such as irritations or allergic contact dermatitis (Ophaswongse and Maibach, 1994, Pecquet, et al., 1992).

Nanoemulsions can provide an uniform distribution of drug molecules to the skin, sustained and controlled release of drug, lesser side effects resulting in enhanced therapeutic efficacy, in addition to being inexpensive and easy to manufacture (Singh, et al., 2015, Sonnevile-Aubrun, et al., 2004). Nanoemulsions containing 1% of tamoxifen were toxic to mice, resulting in inflammatory processes that were established in 3-6 days (data not shown). For this reason, the treatment was discontinued. Due to the delivery advantages, lower concentration tamoxifen nanoemulsions were tested. After 1 course of treatment of 15 days, animals treated with the 0.2% tamoxifen in

nanoemulsions or with 1% tamoxifen in ethanol showed significant and sustained clinical improvement.

Tamoxifen has been previously used topically for the treatment of metastasis in the skin (refs). It has also been applied to the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids (Gragnani, 2010; Hu, 1998; Mousavi, 2010). A formulation containing 0.1% tamoxifen in oil-free cream applied twice a day for 4 to 12 months to post-burn keloid scars was reported to be effective, with minimal side effects (Macena, et al., 2006, Pasquetti, et al., 2010). For this reason, the efficacy of this formulation was evaluated in the *L. amazonensis* CL experimental model co-administered or not with Sb^V. Topical tamoxifen in ethanol was used in parallel in these experiments. Topical tamoxifen as monotherapy was effective in reducing the lesion size and parasite burden in these animals. Co-administration with Sb^V resulted in improved and sustained efficacy in comparison with Sb^V monotherapy, even for groups treated with high doses of Sb^V, illustrating the advantages of combining the two drugs.

An undesirable feature of CL is the dilacerating lesions and resultant scars present mostly in exposed parts of the body, as hands and face. This is particularly bad in Afghanistan's and Pakistan's CL patients, who are socially excluded, principally to women that are considered unacceptable for marriage, sometimes by their own families (Kassi, et al., 2008, Reithinger, et al., 2005). Thus, since tamoxifen has been demonstrated to reduce the size and improve the texture and itch of human keloids and hypertrophic scars by the remodeling action of the collagen in those scars (Gragnani, et al., 2010, Macena, et al., 2006, Pasquetti, et al., 2010), this could be a positive effect of topical treatment with tamoxifen.

The clinical and parasitological improvement observed in animals submitted to tamoxifen's therapy by oral or topical route, co-administered or not with Sb^V, reinforces that tamoxifen could be a good candidate for CL chemotherapy. Furthermore, tamoxifen oil-free cream is a low-cost formulation, safe to humans and that can be easily administered. Therefore, it could be a suitable alternative for the treatment of human CL. Although topical treatment for CL may have various appealing advantages, in various instances it could be considered dangerous if applied as the only strategy. That would be the case in infections with *Leishmania braziliensis* or *Leishmania guyanensis*, where mucocutaneous or disseminated disease may develop. In these circumstances, the use of a second, systemic drug may be instrumental. Considering that the treatment success of one course of meglumine antimoniate treatment in *L. braziliensis* and *L.*

guyanensis infections may be as low as 53-55% (Chrusciak-Talhari, et al., 2011, Machado, et al., 2010, Neves, et al., 2011), a new, associated tool may be very helpful.

Acknowledgments

The use of bioimaging equipment, provided by CEFAP-ICB was instrumental to this work.

Funding

This work was supported by grants #2011/20484-7 and 2015/09080-2, São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant # 473343/2012-6, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CTT (2011/18858-6) was supported by a FAPESP fellowships; JQR was supported by FAPESP (2011/21970-2) and PNPD-CAPES fellowships. VB was supported by a PNPD-CAPES fellowship. CRE (2015/05130-5) was supported by a FAPESP fellowships. DCM (05/59881-0) was supported by a FAPESP fellowships. JKUY (473343/2012-6) was supported by a CNPq fellowships. SRBU is the recipient of a senior researcher scholarship from CNPq.

Transparency declarations. None to declare.

References

1. Alvar, J., Croft, S., and Olliaro, P., 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61, 223-274.
2. Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., and den Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
3. Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A., and Nicodemo, A. C., 2008. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 105, 1-9.
4. Asilian, A., Jalayer, T., Whitworth, J. A., Ghasemi, R. L., Nilforooshzadeh, M., and Olliaro, P., 1995. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 53, 648-651.
5. Barrett, M. P. and Croft, S. L., 2012. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull* 104, 175-196.
6. Ben Salah, A., Zakraoui, H., Zaatour, A., Ftaiti, A., Zaafouri, B., Garraoui, A., Olliaro, P. L., Dellagi, K., and Ben Ismail, R., 1995. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Am J Trop Med Hyg* 53, 162-166.
7. Chrusciak-Talhari, A., Dietze, R., Chrusciak Talhari, C., da Silva, R. M., Gadelha Yamashita, E. P., de Oliveira Penna, G., Lima Machado, P. R., and Talhari, S., 2011. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84, 255-260.
8. Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Costa, C. H., and Uliana, S. R., 2014. In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania* amazonensis isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2999.
9. Eissa, M. M., Amer, E. I., and El Sawy, S. M., 2011. *Leishmania* major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 128, 382-390.
10. el-On, J., Halevy, S., Grunwald, M. H., and Weinrauch, L., 1992. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* major: a double-blind control study. *J Am Acad Dermatol* 27, 227-231.
11. Esfandiarpour, I. and Alavi, A., 2002. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 41, 521-524.
12. Firooz, A., Khamesipour, A., Ghoorchi, M. H., Nassiri-Kashani, M., Eskandari, S. E., Khatami, A., Hooshmand, B., Gorouhi, F., Rashighi-Firoozabadi, M., and Dowlati, Y., 2006. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. *Arch Dermatol* 142, 1575-1579.
13. Fivelman, Q. L., Adagu, I. S., and Warhurst, D. C., 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4097-4102.
14. Garnier, T. and Croft, S. L., 2002. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 538-544.
15. Garnier, T., Mantyla, A., Jarvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., and Croft, S., 2007. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother* 60, 802-810.
16. Gragnani, A., Warde, M., Furtado, F., and Ferreira, L. M., 2010. Topical tamoxifen therapy in hypertrophic scars or keloids in burns. *Arch Dermatol Res* 302, 1-4.
17. Hadighi, R., Mohebbali, M., Boucher, P., Hajjaran, H., Khamesipour, A., and Ouellette, M., 2006. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med* 3, e162.
18. Kassi, M., Kassi, M., Afghan, A. K., Rehman, R., and Kasi, P. M., 2008. Marring leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e259.
19. Lachenmeier, D. W., 2008. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol* 3, 26.
20. Lee, O., Ivancic, D., Chatterton, R. T., Jr., Rademaker, A. W., and Khan, S. A., 2011. In vitro human skin permeation of endoxifen: potential for local transdermal therapy for primary prevention and carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 3, 61-70.

21. Lima, H. C., Bleyenbergh, J. A., and Titus, R. G., 1997. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitol Today* 13, 80-82.
22. Macena, C., Ávila, D., Mattar, C., Daguer, E., Ruiz, R., and Filho, M., 2006. Uso do tamoxifeno no tratamento de quelóide. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba* 8, 18-24.
23. Machado, P. R., Ampuero, J., Guimaraes, L. H., Villasboas, L., Rocha, A. T., Schriefer, A., Sousa, R. S., Talhari, A., Penna, G., and Carvalho, E. M., 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e912.
24. Magnusson, B. M., Anissimov, Y. G., Cross, S. E., and Roberts, M. S., 2004. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J Invest Dermatol* 122, 993-999.
25. Mansel, R., Goyal, A., Nestour, E. L., Masini-Eteve, V., and O'Connell, K., 2007. A phase II trial of Afimoxifene (4-hydroxytamoxifen gel) for cyclical mastalgia in premenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 106, 389-397.
26. Melaku, Y., Collin, S. M., Keus, K., Gatluak, F., Ritmeijer, K., and Davidson, R. N., 2007. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg* 77, 89-94.
27. Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Andreoli, W. K., Mortara, R. A., and Uliana, S. R., 2007. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. *J Antimicrob Chemother* 60, 526-534.
28. Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., and Uliana, S. R., 2008. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e249.
29. Miguel, D. C., Zauli-Nascimento, R. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Katz, S., Barbieri, C. L., and Uliana, S. R., 2009. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother* 63, 365-368.
30. Miranda-Verastegui, C., Tulliano, G., Gyorkos, T. W., Calderon, W., Rahme, E., Ward, B., Cruz, M., Llanos-Cuentas, A., and Matlashewski, G., 2009. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e491.
31. Modabber, F., Buffet, P. A., Torreele, E., Milon, G., and Croft, S. L., 2007. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. *Kinetoplastid Biol Dis* 6, 3.
32. Neves, L. O., Talhari, A. C., Gadelha, E. P., Silva Junior, R. M., Guerra, J. A., Ferreira, L. C., and Talhari, S., 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86, 1092-1101.
33. Odds, F. C., 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52, 1.
34. Ophaswongse, S. and Maibach, H. I., 1994. Alcohol dermatitis: allergic contact dermatitis and contact urticaria syndrome. A review. *Contact Dermatitis* 30, 1-6.
35. Pasquetti, A., Mota, W., Santos, M., and Brito, H., 2010. Uso do tamoxifeno no tratamento de quelóides e cicatrizes hipertróficas. Tamoxifen as treatment to keloids and hypertrophic scars. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 25, 372-378.
36. Paudel, K. S., Milewski, M., Swadley, C. L., Brogden, N. K., Ghosh, P., and Stinchcomb, A. L., 2010. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther Deliv* 1, 109-131.
37. Pecquet, C., Pradalier, A., and Dry, J., 1992. Allergic contact dermatitis from ethanol in a transdermal estradiol patch. *Contact Dermatitis* 27, 275-276.
38. Reimao, J. Q., Trinconi, C. T., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Miguel, D. C., Kalil, S. P., and Uliana, S. R., 2013. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. *J Microbiol Methods* 93, 95-101.
39. Reithinger, R., Aadil, K., Kolaczinski, J., Mohsen, M., and Hami, S., 2005. Social impact of leishmaniasis, Afghanistan. *Emerg Infect Dis* 11, 634-636.
40. Rouanet, P., Linares-Cruz, G., Dravet, F., Poujol, S., Gourgou, S., Simony-Lafontaine, J., Grenier, J., Kramar, A., Girault, J., Le Nestour, E., and Maudelonde, T., 2005. Neoadjuvant percutaneous 4-hydroxytamoxifen decreases breast tumoral cell proliferation: a prospective controlled randomized study comparing three doses of 4-hydroxytamoxifen gel to oral tamoxifen. *J Clin Oncol* 23, 2980-2987.

41. Sadeghian, G. and Nilforoushzadeh, M. A., 2006. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 45, 819-821.
42. Seifert, K. and Croft, S. L., 2006. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 73-79.
43. Singh, J., Garg, T., Rath, G., and Goyal, A. K., 2015. Advances in nanotechnology-based carrier systems for targeted delivery of bioactive drug molecules with special emphasis on immunotherapy in drug resistant tuberculosis - a critical review. *Drug Deliv*, 1-23.
44. Sonnevile-Aubrun, O., Simonnet, J. T., and L'Alloret, F., 2004. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci* 108-109, 145-149.
45. Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J., and Sindermann, H., 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38, 1266-1272.
46. Soto, J., Hernandez, N., Mejia, H., Grogl, M., and Berman, J., 1995. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. *Clin Infect Dis* 20, 47-51.
47. Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., Vaillant, M., Oliaro, P., and Murray, H. W., 2008. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis* 47, 1000-1006.
48. Trinconi, C. T., Reimao, J. Q., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Miguel, D. C., and Uliana, S. R., 2014. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 2608-2613.
49. van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., and Boelaert, M., 2010. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10, 184-194.
50. WHO, W. H. O., 2012. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, v-xii, 1-100.
51. Williams, A. C. and Barry, B. W., 2004. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 603-618.
52. Yardley, V., Croft, S. L., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A., and Chappuis, F., 2005. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* 73, 272-275.

APÊNDICE E - Espectros de massas das bandas A, B, C e D

Figura 1. Espectro de massas banda B. Lipídios totais eluídos da banda B proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons preponderantes referentes a m/z de 778 e 806 foram identificados como IPC-(d16:1/18:0) e IPC-(d18:1/18:0), respectivamente.

Figura 2. Espectro de massas banda A. Lipídios totais eluídos da banda A proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons preponderantes referentes a m/z de 598, 778, 796, 806 e 824 foram identificados como *lyso*-PI-(18:1), IPC-(d16:1/18:0), IPC-(t16:0/18:0), IPC-(d18:1/18:0) e IPC-(t16:0/20:0), respectivamente.

Figura 3. Espectro de massas banda C. Lipídios totais eluídos da banda C proveniente de extrato lipídico total de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com 10 μ M de tamoxifeno foram identificados por ESI-MS em modo negativo. Íons preponderantes referentes a m/z de 849 e 963 foram identificados como PI-(O-18:0/18:1) e PI-(18:0/18:1), respectivamente.