UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

EDUARDO SEIJI YAMAMOTO

Avaliação do potencial leishmanicida de fármacos que atuam na rota bioquímica de esteróis

SÃO PAULO
2019

EDUARDO SEIJI YAMAMOTO

Avaliação do potencial leishmanicida de fármacos que atuam na rota bioquímica de esteróis

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

SÃO PAULO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yamamoto, Eduardo Seiji
Avaliação do potencial leishmanicida de fármacos que atuam na rota bioquímica de esteróis / Eduardo Seiji Yamamoto. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Luiz Felipe Domingues Passero.

Descritores: 1.Leishmaniose 2.Leishmaniose visceral 3.Leishmaniose cutânea 4.Reposicionamento de medicamentos 5.Tratamento farmacológico 6.Antifúngicos

USP/FM/DBD-080/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus pais, Elisabete Mitiko Mori Yamamoto e Helio Kiyoshi Yamamoto, que sempre me apoiam em tudo e serão sempre meu “porto seguro” em minha vida.

Agradecimentos

A decisão de ingressar no mundo acadêmico é algo solitário e seu caminho longo e complicado. Porém, no caminho encontramos pessoas que nos apoiam e esse sentimento de solidão acaba. Gostaria de agradecer do pessoal da limpeza e segurança da FMUSP, por manterem sempre nosso ambiente de trabalho seguro e limpo, até a diretoria da faculdade, todos foram importantes de sua forma.

Agradeço aos meus pais Bete e Helio, por estarem sempre me apoiando nas decisões da minha vida e estarem lá nos meus momentos mais difíceis até agora. Todo seu suporte seja comprando uma tortinha quando chego em casa ou um conselho sempre serão lembrados.

Tive a sorte de encontrar um grande amigo e orientador, Dr. Luiz Felipe Domingues Passero, a quem serei eternamente grato pelo apoio intelectual e amizade. Foi a pessoa que abriu meu caminho no mundo da pesquisa e me acompanha desde o início da graduação.

Agradeço também a Dra. Marcia Dalastra Laurenti por sempre fornecer apoio a nós do laboratório seja burocrático ou abrindo sua casa para nos receber, sendo sempre muito atenciosa e oferecendo conselhos importantes na minha jornada acadêmica.

Serei eternamente grato a todos os professores da minha vida desde a “Tia Nora” do maternal, até os professores da universidade.

A todos os funcionários do LIM-50: Dra. Vania da Matta com seus conselhos e críticas construtivas; Dra. Claudia Gomes com conselhos e orientação; Edson Tadeu por todo suporte técnico e amizade e a Thaise Tomokane pelo apoio funcional do laboratório e técnico. À Lia por oferecer apoio administrativo quando precisava.

À Thaise gostaria especialmente de agradecer, por ter se tornado uma grande amizade, quem sempre está presente, escuta e dá conselhos, pelos dias até tarde da noite no laboratório e pelas risadas e dias de Sujinho.

Aos amigos de LIM-50, Adriana, Carmen, Gabriela, Jéssica, Juliana, Kadir e Wilfredo por dividirem seu tempo, comidas, cerveja e risadas comigo, até mesmo quem

já saiu, Ana Carolina, Bruno, Luis Fábio e Thais Bruna mas sempre estão aqui. Obrigado por me aturar e estarem sempre caminhando comigo.

À Jéssica e Adriana por serem irmãs do mesmo orientador e estarem sempre disponíveis para me auxiliar nos experimentos e dividirem a bancada comigo. Agradeço por todo o tempo de trabalho e as gordices divididas.

À Carmen e Gabriela por estarem sempre sorrindo mesmo estando longe de casa e passando dificuldade, vocês sempre dividem sua alegria e espanhol com a gente. Além de sempre se proporem a ajudar.

Ao Prof. Dr. João Lago por oferecer a estrutura de seu laboratório, e às suas alunas, Juliana e Simone que ofereceram seu tempo e dedicação para me ajudar com meus experimentos.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro recebido no projeto e acreditar em minha pesquisa (2015/17623-6).

Finalmente, mas não menos importante, a todos os meus amigos do Arqui que estão comigo há mais de 15 anos e tenho certeza que me acompanharão para o resto da minha vida.

“*Qualquer um que tenha inteligência e coragem de agir pelo benefício das pessoas de seu país é considerado um radical por aqueles contentes com a estagnação e dispostos a aguentar um desastre*”. (Hiromu Arakawa, Fullmetal Alchemist)

Sumário

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 3

1.1 Aspectos gerais 3

1.2 Formas clínicas de leishmaniose 5

1.3 Farmacologia das leishmanioses 11

1.4 Reposição de fármacos 16

2. OBJETIVOS 29

2.1 Objetivo geral 29

2.2 Objetivos específicos 29

3. MATERIAL E MÉTODOS 33

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa 33

3.2 Escolha dos fármacos 33

3.3 Animais experimentais 33

3.4 Parasitos 34

3.5 Avaliação do potencial leishmanicida dos fármacos 34

3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos 35

3.7 Avaliação do potencial dos fármacos em amastigotas intracelulares 36

3.8 Avaliação das alterações morfológicas e fisiológicas induzidas pelos fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato 37

3.9 Análise de alterações ultraestruturais 37

3.10 Avaliação da formação de poros na membrana celular 38

3.11 Avaliação de alteração do potencial transmembrana mitocondrial..... 39

3.12 Mudanças no pH interno de macrófagos hospedeiros 39

4. RESULTADOS..... 43

4.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos fármacos antifúngicos 43

4.2 Atividade anti-promastigota..... 43

4.3 Atividade anti-amastigota 47

4.4 Avaliação dos mecanismos de ação de fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato 50

4.5 Microscopia eletrônica de trasmissão (MET) 50

4.6 Avaliação da integridade de membrana celular e alterações do potencial mitocondrial 63

4.7 Produção de NO e H_2O_2 e alteração do pH intracelular..... 65

5. DISCUSSÃO 71

6. CONCLUSÃO 81

7. ANEXOS 85

7.1 ANEXO 1..... 85

7.2 ANEXO 2..... 86

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 97

Lista de Figuras

Figura 1: Diferentes estágios de vida de *Leishmania sp* (Aumento: 400×). (A) – Formas promastigotas de *Leishmania sp.* neste estágio de vida, os parasitos apresentam formato fusiforme e são móveis, possuindo um flagelo em sua porção anterior e podem ser encontradas nos intestinos do vetor. (B) – As formas amastigotas (seta preta) são imóveis, têm forma arredondada e não possuem flagelo, sendo encontradas parasitando as células fagocitárias do hospedeiro vertebrado. fixadas e coradas por Giemsa Fonte: B – Dr. Luiz Felipe Domingues Passero. 4

Figura 2: Esquema ilustrado do ciclo de vida de *Leishmania* sp. no vetor e em seres humanos. Após a ingestão de sangue pelo vetor de um hospedeiro infectado, as células infectadas com amastigotas ingeridas se diferenciam em promastigotas e migram para a probóscide do flebotomíneo, estando prontas para infectar novos indivíduos (i). Então, em novo respasto, as promastigotas infestam um novo hospedeiro e são fagocitadas por células do sistema imune. Ao serem fagocitados, os parasitos se diferenciam novamente em amastigotas, multiplicam-se e invadem novas células. O diagnóstico (d) é feito neste estágio. Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention* (CDC). 5

Figura 3: Formas clínicas de leishmaniose. A – Leishmaniose cutânea localizada é o quadro mais comum e apresenta uma lesão simples, local e ulcerada; B – Exemplo de lesão causada ao palato que pode ocorrer em um quadro de leishmaniose mucocutânea; C – Leishmaniose cutânea disseminada ou *borderline* causa lesões verrucosas em algumas partes do corpo; D – Paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa, as lesões são nodulares e se encontram espalhadas pelo corpo todo; E – Paciente com leishmaniose visceral apresenta hepatoesplenomegalia visível externamente. Fonte: Fotos gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Tobias Silveira. 8

Figura 4: Esquema ilustrativo das respostas imunes em uma infecção por *Leishmania* sp. A presença de citocinas do tipo Th1 (ex.: IFN-γ e IL12) durante a apresentação de antígenos faz com que haja um quadro de

resistência ao parasito, pois estas citocinas ativam os mecanismos de eliminação dos leucócitos (ex.: liberação de espécies reativas de oxigênio, como nitratos). Por sua vez, um estímulo do tipo Th2 (ex.: IL-4 e IL-10) leva a um quadro de suscetibilidade com a presença de lesão. MHC – Complexo principal de histocompatibilidade; Th0 – linfócito T *naïve*; B – linfócitos B; TNK – célula *natural killer*; Tc – linfócito T $CD8^+$; Ig – Imunoglobulina; Reg: resposta regulatória. Fonte: Adaptado de (PASSERO; LAURENTI; SANTOS-GOMES, 2011) 10

Figura 5: Via bioquímica da síntese de ergosterol em tripanosomatídeos, setas vermelhas indicam vias bloqueadas por fármacos. Legenda - 1: Lanosterol; 2: 24-metilenodiidrolanosterol; 3: 4α,14α-dimetilcolesta-8,24-dien-3β-ol; 4: 4α,14α-dimetilergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 5: 14α-metilcolesta-8,24-dien-3β-ol; 6: 14α-metilergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 7: Zimosterol (colesta-8,24-dien-3β-ol); 8: Ergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 9: Colesta-7,24-dien-3β-ol; 10: Ergosta-7,24(24^1)-dien-3β-ol; 11: Colesta-5,7,24-trien-3β-ol; 12: Ergosta-5,7,24(24^1)-trien-3β-ol; 13: Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol). Legenda dos fármacos.I: Rosuvastatina; II: Tolnaftato; III: Naftifina; IV: Voriconazol; V: Tioconazol; VI: Fenticonazol; VII: Nistatina. Legenda das enzimas – SEO: Esqualeno-2,3-epoxidase; HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase; SMT: Δ^{24}- Esterol metiltransferase; 14-DM: 14α-metilesterol 14-demetilase. Adaptado de (ROBERTS et al., 2003). 21

Figura 6: Esquema ilustrativo 2D da estrutura química da rosuvastatina sódica, forma que é vendida comercialmente, medicamento utilizado para o controle da hipercolesterolemia e que age bloqueando a enzima HmG-CoA redutase. Na^+: cátion sódio; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; F – Flúor; S – Enxofre. Adaptado de (GALIULLINA et al., 2019). 23

Figura 7: Esquemas ilustrativos 2D das estruturas químicas dos fármacos inibidores da enzima SEO. (II) – Tolnaftato; (III) – Naftifina; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; S – Enxofre. Adaptados de (ABONIA et al., 2018; TANG et al., 2006). 24

Figura 8: Esquemas em 2D das estruturas químicas dos fármacos triazóis inibidores da enzima 14DM/CYP51. (IV) – Tioconazol; (V) – Voriconazol; (VI) – Fenticonazol. Cl – Cloro; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; F – Flúor; S – Enxofre. Adaptado de (JEFFREYS et al., 2019)..... 24

Figura 9: Esquemas em 2D das estruturas químicas dos fármacos polienos nistatina (VII) e para comparação, o fármaco padrão anfotericina B (VIII). H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio. Adaptado de (CAFFREY et al., 2008)..... 25

Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica (ME) do grupo controle. A – Aspecto geral de formas promastigotas controle. O parasito mantém seu aspecto fusiforme, sem apresentar alterações de membranas ou de organelas. (Aumento: ×25k); B – Detalhe do núcleo (N), a membrana nuclear está íntegra e cromatina se encontra frouxa. (Aumento: ×15k); C – Detalhe da bolsa flagelar (BF) e cinetoplasto (K). O flagelo (F) está íntegro e não há alterações de membrana na bolsa flagelar e cinetoplasto. (Aumento: ×20k)..... 50

Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos incubados por 24h com a CE_{50} de fenticonazol. A – O parasito perdeu sua forma fusiforme por completo, e já tem sua membrana celular rompida em parte (seta). A mitocôndria (M) parece ter perdido sua forma (Aumento: x30k); B – Outro parasito, mas este já apresenta rompimento da membrana mitocondrial (seta) e um vacúolo (V) o qual ocupa a maior parte do citosol (Aumento: x40k); C e D – Promastigota aparentemente com a forma fusiforme intacta, porém apresenta descolamento do citosol com a membrana celular, visto em maior detalhe em D, apontado pela seta. Adicionalmente, o núcleo (N) apresenta cromatina bastante condensada (Aumento: C – 12k e D – 30k)..... 52

Figura 12: Figuras mostrando a ME do grupo tratado com CE_{50} da nistatina e incubado por 6h. Os parasitos tratados com a droga apresentaram uma série de alterações estruturais nas organelas, principalmente nas membranas. A – O parasito perdeu seu formato fusiforme e se apresenta mais esférico. O núcleo (N) tem sua cromatina condensada e o citoplasma possui vacúolos (V). Apesar dos microtúbulos subpericulares não

possuírem alterações (setas cinzas), a membrana externa tem formação de bolhas (setas vermelhas) (Aumento: ×30k); B – Em detalhe o cinetoplasto (K) apresentando lise de membrana (seta vermelha). Dentro do vacúolo podemos encontrar formações mielínicas (FM) características da digestão de lipídeos (Aumento ×100k); C – Em maior detalhe, o vacúolo (V) tem suas membranas rompidas (seta preta) (Aumento: ×30k); D – Em maior detalhe, temos a formação de vacúolos (V) com formações mielínicas seu interior (FM). Um dos vacúolos teve sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×60k) 54

Figura 13: Microscopia eletrônica dos grupos tratados com CE_{50} de nistatina e incubadas por 24h. Em ambas figuras, os parasitos perderam todo o seu formato e é praticamente impossível distinguir suas organelas internas. A – A membrana celular se encontra totalmente rompida e o parasito perdeu completamente sua forma (Aumento: ×40k); B – Apesar de ainda possuir membrana, a mesma aparenta apresentar muitos poros, não sendo possível distinguir em nada no interior do citoplasma (Aumento: ×60k). ... 55

Figura 14: Microscopia eletrônica dos grupos tratados com CE_{50} de tioconazol e incubados por 6h. A – O parasito perdeu sua forma normal, além de apresentar um núcleo (N) com a membrana rompida e vários vacúolos (V) no citoplasma. A mitocôndria (M) tem parte de sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×25k); B – Observa-se perda da forma fusiforme, porém não há alterações de microtúbulos subpericulares (seta cinza), adicionalmente existem alterações no citoplasma, como a presença de vacúolos (V). O núcleo (N) não aparenta estar envolvido por membrana assim como o cinetoplasto (K) (Aumento: ×40k); C – Detalhe da mitocôndria com sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×80k); D – Detalhe de B, o cinetoplasto (K) aparenta ter perdido sua membrana (Aumento: ×60k). 56

Figura 15: Microscopia eletrônica do grupo tratado com CE_{50} de tioconazol e incubado por 24h. Em ambos os casos, podemos ver que as membranas internas, constituídas por ergosterol, estão praticamente digeridas e sobrando apenas os microtúbulos subpericulares (seta cinza) e restos de

organelas de material mais eletro-denso (setas pretas). A – Aumento ×30k; B – Aumento ×40k. 57

Figura 16: Imagens de MET de parasitos incubados por 48h com a CE_{50} de tolnaftato. De maneira geral, apresenta perda de forma fusiforme e uma série de alterações na membrana celular, citoplasma e organelas. A – Aspecto geral do parasito. A membrana celular apesar de intacta apresenta bolhas (setas). O conteúdo citoplasmático aparenta estar íntegro, bem como as membranas do núcleo (N) e mitocôndria (M). O núcleo apresenta cromatina condensada e a mitocôndria aparenta ter perda de organização interna e inchaço (Aumento: x25k); B – Em detalhe, bolha da membrana celular (seta) (aumento: x100k); C – Aspecto geral do parasito, perda de alongamento e forma fusiforme, núcleo com cromatina densa e mitocôndria com danos às cristas e perda de forma (Aumento: x25k); D – Outro exemplo geral de parasito, neste é possível observar a formação de vacúolo (V) no citoplasma, e em maior detalhe danos à mitocôndria. Núcleo novamente com material condesado (Aumento: x20k)..... 59

Figura 17: Microscopia eletrônica das promastigota incubadas com CE_{50} do voriconazol por 48h. A – O parasito apresentou perda da forma fusiforme e vacúolos (V) no citoplasma. Observam-se também alterações no formato geral da mitocôndria (M) e a cromatina está condensada no núcleo (N) (Aumento: ×25k); B – Novamente, o parasito perdeu seu aspecto fusiforme, porém os microtúbulos não apresentam alterações (seta cinza). O citoplasma também possui vacúolos (V). A cromatina nuclear também está condensada em N. As mitocôndrias (M) e cinetoplasto (K) perderam seus aspectos normais e apresentam sinais de degeneração; (Aumento: ×25k). 61

Figura 18: Figuras de microscopia eletrônica de promastigotas incubadas por 24h com CE_{50} de anfotericina B. A – Formato geral do parasito não apresenta alterações, entretanto se pode observar vacuolização interna (V) e presença de formações mielínicas (FM). Não houve maiores danos a estrutura do kDNA (K), porém o material genético do núcleo (N) apresenta cromatina condensada (Aumento: ×10k); B – Detalhe em maior

aumento dos vacúolos encontrados no citoplasma. Houve formações mielínicas (FM) típicas de degradação de ergosteróis (Aumento: ×40k); C – Destaque da mitocôndria (M) que aparenta estar com a membrana intacta e sem maior perda de forma. Detalhe de uma FM típica com as cadeias lipídicas espiraladas (Aumento: ×40k). 63

Figura 19: A perturbação de membrana celular dos parasitos tratados com as CE50 de fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB) foi investigada usando a sonda SYTOX Green®, utilizando-se Triton X100 como indutor de lesão de membrana. Não foram observadas maiores mudanças nas membranas celulares quando comparado ao observado do controle positivo (+) 64

Figura 20: O potencial transmembrana mitocondrial dos parasitos tratados com CE50 de fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB) foi investigado utilizando-se da sonda Rodamina 123; a oligomicina (5) foi utilizada como controle positivo (Controle +) devido a sua habilidade de inibir o potencial transmembrana mitocondrial. 65

Figura 21: Macrófagos infectados e tratados com as CE50 do fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB). Apenas Fen apresentou diferença significativa quando comparados aos controles. Os controles negativos são controles de macrófagos infectados (Inf) ou não-infectados (NI) que não receberam nenhum tipo de composto durante sua incubação. Os controles positivos (Inf controle + e NI controle + foram células infectadas (Inf) ou não (NI) as quais foram incubadas juntamente com um conhecido alcalinizante citoplasmático, o $NHCl_4$. 67

RESUMO

Yamamoto ES. *Avaliação do potencial leishmanicida de fármacos que atuam na rota bioquímica de esteróis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* sp. e transmitida por vetores. Esta doença pode apresentar formas clínicas que variam de lesões cutâneas simples que podem desaparecer espontaneamente até a forma visceral, a qual acomete órgãos como baço, fígado, medula óssea e linfonodos, e pode levar a morte se não tratada corretamente. Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde as leishmanioses são endêmicas em 98 países. O tratamento ainda é feita principalmente com dois medicamentos, os antimoniais pentavalentes e anfotericina B, os quais causam uma série de efeitos secundários, além disso, relatos de resistência a esses fármacos têm sido publicados. Além disso, medicamentos alternativos aprovados para uso, como a miltefosina e pentamidina, também possuem sérios efeitos colaterais e nem sempre são efetivos para todas as espécies do parasito e/ou formas clínicas. Estes fatos demonstram que é necessário o desenvolvimento de fármacos alternativos para a quimioterapia das leishmanioses. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos se mostra como uma importante estratégia para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose, pois fármacos já liberados para o uso em humanos podem ser reutilizados, diminuindo o tempo de desenvolvimento e custos empregados para o desenvolvimento de novos fármacos. *Leishmania* sp. possui como um dos principais lipídios o ergosterol, cuja rota metabólica é complexa e envolve uma série de enzimas, as quais, se corretamente bloqueadas poderão suprimir a produção do ergosterol e, portanto, a viabilidade de parasitos. Considerando estes aspectos, o presente estudo objetivou investigar a ação leishmanicida de fármacos que possuem ação inibitória em enzimas da via de esteróis como o fármaco anti-hiperlipidêmico rosuvastatina (inibidor da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase) e, os antifúngicos voriconazol, tiaconazol, fenticonazol (inibidores da enzima 14α-metilesterol 14-demetilase), naftifina e tolnaftato (inibidores da enzima esqualeno epoxidase), e por fim a nistatina que age diretamente sobre ergosterol. O potencial contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* foram avaliados, e então foram investigadas possíveis alterações ultraestruturais, fisiológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (formação de poros de membrana, e alteração do potencial de membrana mitocondrial) ou nas células hospedeiras (produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, e mudanças no pH intracelular). O fenticonazol, tioconazol, nistatina e o tolnaftato foram capazes de eliminar as formas promastigotas e amastigotas intracelulares, sendo a nistatina, o tolnaftato e o fenticonazol os mais seletivos para amastigotas das três espécies de parasitos estudados. Por outro lado, rosuvastatina, voriconazol e a naftifina não apresentaram ação contra formas amastigotas intracelulares. Além disso, os fármacos com atividade leishmanicida alteraram morfologicamente e fisiologicamente a mitocôndria do parasito. Apesar de não haver estímulo da produção de H_2O_2 ou NO por parte dos fármacos analisados, o fenticonazol foi capaz de alcalinizar macrófagos hospedeiros infectados. Considerando que estes fármacos foram capazes de inibir o crescimento de multi-espécies do parasito no interior dos macrófagos, esses resultados sugerem que medicamentos antifúngicos podem ser interessantes alvos para reposicionamento da quimioterapia das leishmanioses tegumentar e visceral.

Descritores: leishmaniose; leishmaniose visceral; leishmaniose cutânea; reposicionamento de medicamentos; tratamento farmacológico; antifúngicos.

ABSTRACT

Yamamoto ES. *Evaluation of the Leishmanicidal Potential from Drugs which Act in the Sterols Biochemical Pathway* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Leishmaniosis is a neglected disease caused by parasitic protozoa belonging to the genus *Leishmania* sp. and transmitted by vectors. This disease presents different clinical forms ranging from single lesion, that can heal spontaneously, to the visceral form, that affects the spleen, liver, bone marrow and lymph nodes, and may lead to death if not properly treated. Additionally, according to the World Health Organization, leishmaniosis is endemic to 98 countries. The treatment is still carried out with two main drugs, antimonials and amphotericin B that induce side effects; in addition, reports about the emergence of parasite resistance have been published. Besides, alternative drugs such as miltefosine and pentamidine still have serious side effects and are not always effective to treat all *Leishmania* species and/or clinical form. In this regard, drug repurposing has been considered an important strategy to develop new therapeutic alternatives to leishmaniasis chemotherapy, since drugs already approved to human use may be reused, decreasing time and costs needed for the research of new drugs. *Leishmania* sp. possesses ergosterol as the main membrane lipid, and the metabolic pathway to produce this lipid is complex and involves different enzymes, which if correctly inhibited may suppress ergosterol production and, therefore, parasite viability. Considering these aspects, the aims of this study is to investigate the leishmanicidal potential of drugs who inhibit enzymes of the ergosterol pathway, such as the anti-hyperlipidemic drug rosuvastatin (inhibitor of the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase), the antifungals voriconazole, tioconazole, fenticonazole, (inhibitors of the 14α-methylsterol 14-demethylase), naftifine and tolnaftate (inhibitors of squalene epoxidase), and nystatin, that acts directly on ergosterol. The anti-promastigote and anti-amastigote potentials of drugs against *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* were evaluated; ultrastructural and physiological alterations of *L. (L.) amazonensis* promastigotes (membrane pore formation and mitochondrion membrane potential alterations) and host macrophages (nitric oxide and hydrogen peroxide productions and changes to intracellular pH) were investigated. Fenticonazole, tioconazole, nystatin and tolnaftate were capable to eliminate promastigote and amastigotes, being the most selective drugs nystatin, tolnaftate and fenticonazole to all studied species amastigotes. Rosuvastatin, voriconazole and naftifine were unable to eliminate amastigote forms. Furthermore, the drugs that possess leishmanicidal effects affected parasite mitochondrion. Although these drugs did not trigger the production of H2O2 or NO, fenticonazole was able to alkalinize host infected macrophages. Considering these drugs were able to inhibit multiple species of the parasite growth in macrophages, these results suggest that antifungal drugs can be interesting targets to be repurposed in the cutaneous and visceral leishmaniasis.

Descriptors: leishmaniasis; leishmaniasis, visceral; leishmaniasis, cutaneous; drug repositioning; drug therapy; antifungal agents.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose se refere às doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Ordem: Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae) e que infectam diferentes vertebrados como canídeos, felinos, marsupiais, raposas, roedores e humanos (ANTONIOU et al., 2013; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; LARA-SILVA et al., 2015). A doença está presente em 98 países ao redor do mundo, abrangendo praticamente todos os continentes, com exceção dos polos e Oceania (ALVAR et al., 2012). Apesar dessa ampla distribuição, cerca de 90% dos novos casos da forma visceral reportados ocorrem entre apenas 13 países, sendo eles: Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria. Para a forma cutânea, 95% dos casos são concentrados nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, sendo que dentro desta porcentagem, dois terços dos casos estão concentrados em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Estima-se que entre 0,9 e 1,7 milhões de pessoas são infectadas anualmente e aproximadamente 20 a 30 mil pessoas morrem por conta das diferentes formas clínicas desta doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

Os quadros da doença variam de acordo com a espécie infectante e da interação parasito-hospedeiro, dentre esses quadros há a leishmaniose cutânea localizada que apresenta uma lesão simples que pode apresentar cura espontânea, até quadros graves como a forma visceral, a qual acomete principalmente o fígado e baço e linfonodos; e a mucocutânea, a qual destrói tecidos, por exemplo do palato e nariz (KAYE; SCOTT, 2011; VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015). Além desses quadros, há formas clínicas mais raras, como a leishmaniose *borderline*, cujas as lesões são nódulos verrucosos em partes do corpo, e finalmente, o quadro de cutânea anérgica difusa, onde ocorrem lesões nodulares espalhadas pelo corpo (DE ASSIS et al., 2012; MCCALL; MCKERROW, 2014; MONDOLFI et al., 2013; MURRAY et al., 2005).

A leishmaniose é transmitida por um inseto vetor, conhecido como flebotomíneo, que são insetos classificados taxonomicamente na ordem Diptera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo que os gêneros principais vetores da doença são

Lutzomyia no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Há também, formas pouco usuais de transmissão reportadas como picadas de pulga, compartilhamento de seringas e transfusão de sangue (BELO et al., 2013; COLOMBO et al., 2011). No trato digestivo do inseto vetor, as amastigotas se diferenciam em promastigotas (Figura 1A), que possuem morfologia fusiformes, são flageladas e têm motilidade. O inseto se torna um vetor da doença, primeiro ao se alimentar de um hospedeiro infectado, e ao realizar o repasto de um indivíduo infectado, o vetor ingere formas amastigotas (Figura 1B) de *Leishmania*, neste estágio, o parasito é ovalado e com pouca motilidade.

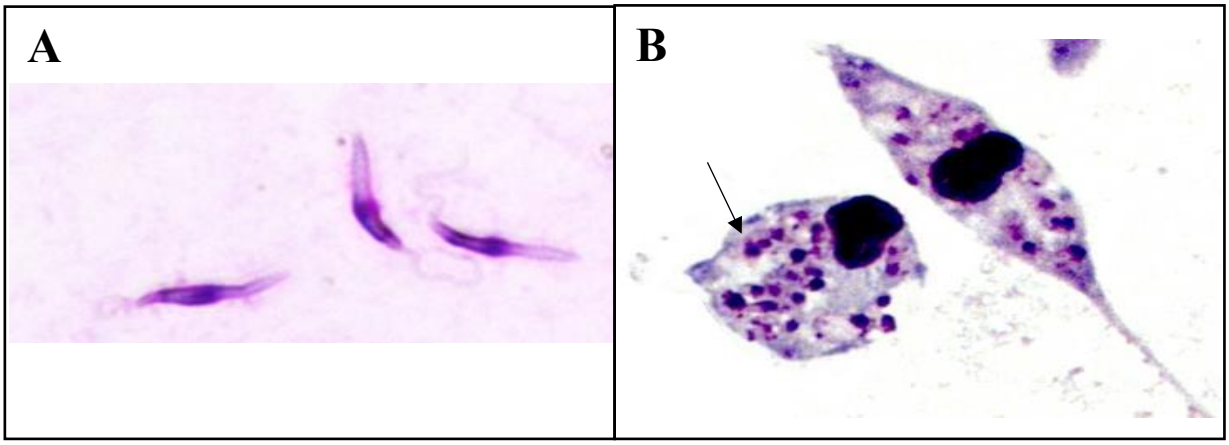

Figura 1: Diferentes estágios de vida de *Leishmania sp* (Aumento: 400×). (A) – Formas promastigotas de *Leishmania sp.* neste estágio de vida, os parasitos apresentam formato fusiforme e são móveis, possuindo um flagelo em sua porção anterior e podem ser encontradas nos intestinos do vetor. (B) – As formas amastigotas (seta preta) são imóveis, têm forma arredondada e não possuem flagelo, sendo encontradas parasitando as células fagocitárias do hospedeiro vertebrado. fixadas e coradas por Giemsa Fonte: B – Dr. Luiz Felipe Domingues Passero.

Os parasitos então se multiplicam no tubo digestório do inseto vetor, e após sua metaciclogênese migram para a probóscide do vetor, onde serão regurgitadas durante o repasto do inseto, infectando um próximo hospedeiro vertebrado (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; READY, 2014). O ciclo biológico do parasito está esquematizado na Figura 2.

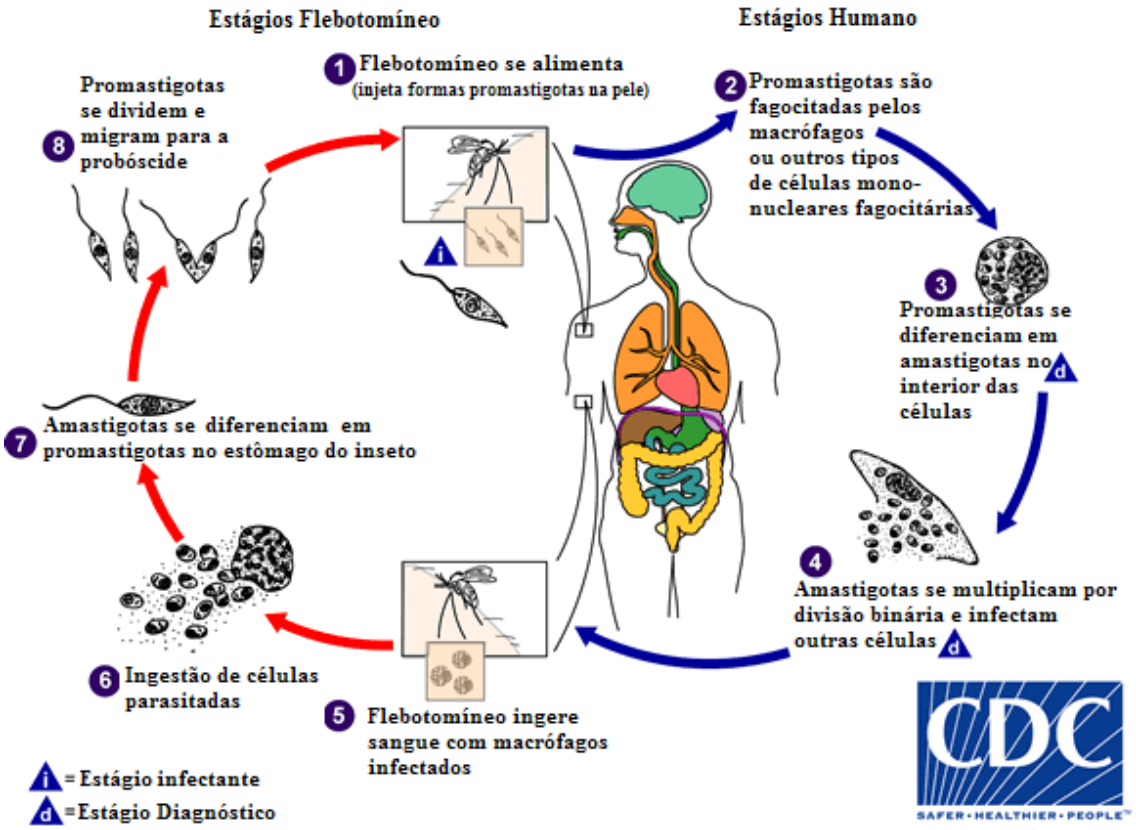

Figura 2: Esquema ilustrado do ciclo de vida de *Leishmania* sp. no vetor e em seres humanos. Após a ingestão de sangue pelo vetor de um hospedeiro infectado, as células infectadas com amastigotas ingeridas se diferenciam em promastigotas e migram para a probóscide do flebotomíneo, estando prontas para infectar novos indivíduos (i). Então, em novo respasto, as promastigotas infestam um novo hospedeiro e são fagocitadas por células do sistema imune. Ao serem fagocitados, os parasitos se diferenciam novamente em amastigotas, multiplicam-se e invadem novas células. O diagnóstico (d) é feito neste estágio. Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention* (CDC).

1.2 Formas clínicas de leishmaniose

As leishmanioses podem ser divididas em diferentes formas clínicas. Dentre elas, a mais comum é a leishmaniose cutânea localizada (LCL). Esta forma se manifesta como uma ou mais lesões localizadas próximas ao local de repasto sanguíneo do vetor, tais lesões podem se curar espontaneamente ou levar a destruição e desfiguramento dos tecidos cutâneos (Figura 3A). Seus agentes etiológicos são quaisquer membros dos sub-gêneros neotropicais *Viannia* e *Leishmania*, mas *Leishmania (Viannia) braziliensis* é

considerado o mais importante parasito associado com a doença nas Américas (PIRES et al., 2014). Além dessas características, alguns pacientes apresentam as lesões ulceradas, mas também nódulos, lesões verrucosas e pápulas, levando a crer que a LCL seja um tipo de doença dérmica polimórfica (LEZAMA-DÁVILA et al., 2014; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Como as lesões da LCL podem desaparecer sozinhas, não retornando por meses até mesmo anos, os pacientes não recebem tratamento a menos que as lesões sejam severas, desfigurativas ou comprometam a sua saúde de alguma forma (SHARLOW et al., 2014). O tratamento anterior a esta fase de remissão da doença pode evitar a formação de cicatrizes, diminuir a possibilidade de volta das lesões e acelerar a resolução clínica. Os pacientes em geral desenvolverem uma reação de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania*, isto induz uma expansão dos linfócitos T reativos a *Leishmania*, e mesmo assim, o desenvolvimento da doença não é prevnido. A cicatrização das lesões é acompanhada pela diminuição de células inflamatórias e controle dos parasitos no local, porém é possível encontrar persistência parasitária e resposta imune ao parasito muito tempo após o tratamento mesmo na ausência de sintomas clínicos da doença. Quando a doença reincide, é normal as lesões se manifestarem no local original, mas também podem ocorrer nas membranas mucosas superiores e nas mucosas do trato respiratório, caracterizando o quadro de leishmaniose mucocutânea (LMC) (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013; SHARLOW et al., 2014).

A LMC é um quadro recorrente de LCL, após a cura das lesões os sintomas não se manifestam por meses e até anos depois da doença, porém há relatos de ocorrência junto com quadros de LCL. A LMC é caracterizada pela habilidade do parasito em realizar metástases através do sistema linfático ou do sangue, chegando a outras regiões do corpo e atingindo a mucosa. Em geral, os parasitos atingem primeiro a mucosa nasal com uma leve inflamação e bloqueio das vias nasais, seguido de ulcerações da mucosa nasal e perfuração de tecidos do septo (REITHINGER et al., 2007). Em alguns casos, os lábios, bochechas, palato mole, faringe ou laringe também podem estar envolvidos (LMC severa) (Figura 3B). Esse quadro da doença nunca se cura por si só e é bastante difícil de tratar, pois além das lesões há infecções bacterianas secundárias frequentes, tornando o quadro potencialmente fatal (REITHINGER et al., 2007; RICHTER et al., 2011).

Ainda há duas formas clínicas comuns, conhecidas como a leishmaniose cutânea *borderline* e anérgica difusa. A forma borderline é um quadro de leishmaniose cutânea, onde as lesões ocorrem meses após a cura de um quadro de LC e apresentam lesões disseminadas pelo corpo com características nodulares ou verrucosas, ou mesmo infiltrativas, podendo raramente estar acompanhadas de uma supressão dos mecanismos imunes mediados por células nos pacientes (Figura 3C), e esta forma é causada por *L. (V). braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*. A leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) é um raro caso onde ocorre uma reação de imunodeficiência antígeno-específica mediada por células do paciente, causando lesões na pele semelhantes às lesões presentes em quadros de hanseníase (Figura 3D), e esta forma é causada por *L. (L.) amazonensis*. Estudos indicam que tais quadros clínicos não dependem somente da espécie infectante ao hospedeiro, mas também da interação com as suas características genéticas, bem como o seu estado de saúde. (BEAUMIER et al., 2013; MORRISON et al., 2010; MURRAY et al., 2005; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2005).

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, como é conhecida em algumas partes do globo, é uma forma potencialmente fatal caso não haja tratamento. Na América Latina, Europa e Norte da África é causada principalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum*, sendo que nas Américas alguns autores a consideram como sendo sinônimo de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (DANTAS-TORRES; LAINSON; RANGEL, 2006; MAURÍCIO IL, STOTHARD JR, 2000); no sub-continente indiano e Leste africano, a LV é causada por *Leishmania (Leishmania) donovani*. A doença se manifesta após um período de incubação entre 2 e 6 meses, e o paciente apresenta sintomas de infecção sistêmica persistente, tais como febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso, além desses sintomas há também invasão dos parasitos no sangue e no sistema retículo-endotelial presente em órgãos como linfonodos, baço e fígado, caracterizando a hepatoesplenomegalia (Figura 3E). A febre é associada a rigor e calafrios, podendo ser intermitente. A fadiga e fraqueza pioram com anemia, causada pela inflamação do baço, pois isto causa uma destruição maior dos eritrócitos no baço inchado e pode ser acompanhado por hemorragias internas, esse quadro pode evoluir com um agravamento do inchaço dos órgãos e hemorragias, associado a dores abdominais intensas (BRAZUNA et al., 2012; CHAPPUIS et al., 2007).

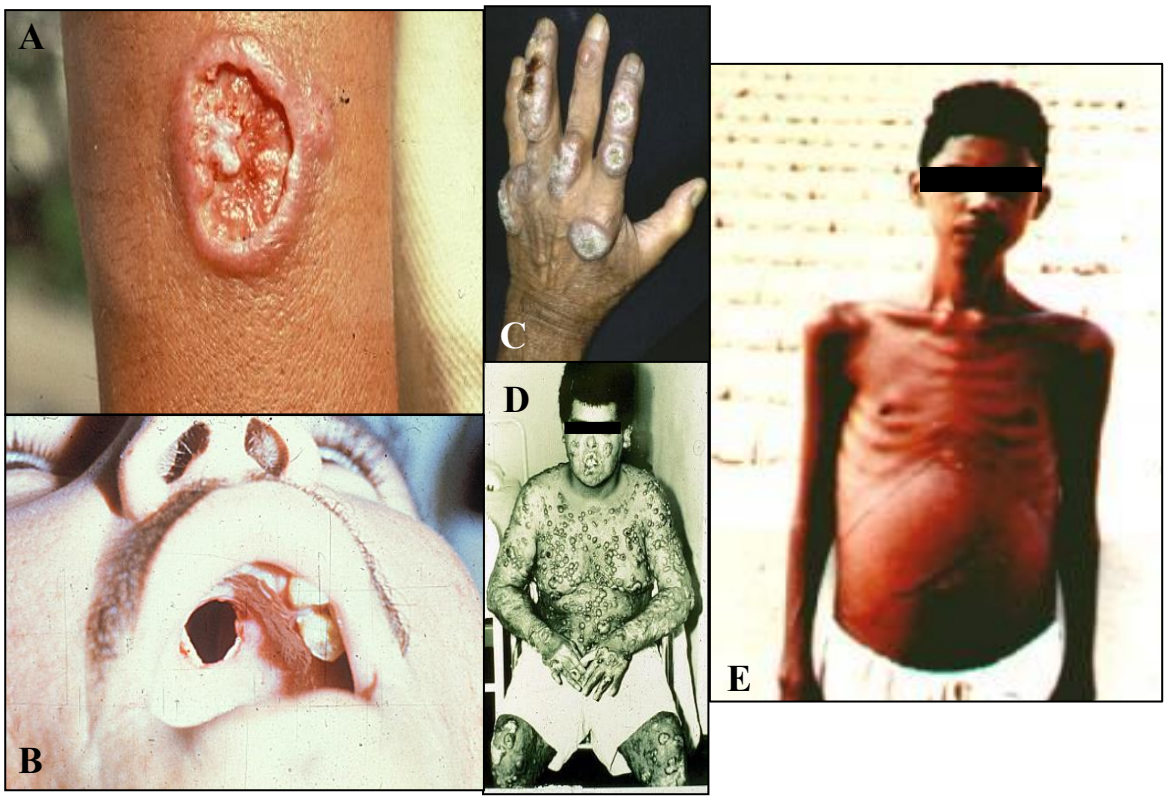

Figura 3: Formas clínicas de leishmaniose. A – Leishmaniose cutânea localizada é o quadro mais comum e apresenta uma lesão simples, local e ulcerada; B – Exemplo de lesão causada ao palato que pode ocorrer em um quadro de leishmaniose mucocutânea; C – Leishmaniose cutânea disseminada ou *borderline* causa lesões verrucosas em algumas partes do corpo; D – Paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa, as lesões são nodulares e se encontram espalhadas pelo corpo todo; E – Paciente com leishmaniose visceral apresenta hepatoesplenomegalia visível externamente. Fonte: Fotos gentilmente cedidas pelo Dr. Fernando Tobias Silveira.

Como dito anteriormente, a leishmaniose cutânea é uma doença a qual apresenta várias manifestações clínicas. A emergência das várias formas depende das características de seu vetor e do parasito infectante, aliadas às características genéticas e do estado de saúde do hospedeiro vertebrado. A diversidade da enfermidade está relacionada em humanos com a resposta imune que de uma maneira geral, podem ser caracterizadas com o desenvolvimento de uma resposta T auxiliar do tipo 1 (Th1) e/ou Th2. Sabe-se que os mediadores inflamatórios associados à resposta Th1, como interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral α (TNF-α) estão envolvidos com a resistência e eliminação dos parasitos, enquanto as citocinas do perfil Th2, como IL-4 e IL-10 estão relacionadas à persistência e patologia do parasito no hospedeiro vertebrado.

(DE ASSIS SOUZA et al., 2013; PEREIRA-CARVALHO et al., 2013; SALAIZA-SUAZO et al., 1999).

Quando há uma resposta imune do tipo Th1, os macrófagos ativados via IFN-γ são capazes de produzir nitratos e espécies reativas de oxigênio (ROs) e eliminar os organismos invasores, e portanto diminuindo a carga parasitária. Porém, os parasitos desenvolveram uma variedade de estratégias para sobreviver e proliferar no meio hostil das células hospedeiras, pois seus antígenos, como o lipofosfoglicano e metaloproteinase de 63kDa, são capazes de inibir a resposta inflamatória macrofágica, facilitando a sobrevivência do parasito em seu meio intracelular (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013; UZONNA; BRETSCHER, 2001; VIEIRA et al., 2013). A resposta imune à Leishmania está esquematizada na Figura 4.

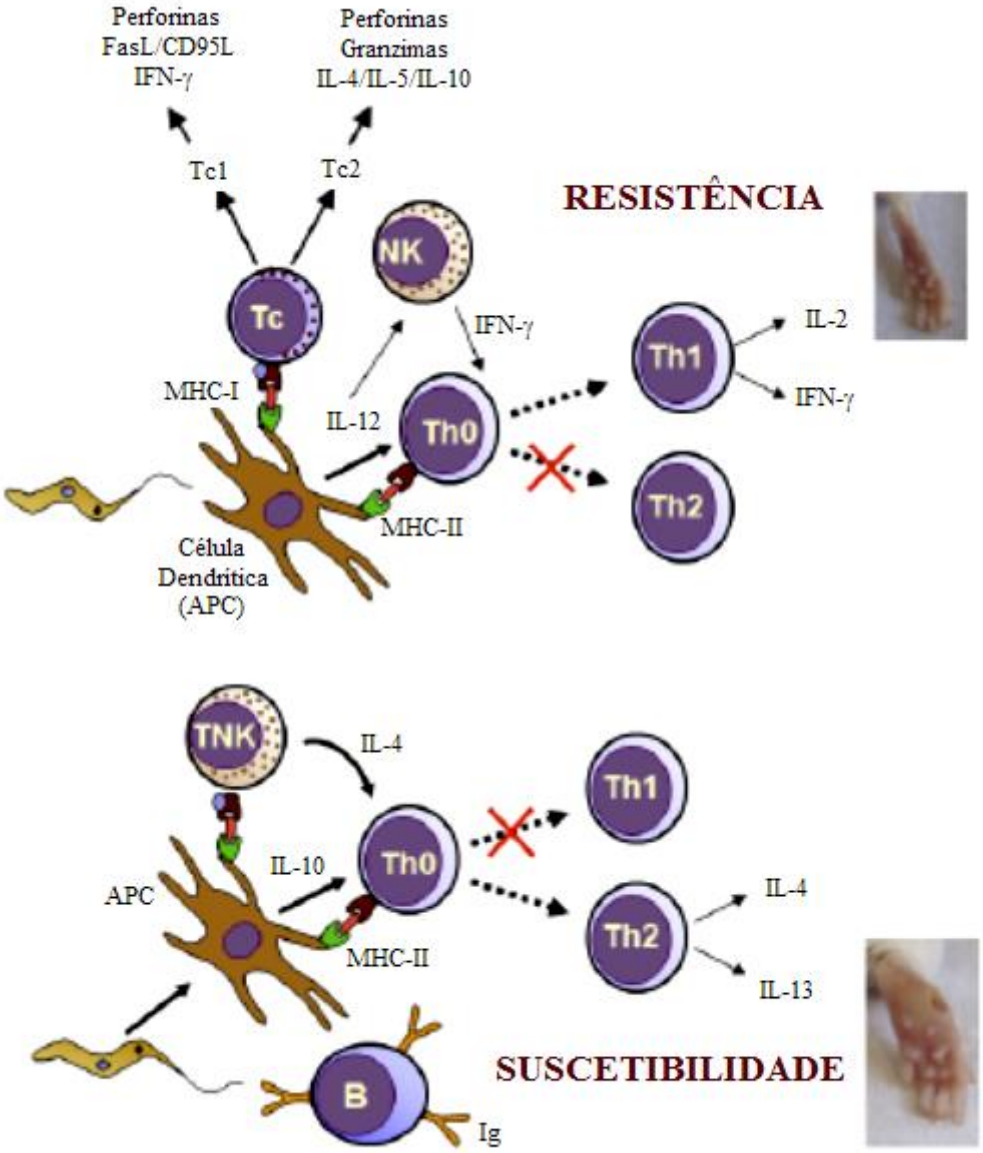

Figura 4: Esquema ilustrativo das respostas imunes em uma infecção por *Leishmania* sp. A presença de citocinas do tipo Th1 (ex.: IFN-γ e IL12) durante a apresentação de antígenos faz com que haja um quadro de resistência ao parasito, pois estas citocinas ativam os mecanismos de eliminação dos leucócitos (ex.: liberação de espécies reativas de oxigênio, como nitratos). Por sua vez, um estímulo do tipo Th2 (ex.: IL-4 e IL-10) leva a um quadro de suscetibilidade com a presença de lesão. MHC – Complexo principal de histocompatibilidade; Th0 – linfócito T *naïve*; B – linfócitos B; TNK – célula *natural killer*; Tc – linfócito T $CD8^+$; Ig – Imunoglobulina; Reg: resposta regulatória. Fonte: Adaptado de (PASSERO; LAURENTI; SANTOS-GOMES, 2011)

1.3 Farmacologia das leishmanioses

No contexto mundial, as leishmanioses representam uma importante enfermidade devido à sua distribuição, gravidade e complexidade ecológica, o que de fato representa um grande risco aos indivíduos que vivem nas regiões tropicais e subtropicais do globo.

Embora exista essa importância e complexidade, há poucas opções de tratamento direcionadas para todas as formas clínicas. Os tratamentos atuais com maior grau de efetividade são dois fármacos principais, descobertos na metade do século XX, e utilizados até os dias atuais, e mais recentemente em alguns países se utiliza a miltefosina e a paramomicina (PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013). E mesmo a eficácia destes medicamentos sendo considerada alta para a resolução clínica da doença, esta não é alcançada sem a indução de efeitos colaterais graves aos pacientes. Portanto, se reconhece a necessidade de se caracterizar novos fármacos com menor toxicidade e de igual efetividade.

Apesar dos fármacos apresentarem efetividade clínica, os ciclos de administração devem ser feitos por períodos extensos, e o paciente deve estar em observação médica durante toda a terapia, pois os medicamentos são administrados por via parenteral, a qual pode induzir uma série de efeitos colaterais graves aos pacientes (DE CARVALHO et al., 2013; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013).

A primeira linha de tratamento é feita com o antimonial pentavalente, o qual é utilizada desde 1940, sendo comercializados ou como Glucantime® (antimoniato de meglumina), ou como Pentostam® (estibogluconato de sódio). Embora *in vivo* seja efetivo, há diversos problemas relacionados ao seu uso, como por exemplo, sua alta toxicidade e necessidade de hospitalização (3 a 4 semanas), que é feito via parenteral em doses de 20 mg/kg. Por isso, quando inclusos os custos de hospitalização e somadas a todas as doses utilizadas no tratamento, mesmo os antimoniais podem ter um custo elevado de tratamento (KAFETZIS et al., 2005). O efeito tóxico inclui sintomas com artralgia, náusea, dores abdominais e pancreatite química, essa última em especial ocorre com maior frequência em pacientes coinfectados com HIV. Com todos esses efeitos colaterais, seu uso é restrito e não poderia ser usado em pacientes grávidas (GUERIN et al., 2002; KAFETZIS et al., 2005; MOTTRAM; COOMBS, 1985; SANTOS et al., 2008; TORRES et al., 2010).

Adicionalmente, há diversos relatos sobre a emergência de resistência parasitária aos antimoniais, sobretudo na Índia, onde os medicamentos são adquiridos com facilidade e utilizados sem a supervisão médica, fazendo com que o seu uso indiscriminado acabe induzindo pressão seletiva de parasitos mais resistentes. Outro fato que facilita o surgimento da resistência, está ligado ao alto grau de desistência dos tratamentos por conta dos longos períodos de hospitalização, fazendo com que os ciclos de administração não sejam completados, favorecendo o surgimento de cepas mais resistentes (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SUNDAR et al., 2000). Além disso, já foram encontrados parasitos do subgênero *Viannia* resistentes a este fármaco na Colômbia (ROJAS et al., 2006). Experimentos *in vitro* também conseguem induzir a resistência a medicamentos através de pressão seletiva a partir de espécies selvagens coletadas de pacientes, inclusive em algumas espécies do Novo Mundo como *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; TESSAROLLO et al., 2015) corroborando a hipótese de que tratamentos falhos podem gerar cepas resistentes a esse fármaco.

Quando ocorre falha no uso do antimonial para o tratamento da leishmaniose visceral, utiliza-se medicamentos de segunda escolha, tal como a anfotericina B, que é um antibiótico polieno usado, primariamente, como um antimicótico de amplo espectro. A anfotericina B (AmB) foi isolada pela primeira vez em 1955 a partir de uma cepa de *Streptomyces nodosus*. A AmB é utilizada em pacientes com AIDS coinfectados com doenças fúngicas e em pacientes com doenças sistêmicas causadas por fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fulmigatus*. A AmB é comercializada na forma injetável, porém possui baixa solubilidade em água devendo ser preparada em conjunto com desoxicolato de sódio (Fungizon®) e injetada via intravenosa. Para o tratamento das leishmanioses, é um medicamento altamente eficaz (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; GANGNEUX et al., 1996). Por exemplo, em um ciclo com regime de 1-5 dias, 14 dias e 21 dias de anfotericina B lipossomal IV com doses de 3 mg/kg/dia, há uma taxa > 90% de cura, e quando são feitos dois ciclos com regimes iguais ao anterior há ≥ 95% de cura nos casos onde há falha terapêutica dos antimoniais para leishmaniose visceral (GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2015; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Porém, assim como para os antimoniais, e apesar de pouco comuns, foram identificados parasitos resistentes a AmB na Índia (CHAPPUIS et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2011), e há experimentos em laboratório capazes de produzir a

resistência em *Leishmania mexicana* (AL-MOHAMMED; CHANCE; BATES, 2005). Adicionalmente, em algumas partes da África Oriental o tratamento com a anfotericina tem sido pouco eficiente (SUNDAR; SINGH, 2018).

Acredita-se que o mecanismo de ação da AmB esteja relacionado à sua capacidade em alterar os poros da membrana de seus alvos (fungos ou leishmania), pois apresenta uma atividade lipofílica, especialmente a ergosteróis e esteróis, lipídeos bastante comuns em membrana celular. O fármaco é capaz de se ligar a bicamada lipídica de membrana e criar poros em um primeiro momento cátion-seletivos e mais tarde se tornam parecidos a aquaporinas. Sem esses esteróis de membrana, a AmB perderia seu efeito, posteriormente, a interação com os esteróis levam a criação de canais de AmB transmembrana, fazendo a célula se tornar mais permeável a cátions, água e glicose, além de afetar as enzimas ligadas a membrana, levando por consequência a morte celular (BAGINSKI et al., 2005). Porém, há trabalhos indicando outras formas de morte celular em *Leishmania* (BAGINSKI; CZUB, 2009). Possivelmente, o mecanismo de ação da AmB é muito mais complexo. O dano induzido pela AmB na célula também está associado a efeitos oxidativos, além do movimento de íons descrito anteriormente (BRAJTBURG et al., 1990), por isso existe a hipótese de que AmB seria capaz de causar a auto-oxidação das células e por consequência liberar formas reativas de oxigênio (ROs), levando ao extenso dano celular observado nos parasitos (LAMP-FREUND; FERREIRA; SCHREIER, 1985).

Esta interação com as membranas celulares provavelmente leva aos efeitos adversos associados à anfotericina B, que são nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal, limitando o seu uso (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005). O tratamento com AmB é feito via intravenosa (IV), por isso a droga fica livre na corrente sanguínea e apresenta fraca seletividade quanto aos seus alvos, atingindo não somente a *Leishmania*, mas também as células do hospedeiro vertebrado. Isso limita seu uso em determinados pacientes, como gestantes e imunocomprometidos em estágio avançado de imunossupressão. O tratamento acaba criando a necessidade de manter os pacientes em observação constante durante todo o tratamento. Com isso tem se pesquisado bastante o uso de combinações com lipossomos e outras formas emulsificantes da AmB, com resultados bastante satisfatórios com a obtenção da cura clínica da doença bem como baixa toxicidade, em especial a diminuição de nefrotoxicidade e com efeitos secundários mais brandos. A camada lipídica do lipossomo facilita a assimilação pelo fígado e sua

posterior retirada da corrente sanguínea, diminuindo o seu tempo de circulação e, portanto, sua toxicidade diminui.

Apesar da anfotericina lipossomal não necessitar da hospitalização por ser menos tóxica, necessitar apenas dose única e da ação recente da OMS para subsidiar seu uso, já são reportados resultados terapêuticos variados dependendo da espécie infectante (RAMOS et al., 2019). Há ainda o risco do aparecimento de resistência no seu uso como monoterapia, como observada no caso da miltefosina e melhor discutida nos parágrafos abaixo. Apesar da tentativa da OMS em promover o uso de doses elevadas e únicas da lipossomal para evitar a utilização de muitas doses, selecionando e favorecendo a multiplicação de parasitos resistentes ao fármaco, sempre há possibilidade de não haver a cura completa do paciente e levando ao aparecimento de cepas resistentes como citado anteriormente (PONTE-SUCRE et al., 2017). Porém, a maior restrição associada ao uso da formulação lipossomal está na necessidade de instalações e transportes com temperatura fria para sua preservação, e isso limita drasticamente a sua distribuição em muitas localizações geográficas (HENDRICKX et al., 2017).

Nos últimos anos, o fármaco miltefosina (Milt) vem sendo caracterizado em relação à sua ação leishmanicida. A miltefosina é um medicamento antitumoral, o qual induz apoptose em células alvo através de sinalizações celulares lipídeo-dependentes, além disso, a droga ativa macrófagos infectados através da produção de citocinas do complexo Th1 podendo ser um componente auxiliar na eliminação de parasitos. Além disso, o tratamento pode ser feito através da via oral (DORLO et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2012). A monoterapia com a Milt começou a não apresentar bons resultados no tratamento de LV na Índia e Nepal onde é utilizada (OSTYN et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2017), isso tem a ver com a necessidade da utilização de muitas doses além do tempo de meio vida longo da droga, por isso o fármaco é utilizado em conjunto aos tratamentos padrões para diminuição da dose utilizada de ambos, reduzindo-se assim os efeitos colaterais indesejados e o aparecimento de cepas resistentes (COPELAND; ARONSON, 2015; HENDRICKX et al., 2017). No Brasil, o tratamento com Milt não é aprovado pelo Ministério da Saúde (MS), porém há estudos onde o sucesso varia de 50% até 91% dependendo da cepa isolada em testes *in vitro* ou mesmo para testes clínicos (ESPADA et al., 2017; SOTO et al., 2004), o que estaria longe do ideal para sua utilização como tratamento padrão.

Além da Milt, o uso da pentamidina, uma diamina aromática, é feita em alguns casos de resistência ao tratamento com antimoniais na Índia, apesar de seus efeitos colaterais. Esses efeitos colaterais incluem hipoglicemia, nefrotoxicidade e hipotensão (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Além disso, o tratamento com pentamidina nem sempre é eficiente para algumas espécies como *L. (V.) braziliensis*, e em um estudo de associação, a eliminação foi efetivamente por parte do uso dos antimoniais (ANDERSEN et al., 2005). Acredita-se que o mecanismo de ação deste fármaco esteja associado a interação na mitocôndria de Kinetoplastidae, entretanto seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido apesar de ser usada há bastante tempo (BASSELIN; LAWRENCE; ROBERT-GERO, 1996; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Por fim, apesar de não haver casos clínicos reportados de resistência ao fármaco, é possível induzir uma resistência artificial se utilizando de pequenas alterações na concentração do fármaco em cultura, e apesar de não bem compreendido, acredita-se que a resistência está associada a um mecanismo transportador de membrana mitocondrial em *Leishmania* (COELHO et al., 2007; MUKHERJEE et al., 2006).

Há ainda a paramomicina, que é um aminoglicosídeo utilizado oralmente para o tratamento de doenças causadas por parasitos entéricos (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). No tratamento tópico para a leishmaniose cutânea, a paramomicina apresentou efeitos colaterais brandos, como prurido e irritação local. Em alguns estudos, se usou uma pomada contendo 15% de paramomicina/12% metilbezentônio aplicados duas vezes ao dia de 3 a 6 semanas, porém com taxas de cura variando de 17 a 86% (ARANA et al., 2001; ARMIJOS et al., 2004; FAGHIHI; TAVAKOLI-KIA, 2003), tornando-o pouco recomendável para o considerar como tratamento padrão. Entretanto, em um estudo recente, sua utilização via oral em combinação com a Milt foi efetiva em hamsters infectados com *L. donovani*, vale ainda ressaltar que mesmo com o uso conjunto e prolongado das drogas, nenhum tipo de mudança na suscetibilidade das cepas *in vivo* ou *in vitro* foi observado (HENDRICKX et al., 2017).

Considerando toda a problemática envolvendo os fármacos disponíveis para a quimioterapia das leishmanioses, visto que mesmo o melhor dos tratamentos, a anfotericina lipossomal que possui a maior efetividade de tratamento e quase sem efeitos colaterais, ainda tem limitações indiretas de implementação que aumentam o seu custo e a sua utilização não surte efeito nas cepas de algumas regiões do planeta. Ainda há o risco associado à sua utilização como monoterapia no qual em longo prazo poderia ocasionar

na seleção de cepas resistentes ao fármaco, como ocorrido com a miltefosina. Com isso, o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de leishmaniose é urgente, e uma alternativa interessante está na reposição de fármacos.

1.4 Reposição de fármacos

De maneira geral, chama-se de reposicionamento o processo de encontrar drogas já aprovadas e demonstradas seguras para uso humano ou animal que possam ser utilizadas para outras finalidades, ou seja, é um processo no qual se encontra novas indicações para fármacos já aprovados (SHAHREZA et al., 2017). Vale ainda ressaltar que reposição, reproposição, redirecionamento, reenquadramento, reperfilamento de drogas e troca terapêutica são todos os possíveis nomes dado ao mesmo processo (WU; WANG; CHEN, 2013). Esta é uma interessante estratégia para encontrar tratamentos alternativos de leishmaniose, pois a produção de novos fármacos dura em média de 10 a 17 anos desde a sua pesquisa até as aprovações dos testes clínicos (EMMERT-STREIB et al., 2013) e quando ultrapassam este estágio apenas 10% são aprovados para uso de fato pelas agências regulatórias, além de apresentarem altíssimos custos (WENG et al., 2013).

O reposicionamento é extremamente atraente, pois as pesquisas podem ser desenvolvidas mais rapidamente e se tornam mais baratas, pois testes de farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade e tolerabilidade em humanos já foram efetuados, podendo levar a uma diminuição de até 12 anos no desenvolvimento de novas terapias com drogas reposicionadas (DUDLEY; DESHPANDE; BUTTE, 2011). Atualmente, sabe-se que o reposicionamento de fármacos tem apresentado resultados importantes, pois dos 51 novos tratamentos lançados comercialmente em 2009, aproximadamente 30% foram originados de reposicionamento (CHONG; SULLIVAN, 2007; GRAUL; CRUCES, 2011; TOBINICK, 2009).

O reposicionamento pode, muitas vezes, ocorrer ao acaso pela observação de efeitos secundários durante o desenvolvimento de novas drogas. O exemplo mais clássico e conhecido foi o da sildenafila, cujo desenvolvimento estava voltado para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar, mas durante os testes clínicos apresentou um efeito

secundário inusitado e se descobriu um uso potencial para droga no tratamento de disfunção erétil masculina, fazendo com que pesquisadores redirecionassem seu foco e mais tarde a sildenafila seria renomeada comercialmente como Viagra® pela Pfizer (GOLDSTEIN et al., 1998).

Uma maneira mais eficiente que o descobrimento ao acaso na identificação de compostos para uso alternativo está na compreensão e observação dos mecanismos e alvos de ação de uma droga, por exemplo o antidepressivo duloxetina, cujo efeito principal é a inibição seletiva da recaptação de serotonina, porém ao se compreender melhor seus mecanismos de ação, descobriu-se que a duloxetina pode ser indicada secundariamente também para o tratamento de incontinência urinária por estresse (THOR; KATOFIASC, 1995). Aliado a este conhecimento prévio dos alvos de uma droga, pode-se utilizar a bioinformática na busca, já que é bastante ineficiente analisar droga por droga em laboratório e observar seus efeitos em diferentes organismos, assim é possível restringir as possibilidades e focar de forma mais precisa e rápida na pesquisa pelo desenvolvimento de novos fármacos (COCKELL et al., 2010).

Existem inúmeras formas de se apontar potenciais fármacos para reposicionamento, todas com suas limitações e vantagens (SHAHREZA et al., 2017). Uma das formas mais simples é a pesquisa por alvo de drogas em bibliotecas ou literatura, e de fato, alguns estudos visando os alvos destas drogas têm apresentado resultados promissores na busca pelo reposicionamento de fármacos. Em um trabalho onde se buscou alternativas para o tratamento de giardíase, houve uma alta eficácia na busca inicial, a partir de uma biblioteca de drogas já produzidas em testes *in vitro*, sendo encontrados 43 possíveis fármacos promissores com alta seletividade para *Giardia lamblia* dos 72 pesquisados inicialmente (CHEN et al., 2011). Há inúmeros exemplos de buscas como estas, como por exemplo em uma dessas pesquisas, rapidamente se identificaram medicamentos bastante conhecidos como bitionol (droga vermicida), tacrolimo (imunossupressor) e floxuridina (droga antimetabólica usada em câncer cerebral) como possuindo alto potencial contra o fungo *Exserohilum rostratum* (SUN et al., 2013).

O reposicionamento também é bastante promissor no caso de câncer, onde a demanda por novas drogas é cada vez maior, tornando a procura por novas terapias a partir de outras pré-existentes bastante atrativa (YE; LIU; WEI, 2014). Por exemplo, uma

pesquisa rápida em outra biblioteca de drogas selecionou algumas para testes de acordo com o parâmetro escolhido pelos pesquisadores, esta biblioteca contém também algumas drogas já aprovadas pelo FDA (sigla em inglês: *Food and Drug Administration*) dos EUA para uso clínico. Em testes *in vitro*, muitas dos compostos mostraram atividade antitumoral sendo bastante seletivas para uma série de linhagens de diferentes carcinomas humanos (SHEN et al., 2013). Em outro exemplo de prospecção *in silico* de reposicionamento de fármacos por rede recente, foi demonstrado que o antibiótico pentamidina apresentou amplo efeito seletivo para células de câncer renal (ZERBINI et al., 2014).

No caso da leishmaniose, o reposicionamento de fármacos não é novo, como foram os casos da anfotericina B, miltefosina e paramomicina utilizadas fora do seu uso original em várias partes do mundo para o tratamento da doença onde há resistência ou falta de recursos. Visto isso, há uma série de vias metabólicas de *Leishmania* que podem ser inibidas com medicamentos disponíveis. Por exemplo, os fármacos capazes de interferir na rota bioquímica de esteróis apresentam um bom alvo para a busca de novos fármacos. Esta rota metabólica é similar à de fungos, e é por esta razão que alguns fármacos antimicóticos podem ser reposicionados nas leishmanioses. Justamente por isso que a anfotericina B, medicamento antifúngico desenvolvido para o tratamento de micoses invasivas (ex.: infecção por *Candida* ou *Aspergillus*), é utilizada no tratamento das leishmanioses (PAPPAS, 2014).

Uma série de estudos já foi efetuada buscando avaliar o reposicionamento de fármacos antifúngicos, cujo alvo é a via de biossíntese do ergosterol, em pacientes com leishmaniose. Um dos primeiros estudos avaliou a eficácia do cetoconazol em pacientes com lesões cutâneas e mucocutâneas (GOMEZ URCUYO; ZAIAS, 1982). Estes pacientes receberam uma dose via oral de 200 mg/dose/dia durante 3 meses. Com duas semanas após o início do tratamento, as lesões já se demonstravam menores e com sinais de cura. Antes de três meses, nenhum paciente demonstrava sinais da doença e o tratamento foi descontinuado, após o fim do tratamento, houve um acompanhamento do quadro dos pacientes e as lesões não reincidiram. Adicionalmente, em um outro estudo com o cetoconazol para o tratamento da leishmaniose cutânea do Velho Mundo, 89% dos pacientes tratados com o fármaco apresentaram cura completa, resultado significantemente maior que o controle com Glucantime® (SALMANPOUR, F HANDJANI, M K NOUHPIS, 2001).

De maneira similar, (DOGRA; SAXENA, 1996) avaliaram o potencial terapêutico do itraconazol em 20 pacientes com lesões únicas ou múltiplas, estes receberam dois comprimidos diários contendo 100 mg de itraconazol ou placebo. Após 15 dias, quatro dos pacientes tratados com itraconazol tiveram resposta clínica, enquanto nos pacientes do grupo placebo não houve resposta em nenhum paciente. Em seis semanas, apenas 2 pacientes do grupo itraconazol não responderam ao tratamento, enquanto no grupo placebo nenhum paciente teve cura espontânea.

A eficácia do fluconazol também foi avaliada na leishmaniose cutânea (ALRAJHI et al., 2002). Neste estudo, um grupo contendo 80 pacientes foi tratado com fluconazol e outro contendo 65 pacientes foi tratado com placebo, durante seis semanas utilizando uma dose diária de 200mg do fármaco. A condução deste estudo demonstrou que após três meses de acompanhamento 79% dos pacientes apresentaram cura completa. Mais recentemente, o potencial terapêutico do fluconazol foi reforçado na leishmaniose cutânea disseminada (DALY et al., 2014). Neste estudo, uma paciente venezuelana infectada com *L. (V.) braziliensis* não tolerava os efeitos colaterais do Glucantime®, e por sua vez, o tratamento oral com miltefosina não foi efetivo. Ainda, tratamentos locais não foram possíveis devido à extensão das lesões. Por esta razão, utilizou-se como medida alternativa, o uso oral de fluconazol (5 mg/kg/dia). Após 48h do início do tratamento, as lesões regrediram, e a paciente não apresentou efeitos colaterais ao fármaco empregado. Após 10 dias de tratamento, macerados dos fragmentos de lesões de pele não induziram doença em animais experimentais. Mesmo após três anos do início do tratamento não houve reincidência.

O efeito terapêutico destes fármacos ocorreu devido à similaridade entre as rotas bioquímicas de formação do ergosterol em fungos e parasitos do gênero *Leishmania*. Ou seja, inibir a formação deste esterol, que é um dos lipídios mais importantes para a formação das membranas biológicas de *Leishmania* sp. leva a alterações irreparáveis aos parasitos.

A rota metabólica de produção do ergosterol é complexa, e envolve uma série de enzimas associadas à produção do ergostano, e ocorre em três principais estágios (XU et al., 2014). Em tripanossomatídeos, a rota metabólica do ergosterol se inicia com a condensação do acetoacetil-CoA e procede, via mevalonato e farnesil-pirofosfato, para produção do esqualeno, o qual é convertido a 2,3-óxidoesqualeno através da enzima

esqualeno 2,3-epoxidase (SEO) (Figura 5). O 2,3-óxidoesqualeno é então convertido para lanosterol (1). Os próximos passos dessa rota metabólica incluem a demetilação e modificações no esqueleto estrutural do lanosterol, levando a formação de intermediários do ergosterol, os quais serão convertidos, através de uma série de reações enzimáticas, ao composto final (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011) ergosterol (13), como indicado na Figura 5.

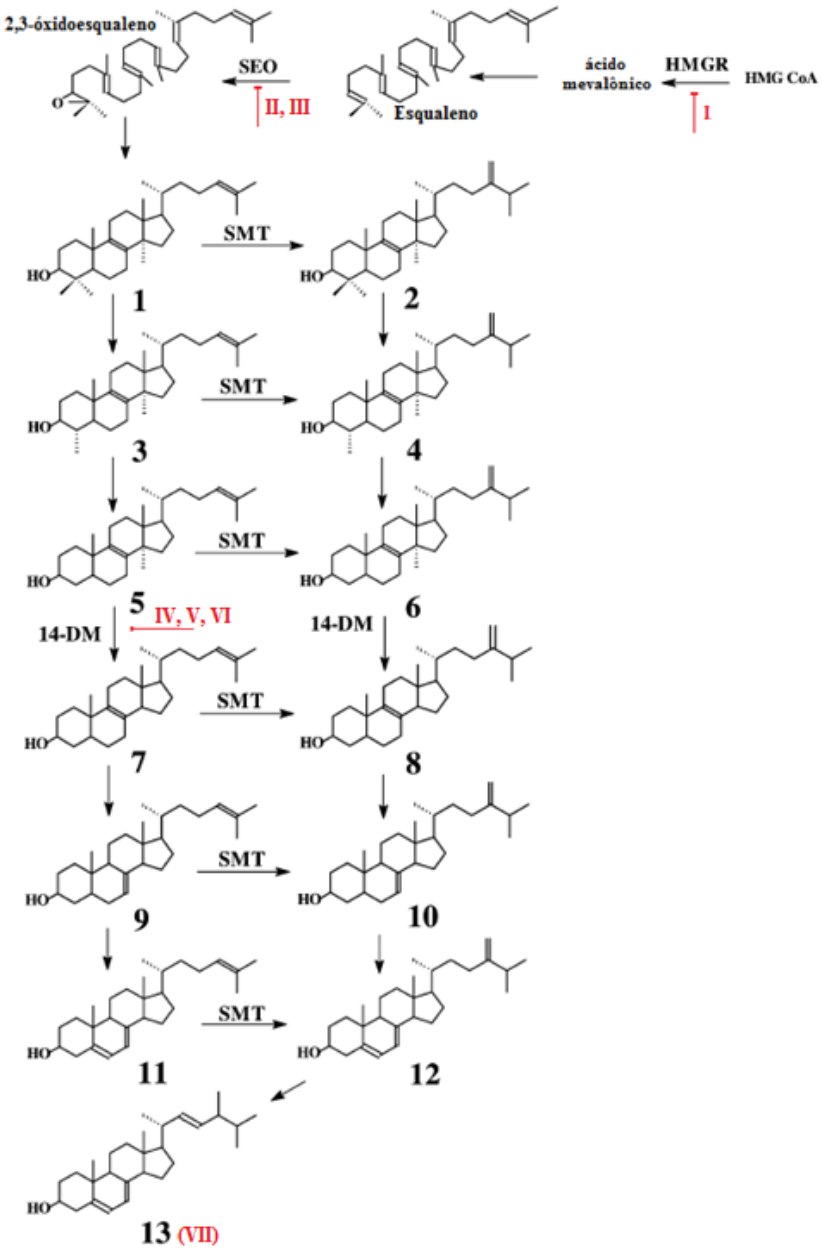

Figura 5: Via bioquímica da síntese de ergosterol em tripanosomatídeos, setas vermelhas indicam vias bloqueadas por fármacos. Legenda - 1: Lanosterol; 2: 24-metilenodiidrolanosterol; 3: 4α,14α-dimetilcolesta-8,24-dien-3β-ol; 4: 4α,14α-dimetilergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 5: 14α-metilcolesta-8,24-dien-3β-ol; 6: 14α-metilergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 7: Zimosterol (colesta-8,24-dien-3β-ol); 8: Ergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol; 9: Colesta-7,24-dien-3β-ol; 10: Ergosta-7,24(24^1)-dien-3β-ol; 11: Colesta-5,7,24-trien-3β-ol; 12: Ergosta-5,7,24(24^1)-trien-3β-ol; 13: Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3β-ol). Legenda dos fármacos.I: Rosuvastatina; II: Tolnaftato; III: Naftifina; IV: Voriconazol; V: Tioconazol; VI: Fenticonazol; VII: Nistatina. Legenda das enzimas – SEO: Esqualeno-2,3-epoxidase; HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase; SMT: Δ^{24}- Esterol metiltransferase; 14-DM: 14α-metilesterol 14-demetilase. Adaptado de (ROBERTS et al., 2003).

Este é um interessante alvo, porque os esteróis em organismos eucariotos são essenciais para o funcionamento, viabilidade e estrutura celular, por constituem membranas e responsáveis por sua fluidez, além de fazerem parte da sinalização celular, como no caso dos esteroides nos humanos. Entretanto, os organismos eucariotos possuem diferentes tipos de esterol utilizados para a constituição de suas membranas, enquanto em mamíferos é utilizado o colesterol, as plantas sintetizam em suas membranas em maior quantidade o estigmasterol, enquanto fungos sintetizam e utilizam exclusivamente o ergosterol, o qual *Leishmania* sp. também produz e utiliza em conjunto com outros derivados (BLOCH, 1991; EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017; HARTMANN, 1998; HAUBRICH et al., 2015).

Por isso, os componentes pertencentes à esta rota metabólica podem ser explorados como importantes alvos para o desenvolvimento de novos alvos quimioterápicos, o que poderá levar a inibição do ergosterol e eliminação do parasito. Além dos fármacos já descritos acima, reconhece-se que uma série de fármacos, já disponíveis para uso em humanos, é capaz de bloquear componentes desta via, como é possível verificar na Figura 5 (em vermelho).

A rosuvastatina (fármaco I) pertence à classe das estatinas, e é utilizada para o tratamento da hipercolesterolemia em humanos (VUORIO et al., 2011). Além disso, tem a capacidade de bloquear a enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase), uma das primeiras a atuar na via metabólica do ergosterol (VAN DE PAS et al., 2014). Na relação parasito-hospedeiro, foi verificado que a pravastatina, outro medicamento da família das estatinas, foi capaz de aumentar a sobrevida de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* (KÜCKELHAUS; KÜCKELHAUS; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2011) e este efeito esteve associado a uma maior atividade fagocítica e produtora de óxido nítrico dos macrófagos do hospedeiro (KÜCKELHAUS et al., 2013). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 6.

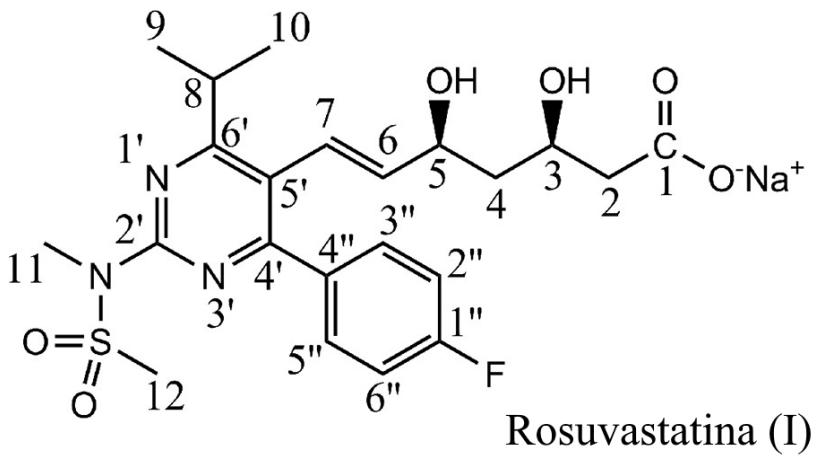

Figura 6: Esquema ilustrativo 2D da estrutura química da rosuvastatina sódica, forma que é vendida comercialmente, medicamento utilizado para o controle da hipercolesterolemia e que age bloqueando a enzima HmG-CoA redutase. Na^+: cátion sódio; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; F – Flúor; S – Enxofre. Adaptado de (GALIULLINA et al., 2019).

O tolnaftato (fármaco II) é um antimicótico tiocarbamato que age de forma similar à naftifina (fármaco III) inibindo a SEO e por consequência inibindo a produção de ergosterol (ARNOLDI et al., 2007; BARRETT-BEE; LANE; TURNER, 1986; IWATANI; ARIKA; YAMAGUCHI, 1993). A naftifina por sua vez é um medicamento antifúngico de amplo espectro e pertence à classe das alilaminas (ROUTT, 2010) a qual se apresentou ativo contra formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) major* (BERMAN; GALLALEE, 1987), sendo esta atividade comparável àquela do fármaco padrão Pentostam ®. As suas estruturas químicas em 2D podem ser observadas na Figura 7 abaixo.

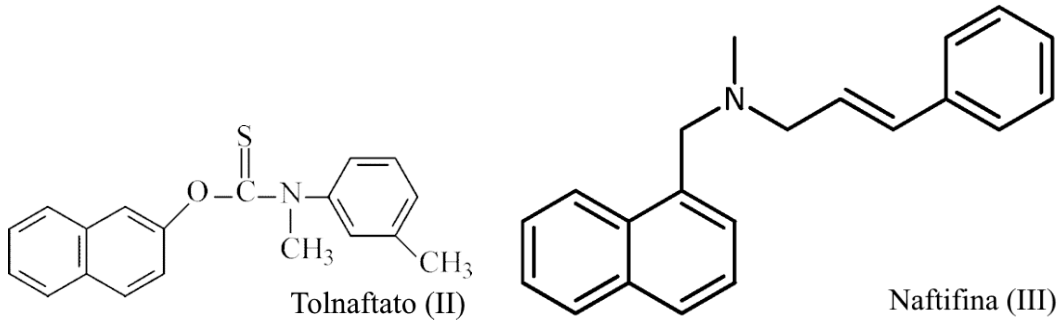

Figura 7: Esquemas ilustrativos 2D das estruturas químicas dos fármacos inibidores da enzima SEO. (II) – Tolnaftato; (III) – Naftifina; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; S – Enxofre. Adaptados de (ABONIA et al., 2018; TANG et al., 2006).

Os fármacos voriconazol (fármaco IV), tioconazol (fármaco V), fenticonazol (fármaco VI) são fármacos antifúngicos pertencentes à classe dos azóis (MAST et al., 2013; PEREIRA; FACHIN; MARTINEZ-ROSSI, 1998) e de uma maneira geral têm amplo espectro em micoses superficiais e sistêmicas, sendo que todos agem na enzima 14α-metil esterol 14-demetilase (14DM/CYP51). O estudo desenvolvido por KULKARNI et al (2013) demonstrou que o voriconazol tem efeito leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, sugerindo que este fármaco tem ação contra diferentes espécies de *Leishmania.* As estruturas químicas desses fármacos podem ser observadas na Figura 8 abaixo.

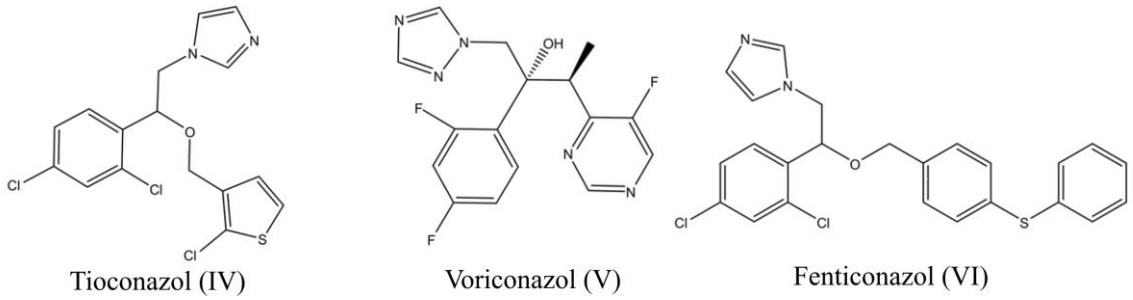

Figura 8: Esquemas em 2D das estruturas químicas dos fármacos triazóis inibidores da enzima 14DM/CYP51. (IV) – Tioconazol; (V) – Voriconazol; (VI) – Fenticonazol. Cl – Cloro; H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio; F – Flúor; S – Enxofre. Adaptado de (JEFFREYS et al., 2019).

A nistatina (fármaco VII) também é um antifúngico, análogo a anfotericina B (VIII), pertencente a classe dos antibióticos poliênicos, e é utilizada em micoses sistêmicas (LUQUE-ORTEGA et al., 2003). Seu efeito terapêutico se dá através da

ligação direta ao ergosterol, o que deflagra uma série de alterações biológicas aos agentes patogênicos (BRAUTASET et al., 2011). O estudo desenvolvido por TEWARY et al., (2006) mostrou que a nistatina é capaz de inibir a ligação e entrada de *L. donovani* em macrófagos da linhagem J774. Além disso, verificou-se que a nistatina tem capacidade de aumentar os níveis de TNF-α em camundongos (SEMIS et al., 2012) que é uma importante citocina responsável por ativar macrófagos a um estado leishmanicida (BHATTACHARYA et al., 2015). As estruturas químicas desses fármacos podem ser observadas na Figura 9 abaixo.

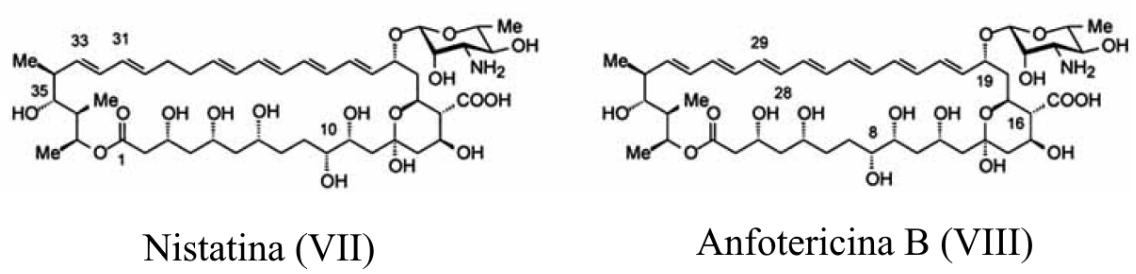

Figura 9: Esquemas em 2D das estruturas químicas dos fármacos polienos nistatina (VII) e para comparação, o fármaco padrão anfotericina B (VIII). H – Hidrogênio; O – Oxigênio; N – Nitrogênio. Adaptado de (CAFFREY et al., 2008).

Como é possível perceber, a ação leishmanicida de alguns dos medicamentos listados acima já foi verificada, entretanto, há uma série de lacunas que ainda não foram esclarecidas sobre tais fármacos, como suas atividades sobre outras espécies de *Leishmania*; suas ações em ambas as formas promastigotas e amastigotas intracelulares, bem como seus alvos biológicosnestes parasitos. Há ainda, alguns fármacos que sequer foram avaliados em relação ao seu potencial leishmanicida, tais como rosuvastatina, fenticonazol e tioconazol, justificando estudos de reposição, o que, de fato, poderá levar à caracterização de novos fármacos com ação leishmanicida.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de fármacos que atuam na via da biossíntese de ergosterol em *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade *in vitro* da fenticonazol, naftifina, nistatina, rosuvastatina, tioconazol, tolnaftato e voriconazol, fármacos que atuam na biossíntese de ergosterol em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar a atividade citotóxica da fenticonazol, naftifina, nistatina, rosuvastatina, tioconazol, tolnaftato e voriconazol, fármacos que atuam na biossíntese de ergosterol e calcular seus índices de seletividades;
- Avaliar a atividade *in vitro* da fenticonazol, naftifina, nistatina, rosuvastatina, tioconazol, tolnaftato e voriconazol, fármacos que atuam na biossíntese de ergosterol contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar as possíveis alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com os fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato;
- Avaliar as possíveis alterações de membranas celulares em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com os fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato;
- Avaliar as possíveis alterações do potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com os fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato;

- Avaliar as possíveis alterações do pH intracelular em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com os fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o protocolo de pesquisa de nº 511/15 (ANEXO 1).

3.2 Escolha dos fármacos

Os fármacos utilizados nesse estudo são: rosuvastatina, voriconazol, fenticonazol, naftifina, nistatina, tioconazol e tolnaftato, os quais foram obtidos na empresa Sigma-Aldrich.

3.3 Animais experimentais

Os animais experimentais escolhidos foram camundongos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*), isogênicos com 6 semanas de idade. Eles são obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Instituto de Medicina Tropical até o momento dos experimentos, os animais foram separados em caixas com cama de maravalha autoclavada em não mais que 5 animais por caixa, alimento e água foram oferecidos aos animais *ad libitum*. O biotério possui sistema de ventilação filtrada e temperatura controlada e os animais não o deixam até o momento do experimento. O procedimento de eutanásia foi realizado seguindo protocolo adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil.

O uso de animais experimentais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais e registrada sob o nº 096/17.

3.4 Parasitos

Os parasitos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira do Instituto Evandro Chagas (Belém – PA, Brasil) como: *L. (L.) amazonensis* (cepa MHOM/BR/73/M2269) e *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72 cepa 46) e *L. (V.) braziliesnsis* (MHOM/BR/1995/M15280). *L. (L.) amazonensis* foi mantida no coxim plantar das patas traseiras de camundongos BALB/c (*Mus musculus*). Para manutenção de *L. (L.) chagasi* (*in vivo*), hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram infectados com esta espécie através da via intraperitoneal e a infecção mantida por cerca de 60 dias. Os animais foram eutanasiados e os parasitos isolados, cultivados e mantidos a 25ºC em meio de cultivo, M199 ou Schneider contendo 10% soro fetal bovino inativo; 0,25 mM HEPES; estreptomicina (10µg/mL) e penicilina (100 UI/mL). *L. (V.) braziliensis* foi mantida no coxim plantar das patas traseiras de hamsters (*Mesocricetus auratus*).

3.5 Avaliação do potencial leishmanicida dos fármacos

Todos os fármacos tiveram suas atividades leishmanicidas testadas diante de formas promastigotas em concentrações determinadas variando de 0,78 a 100,0 µg/mL (YAMAMOTO et al., 2015), foi feito também um grupo controle contendo o veículo de diluição das drogas, ou dimetilsulfóxido (DMSO), ou metanol verificando sempre que não se ultrapasse a proporção de 1% v/v. Como droga padrão foi utilizada a anfotericina B (Crisália, Brasil). Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliesnsis* e *L. (L.) chagasi* foram obtidas de cultura e centrifugadas a 3000 rpm a 4 ºC por 10 minutos, então se descartou o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com PBS, este procedimento foi repetido por 3 vezes e os parasitos foram ressuspendidos em meio de cultura ao final. Os parasitos foram então contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma concentração de 10^6 parasitos/poço e então acondicionadas em placas de cultura com 96 poços usando meio M199 [suplementado com 10% soro fetal bovino inativo; 0,25 mM HEPES; estreptomicina (10 µg/mL); e penicilina (100 UI/mL); 2 µg/mL de hemina bovina; 2% de urina masculina filtrada com filtro 22 micrômetros] ou Schneider [suplementado com 10% soro fetal bovino inativo; 0,25 mM HEPES; estreptomicina (10µg/mL); e penicilina (100 UI/mL)].

As placas foram incubadas por 24h ou 48h a 25ºC. Após a incubação, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, 4ºC e então lavadas com 200 µL de PBS por três

vezes. Em seguida, 50 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) foi adicionada aos poços por 4h, a uma concentração de 4 mg/mL, e então novamente incubada a 25ºC. Ao final deste período, 50 µL de uma solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionada a cada poço, e a placa foi novamente incubada por 18h a 25ºC. Em seguida a placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas usando o comprimento de 595 nm. A eficácia dos fármacos foi expressa como a concentração do fármaco que elimina 50% da população parasitária (Concentração Efetiva 50% - CE_{50}), a qual foi calculada utilizando curva de regressão não-linear no *software* GraphPad Prism. Utilizou-se como fármaco padrão a anfotericina B em concentrações variando de 100 a 0,781 µg/mL.

3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos

Macrófagos peritoneais foram extraídos de camundongos BALB/c por lavagem peritoneal utilizando meio RPMI 1640 [suplementado com 10% soro fetal bovino inativo; 0,25 mM HEPES; estreptomicina (10 µg/mL); e penicilina (100 UI/mL); 1% de aminoácidos não essenciais; 1% de vitaminas e 1% de piruvato; 1% de 2-mercaptoetanol]. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm a 4 ºC e teve seu sobrenadante descartado e o pellet ressupendido usando PBS em temperatura ambiente (TA), esse procedimento foi repetido por três vezes.

As células foram então contadas em câmara de Neubauer e aproximadamente 10^5 macrófagos/poço foram plaqueados em meio RPMI 1640 suplementado, em placas de 96 poços, juntamente com os fármacos a uma concentração variando de 0,78 a 100 µg/mL (YAMAMOTO et al., 2015), um controle contendo apenas o veículo de diluição das drogas (DMSO ou metanol) foi feito verificando sempre que não se ultrapasse a proporção de 1% v/v. As placas foram mantidas em incubadora a 37 ºC, 5% de CO_2, por 24h, 48h ou 72h.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min a 4ºC e lavadas por 3 vezes com PBS em TA, em seguida a viabilidade celular foi avaliada através da oxidação da resazurina do reagente PrestoBlue® (Life Technologies, EUA). Após duas horas, as placas foram lidas utilizando espectrofotômetro de microplacas, com filtro de fluorescência (emissão 535 nm e excitação 615 nm).

Anfotericina B em concentrações variando de 100 a 0,781 µg/mL foi utilizada como fármaco padrão, a mesma faixa de concentração foi utilizada para os fármacos teste. A concentração citotóxica que elimina 50% da população celular (CC_{50}) foi calculada utilizando curva de regressão não-linear no *software* GraphPad Prism.

O índice de seletividade (IS) dos fármacos foi obtido utilizando a fórmula matemática:

$$IS = \frac{Média\ CC50}{Média\ CE50}$$

3.7 Avaliação do potencial dos fármacos em amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais foram extraídos de camundongos BALB/c por lavagem peritoneal utilizando meio RPMI 1640 suplementado. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm a 4 ºC por 10 min. e teve seu pellet ressupendido em PBS a TA, esse procedimento foi repetido por três vezes. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e então plaqueadas a 10^5 macrófagos/lâmínulas em placas com 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas e então incubadas por 1h em estufa umidificada de 37 ºC com 5% de CO_2 para garantir que os macrófagos estivessem aderidos as lamínulas.

Após esta incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS a TA para retirada de outras células que não aderiram às lamínulas, garantindo que houvesse apenas macrófagos nas lamínulas, e então foram adicionadas as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliesnsis* ou *L. (L.) chagasi* a uma proporção de 10 promastigotas/macrófago. Após esse procedimento, as placas foram incubadas novamente por 24h a 37ºC em incubadora umidificada e 5% de CO_2 para infecção das células. Após a infecção, os poços foram lavados por quatro vezes utilizando PBS em TA, e diferentes concentrações dos fármacos foram adicionados às coculturas e um controle contendo o veículo de diluição dos fármacos (DMSO ou metanol) verificando sempre que não se ultrapasse a proporção de 1% v/v, utilizou-se anfotericina B como fármaco padrão. A placa foi incubada novamente por 24h ou 48h; então os sobrenadantes foram coletados e congelados imediatamente para quantificação dos níveis de H_2O_2 e NO; em seguida, as

lamínulas foram lavadas 3× com PBS, secas à TA, fixadas em metanol e então coradas com Giemsa para contagem.

A contagem serviu para o cálculo do índice de infecção (II), o qual estima a intensidade da infecção através da contagem de macrófagos e amastigotas internalizadas em vários campos da lâmina. Este índice foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$II = \%\, macrófagos\ infectados\ x\ \frac{amastigotas\ internalizadas}{macrófagos}$$

3.8 Avaliação das alterações morfológicas e fisiológicas induzidas pelos fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato

Após a avaliação do potencial leishmanicida para as formas promastigotas e amastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, os fármacos fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato foram os únicos a possuírem um índice de seletividade maior para as formas amastigotas do que para os macrófagos peritoneais nos períodos considerados. Neste momento, utilizou-se apenas a espécie *L. (L.) amazonensis* como parasito modelo pelo crescimento rápido da população parasitária e facilidade na manutenção em cultura. Além disso, foi observado em especial que a cepa utilizada possui uma alta virulência para infecções *in vitro*, a qual se mantém mesmo com várias semanas de repique de cultura.

3.9 Análise de alterações ultraestruturais

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram plaqueadas a $2x10^6$ promastigotas/mL em placas estéreis de 96 poços em meio R10, juntamente com as concentrações dos fármacos e anfotericina B que eliminam 50% da população parasitária

(CE_{50}). Um grupo controle foi incubado com meio de cultura apenas e solução veículo (DMSO ou metanol, nunca excedendo 1% v/v).

Estes parasitos foram cultivados em diferentes períodos (6h, 24h ou 48h), e em seguida, a placa foi centrifugada a 3000 rpm, a 4ºC por 10 min e lavadas três vezes com PBS. Em seguida os pellets parasitários foram ressuspendidos em solução de ácido tânico 0,1% dissolvido em glutaraldeído 2,0% em tampão fosfato 0,15M pH 7,2, e incubados por 1h a 4ºC. Em seguida, foram pós fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% diluído em salina e contrastados em solução de acetato de uranila 0,5% em salina por 12h e então as amostras foram incluídas em resina araldite. Seções ultrafinas (70 nm) foram obtidas com a utilização do ultramicrótomo Reichert, submetidos a contrastação dupla por acetato de uranila 2% e por citrato de chumbo 0,5%. O microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010 foi utilizado para observação das amostras.

3.10 Avaliação da formação de poros na membrana celular

Formas promastigotas de *L. (V.) amazonensis* foram obtidas de cultura e centrifugadas a 3000 rpm, a 4 ºC por 10 minutos, então se descartou o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com PBS, este procedimento foi repetido por 3 vezes e os parasitos foram ressuspendidos em meio de cultura ao final. Os parasitos foram então contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma concentração de $2x10^6$ parasitos/poço e então acondicionadas em placas de cultura com 96 poços usando meio Schneider suplementado. Os parasitos foram cultivados juntamente com a concentração de CE_{50} e $2\times CE_{50}$ de cada fármaco. Em seguida foi adicionado aos poços, o reagente SYTOX Green® (Life Technologies, EUA) a uma concentração de 0,5 µM por poço. Como controle negativo, o parasito foi incubado apenas com o reagente, e como controle positivo foi adicionado 0,4 µL de Triton-X 100 aos parasitos no início das leituras. As placas foram lidas a cada 10 minutos por um período máximo de 2h, utilizando para esse fim, leitor de fluorescência com filtro de emissão 535 nm e excitação 615 nm.

Os resultados foram normalizados a partir do controle negativo, que foi considerado o valor basal de reação.

3.11 Avaliação de alteração do potencial transmembrana mitocondrial

Formas promastigotas de *L. (V.) amazonensis* foram obtidas de cultura e centrifugadas a 3000 rpm, a 4 ºC por 10 minutos, então se descartou o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com PBS, este procedimento foi repetido por 3 vezes e os parasitos foram ressuspendidos em meio de cultura ao final. Os parasitos foram então contados em câmara de Neubauer, ajustados a uma concentração de $2x10^6$ parasitos/poço e então acondicionadas em placas de cultura com 96 poços usando meio Schneider suplementado. Os parasitos foram cultivados juntamente com a concentração de CE_{50} de cada fármaco. Em seguida foi adicionado aos poços, a sonda Rodamina 123 a uma concentração de 5 µM por poço. Como controle negativo, o parasito foi incubado apenas com o reagente, e como controle positivo foi adicionado 5 mM de oligomicina (Cayman Chemicals, EUA) aos parasitos no início das leituras. As placas foram lidas por um período máximo de 2h. Antes de cada leitura, para retirada da sonda dos poços, a placa foi novamente centrifugada e lavada por 3x utilizando PBS. Por fim, um leitor de fluorescência com filtro de emissão 535 nm e excitação 615 nm foi utilizado.

Os resultados foram normalizados a partir do controle negativo, que foi considerado o valor basal de reação.

3.12 Mudanças no pH interno de macrófagos hospedeiros

Os macrófagos peritoneais foram colocados em cultura em placas escuras de 96 poços e infectados com L. (L.) amazonensis conforme instruções do item 3.9. Após incubação de 24h as CE_{50} foram adicionadas aos poços e incubadas novamente por 24h. Diferentes controles foram adicionados: 1) controle infectado; 2) controle não-infectado; 3) controle infectado adicionados de 5 µM de $NHCl_4$, conhecido agente alcalinizante (GHOSH et al., 2012); 4) controle não-infectado adicionados de 5 µM de $NHCl_4$. As placas então foram lavadas por 3 vezes com PBS e a sonda pHrod Red (Life

Technologies, EUA) foi adicionada aos poços. Como instruções de leitura e interpretação de resultados, a fluorescência aumenta conforme o pH diminui para neutro ou ácido, e inversamente, a fluorescência diminui conforme o pH se alcaliniza.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos fármacos antifúngicos

4.2 Atividade anti-promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com fenticonazol apresentaram CE_{50} de 6,5 ± 0,8 µM com 24h de incubação. Com 48h, observou-se um aumento de seu efeito, cuja CE_{50} foi de 0,30 ± 0,03 µM. A respeito da citotoxicidade, o fármaco apresentou uma CC_{50} de aproximadamente 34 µM para os dois períodos de incubação. Logo o índice de seletividade (IS) foi de 5,2 às 24h e 111 vezes mais seletivo para as promastigotas de *L. amazonensis* do que macrófagos peritoneais com 48h de incubação. Para *L. braziliensis*, uma CE_{50} de 7,9 ± 0,5 µM com 24h de incubação, e uma CE_{50} de 1,8 ± 0,2 µM para 48h foram obtidas. Enquanto o IS às 24h de 4,3 e a 48h foi 18,5. Para as promastigotas de *L. infantum*, a CE_{50} foi de aproximadamente 5 µM para ambos os períodos. Quanto ao IS, observou-se seletividade de 6,3 para 24h e 6,5 para 48h.

Já a naftfina apresentou um padrão diferente para as espécies cutâneas *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A 24h de incubação *L. amazonensis* apresentou uma CE_{50} de 62,3 ± 12,7 µM, porém às 48h o fármaco perdeu sua atividade leishmanicida. Quanto a citotoxicidade, o fármaco apresentou CC_{50} de 73,4 ± 3 µM com 24h de incubação e 40,7 ± 11,5 µM às 48h. Sendo assim, o fármaco não foi seletivo às 24h, e apresentou um IS de 1,2 às 48h. Para *L.* foi necessário 20,4 ± 1,2 µM para eliminar 50% de promastigotas com 24h de incubação, mas houve um aumento da CE_{50} para 56,9 ± 3,2 µM. Portanto, o IS para 24h foi de 3,6 e 0,7 às 48h. Para *L. infantum*, a CE_{50} foi de 63,0 ± 9,3 µM com 24h de incubação e uma diminuição da CE_{50} para 27,3 ± 3,6 µM com 48h. Considerando o IS, às 24h foi de 1,2 e às 48h foi de 1,5.

Para o tratamento com nistatina, a CE_{50} das promastigotas de L. amazonensis foi de 2,1 ± 0,6 µM e 2,7 ± 0,2 µM para 24h e 48h, respectivamente. Quanto a citotoxicidade, a nistatina não apresentou toxicidade aos macrófagos para a faixa de concentrações

testadas nos períodos considerados, logo CC_{50} ≥110 µM foi estimada. Com isso, o IS para *L. amazonensis* foi ≥ 47,6 para 24h e ≥ 37 para 48h. Já *L. braziliensis* apresentou com 24h uma CE_{50} de 6,5 ± 0,3 µM e com 48h se observou uma CE_{50} de 3,7 ± 0,2 µM. Quanto ao IS, *L. braziliensis* apresentou um IS de ≥ 15,4 para 24h e com 48h de incubação com o IS foi ≥ 27. Para *L. infantum*, calculou-se uma CE_{50} de 3,7 ± 0,7 µM para 24h, e para 48h de incubação uma CE_{50} de 1,6 ± 0,3 µM. O IS calculado para *L. infantum*, foi ≥ 27 para 24h e ≥ 62,5 para 48h de incubação.

A rosuvastatina, fármaco da classe das estatinas, não apresentou atividade contra as formas promastigotas em nenhum período testado.

Para tioconazol, uma CE_{50} de 6,3 ± 0,7 µM foi obtida para 24h e para 48h uma CE50 de 0,7 ± 0,05 µM foi observada para as promastigotas de *L. amazonensis*. Em relação à citotoxicidade, calculou-se uma CC_{50} de 16,1 ± 1,0 µM às 24h, e para 48h em 11,1 ± 1,0 µM. Assim, os IS deste fármaco para *L. amazonensis* foram de 2,5 às 24h e 15,9 às 48h. Para *L. braziliensis* a CE_{50} foi de 6,4 ± 0,3 µM e 0,33 ± 0,02 µM, para 24h e 48h de incubação, respectivamente. Logo, *L. braziliensis* apresentou um IS de 2,5 às 24h e às 48h há um aumento do IS para 33,8. Para *L. infantum*, foi calculada uma CE_{50} de 7,6 ± 0,4 µM para 24h e para 48h CE_{50} foi de 6,8 ± 0,8 µM. Quanto aos IS, *L. infantum* um IS de 2,1 foi calculado, e para 48h houve diminuição do IS para 1,6.

O tolnaftato não apresentou atividade a 24h de incubação para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* para as faixas de concentração testadas. As promastigotas de *L. braziliensis* foram mais sensíveis ao tratamento e apresentaram uma CE_{50} de 185,4 ± 15,8 µM às 24h. Para todos os casos, uma maior incubação aumentou a eficiência de ação do fármaco e as espécies apresentaram uma faixa de CE50 similar de aproximadamente 35 µM às 48h de incubação. Para os testes de citotoxicidade, o fármaco não foi tóxico às 24h de incubação e a CC_{50} é maior que 325,3 µM com 24h, enquanto uma CC_{50} de 199,3 ± 16,9 µM foi observada para 48h de incubação. Quanto ao IS, a única espécie sensível ao tratamento com 24h, *L. braziliensis* apresentou um IS de 1,8, enquanto às 48h o IS foi de aproximadamente 5,6 para todas as espécies estudadas.

O voriconazol não apresentou atividade com 24h de incubação para *L. amazonensis* ou *L. infantum*. Entretanto, *L. braziliensis* apresentou uma CE_{50} de 164,9 ± 4,7 µM ara este período. Às 48h, observou-se um aumento na atividade leishmanicida do fármaco, logo *L. amazonensis* apresentou uma CE_{50} de 7,4 ± 0,5 µM, a CE_{50} para *L.*

braziliensis foi de 1,90 ± 0,01 µM, enquanto para *L. infantum* foi observada CE_{50} de 5,10 ± 0,06 µM. A citotoxicidade observada foi baixa para as células, o fármaco não foi tóxico em nenhum dos dois tempos e a CC_{50} foi maior ou igual a 290 µM. No período de 24h, a seletividade existiu apenas para *L. braziliensis* e a droga foi 1,7 vezes mais seletiva às promastigotas ao invés de macrófagos. Já para o período de 48h, o voriconazol apresentou um IS de 290 para *L. amazonensis.* Para *L. braziliensis* esse índice foi de 147,9 vezes mais seletivo, enquanto para *L. infantum* foi observado um IS de 56,9.

O fármaco padrão anfotericina B foi quem apresentou para o período de 24h, uma CE50 de 1,9 ± 0,2 µM foi observada e para 48h, uma CE50 de 0,1 ± 0,01 foi calculada para *L. amazonensis*. Quanto a citotoxicidade, o fármaco apresentou uma CC_{50} de 62,0 ± 10,1 µM às 24h e uma CC_{50} de 64,2 ± 2,3 µM. Logo, os IS de *L. amazonensis* foram respectivamente para 24h e 48h de 32,3 e 711,1. Para a *L. braziliensis*, a CE_{50} foi de 1,0 ± 0,2 µM às 24h e uma CE_{50} de 0,41 ± 0,04 às 48h foram de 62,6 e 156,1, para 24h e 48h, respectivamente. Para *L. infantum* uma CE50 de 0,28 ± 0,01 µM foi calculada às 24h e uma CE_{50} de 0,06 ± 0,01 µM foi observada para 48h, com isso os IS foram de 221,4 e 1066,7 para 24h e 48h, respectivamente.

Tabela 1: Tabela mostrando a concentração efetiva 50% (CE_{50}) das drogas contra promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania*, a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para macrófagos peritoneais e o índice de seletividade (IS) das drogas durante os períodos de incubação de 24h e 48h. Todos os resultados estão expressos em µM. IS_a – índice de seletividade às 24h; IS_b – índice de seletividade às 48h.

	CE_{50} - *L. (L.) amazonensis*				CE_{50} - *L. (V.) braziliensis*				CE_{50} - *L. (L.) infantum*				CC_{50} - Macrófago	
	24h	48h	IS_a	IS_b	24h	48h	IS_a	IS_b	24h	48h	IS_a	IS_b	24h	48h
Fen	6,5 ± 0,8	0,30±0,03	5,2	111	7,9 ± 0,5	1,8 ± 0,2	4,3	18,5	5,4 ± 0,1	5,1 ± 0,9	6,3	6,5	34,1 ± 1,5	33,3 ± 1,3
Naf	62,3±12,7	≥348	1,2	-	20,4 ± 1,2	56,9 ± 3,2	3,6	0,7	63,0 ± 9,3	27,3 ± 3,6	1,2	1,5	73,4 ± 3	40,7 ± 11,5
Nis	2,1 ± 0,6	2,7 ± 0,2	≥47,6	≥ 37,0	6,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2	≥15,4	≥ 27,0	3,7 ± 0,7	1,6 ± 0,3	≥ 27,0	≥ 62,5	≥ 110,0	≥ 110,0
Ros	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NC	NC
Tio	6,3 ± 0,7	0,70±0,05	2,5	15,9	6,4 ± 0,3	0,33 ± 0,02	2,5	33,8	7,6 ±0,4	6,8 ± 0,8	2,1	1,6	16,1 ± 1,0	11,1 ± 1,0
Tol	≥325,3	34,5 ± 0,8	-	5,8	185,4±15,8	35,6 ± 4,1	1,8	5,6	≥325,3	34,5 ± 2,8	-	5,8	≥325,3	199,3±16,9
Vor	NA	7,4 ± 0,5	-	≥39,2	164,9 ± 4,7	1,90±0,01	≥1,8	≥152,6	NA	5,10±0,06	-	≥56,9	≥ 290,0	≥ 290,0
Anfo	1,9 ± 0,2	0,10±0,01	32,6	640	1,0 ± 0,2	0,41±0,04	62	156,1	0,28±0,01	0,06±0,01	221,4	1066,7	62,0±10,1	64,2 ± 2,3

NA: não ativo

4.3 Atividade anti-amastigota

As CE_{50} dos fármacos também foram testadas contra as formas amastigotas intracelulares. Para o fenticonazol, uma CE_{50} de aproximadamente 3,6 para os dois períodos contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* foi obtida, sendo que o IS foi de até 9,5. Para *L. braziliensis* uma CE_{50} de 1,6 ± 0,2 µM e 1,1 ± 0,1 µM foram calculadas para 24h e 48h, respectivamente. Logo, os IS calculados foram de 21,3 para 24h e 30,3 para 48h. Para *L. infantum*, a CE_{50} calculada foi de 3,9 ± 0,8 µM para 24h e 2,9 ± 0,3 µM para 24h, por isso o IS calculado para 24h foi de 8,7 e 11,5 para 48h.

A naftfina não apresentou atividade antiamastigota.

A nistatina apresentou foi efetiva contra as amastigotas, *L. amazonensis* apresentou uma CE_{50} de 2,1 ± 0,1 µM com 24h de incubação e 0,8 ± 0,2 µM com 48h. Sendo que o IS para 24h foi maior que 47,6 e maior que 125,0 para 48h. Enquanto isso, *L. braziliensis* e *L. infantum* tiveram resultados similares, *L. braziliensis* apresentou 4,6 ± 0,4 µM para 24h, e 2,6 ± 0,3 µM para 48h, com o IS ≥ 21,7 e ≥ 38,5, respectivamente para 24h e 48h. Para *L. infantum*, observou-se uma CE_{50} de 4,8 ± 0,2 µM para 24h e 2,6 ± 0,2 µM para 48h, com os IS calculados de 20,8 e 38,5 respectivamente para 24h e 48h.

A rosuvastatina não apresentou atividade antiamastigota para nenhuma das espécies consideradas.

Para o tratamento com o tioconazol, foram observadas CE_{50} para *L. amazonensis* de 7,0 ± 0,7 µM com 24h de incubação e 4,4 ± 0,7 µM para 48h. Considerando os IS, *L. amazonensis* apresentou valores similares de IS de aproximadamente 2,4 para os dois períodos. Foi obtido para *L. braziliensis* com uma CE_{50} de 6,4 ± 0,1 µM com 24h e 4,0 ± 0,5 µM com 48h de incubação. Os resultados de IS também foram similares para os dois períodos e foi de aproximadamente 2,6 no caso de *L. braziliensis*. Já para *L. infantum* as CE_{50} para os dois períodos de incubação foram de aproximadamente 4 µM. Por fim, o IS para *L. infantum* calculado foi de 3,6 e 4,4 respectivamente para 24h e 48h.

O fármaco tolnaftato não apresentou atividade leishmanicida com 24h de incubação, porém foi ativo com uma incubação mais prolongada. As amastigotas de *L. amazonensis* apresentaram uma CE_{50} de 25,4 ± 0,2 µM e o IS foi de 7,9 para o período de 48h. As amastigotas de *L. braziliensis* apresentou uma CE_{50} de 9,3 ± 2,2 µM e um IS

de 21,4 para o período de 48h. Já para *L. infantum*, uma CE_{50} de 4,6 ± 0,08 µM e um IS de 42,9 foram calculados para 48h de incubação.

O fármaco voriconazol também não apresentou atividade quantificável contra as formas amastigotas de nenhuma das espécies.

Por último, o fármaco padrão anfotericina B apresentou para as amastigotas de *L. amazonensis* uma CE_{50} de 0,1 µM para ambos os períodos, e um IS de 648,4 e 828,3 para 24h e 48h, respectivamente. As amastigotas de *L. braziliensis* apresentaram CE_{50} de 0,09 ± 0,02 e 0,03 ± 0,01 para 24h e 48h, respectivamente. Os IS foram de 717, 4 para 24h e 1604,1 para 48h. As amastigotas de L. infantum foram as mais sensíveis ao tratamento e apresentaram CE_{50} de 0,07 ± 0,001 para 24h e 0,02 ± 0,001 para 48h, com os IS de 837,6 para 24h e 2800,2 para 48h.

Tabela 2: Tabela contendo a concentração efetiva 50% (CE_{50}) das diferentes drogas contra amastigotas das diferentes espécies de *Leishmania*, a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para macrófagos e o índice de seletividade (IS) das drogas para os períodos de incubação de 24h e 48h. Todos os resultados estão expressos em µM. IS_a – índice de seletividade às 24h; IS_b – índice de seletividade às 48h.

	CE_{50} – *L. (L.) amazonensis*				CE_{50} - *L. (V.) braziliensis*				CE_{50} - *L. (L.) infantum*			
	24h	48h	IS_a	IS_b	24h	48h	IS_a	IS_b	24h	48h	IS_a	IS_b
Fen	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,6	9,4	9,0	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	21,3	30,3	3,9 ± 0,8	2,9 ± 0,3	8,7	11,5
Naf	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
Nis	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	≥ 47,6	≥ 125,0	4,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	≥ 21,7	≥ 38,5	4,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	≥ 20,8	≥ 38,5
Ros	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
Tio	7,0 ± 0,7	4,4 ± 0,7	2,3	2,5	6,4 ± 0,1	4,0 ± 0,5	2,5	2,8	4,5 ± 0,3	4,0 ± 0,2	3,6	4,4
Tol	NA	25,4 ± 0,2	NA	7,9	NA	9,3 ± 2,2	NA	21,4	NA	4,6 ± 0,08	NA	42,9
Vor	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
AmB	0,10 ± 0,07	0,10 ± 0,01	620,0	640,0	0,09 ± 0,02	0,030± 0,001	688,9	2133,3	0,070± 0,001	0,020± 0,001	885,7	3200,0

NA: não ativo

4.4 Avaliação dos mecanismos de ação de fenticonazol, nistatina, tioconazol e tolnaftato

4.5 Microscopia eletrônica de trasmissão (MET)

Para avaliar as alterações ultraestruturais, foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* como um parasito modelo. A Figura 10A apresenta o aspecto geral dos parasitos pertences ao grupo controle (sem tratamento). Não foram encontradas alterações na forma do parasito, e o mesmo manteve o formato fusiforme característico das formas promastigotas. O núcleo (N) em detalhe na Figura 10B não apresentou alterações de membrana nuclear, a cromatina se encontra frouxa, característica de um parasito normal em fase de interfase da mitose. Na Figura 10C é demonstrado em detalhe a bolsa flagelar (BF), flagelo (F) e cinetoplasto (K), a membrana da bolsa e cinetoplasto se mantiveram íntegros e sem alterações.

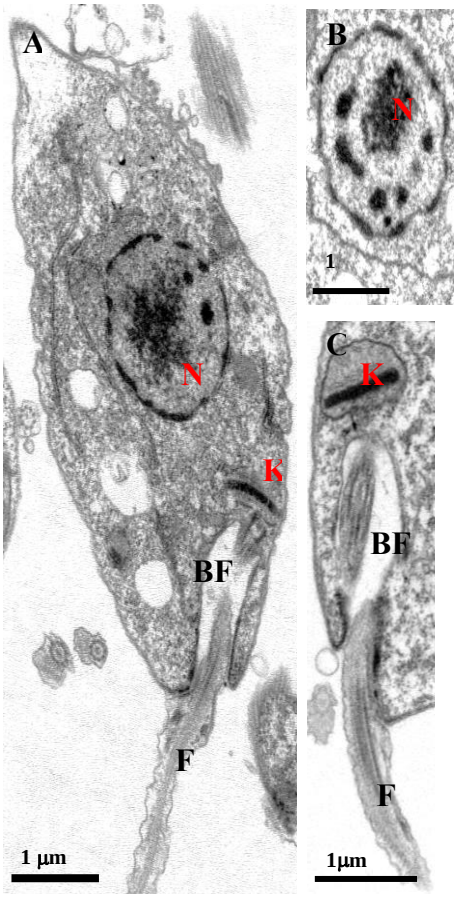

Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica (ME) do grupo controle. A – Aspecto geral de formas promastigotas controle. O parasito mantém seu aspecto fusiforme, sem

apresentar alterações de membranas ou de organelas. (Aumento: ×25k); B – Detalhe do núcleo (N), a membrana nuclear está íntegra e cromatina se encontra frouxa. (Aumento: ×15k); C – Detalhe da bolsa flagelar (BF) e cinetoplasto (K). O flagelo (F) está íntegro e não há alterações de membrana na bolsa flagelar e cinetoplasto. (Aumento: ×20k).

A Figura 11 apresenta imagens das alterações ultraestruturais vistas em parasitos incubados por 24h com fenticonazol. Na Figura 11A é possível observar um parasito que apresentou sua membrana rompida parcialmente (seta), levando a perda do conteúdo intracelular, nessa figura ainda é possível observar a perda de organização da mitocôndria (M), entretanto, o kDNA parece estar preservado. Em um outro exemplo na Figura 11B, é possível observar a perda da forma fusiforme do parasito e desorganização geral do citoplasma, seguida da formação de vacúolos (V) que ocupam quase que totalmente o espaço intracelular, há também danos à mitocôndria, neste caso houve o rompimento de sua membrana. Mesmo com tantos indivíduos afetados, ainda foi possível encontrar parasitos sem perda da forma fusiforme, como na Figura 11C, porém nessa mesma figura ainda podemos observar o núcleo (N) com a cromatina bastante condensada. Em um maior aumento na Figura 11D, é possível observar um descolamento do citoplasma da membrana celular (seta), e apesar disso, os microtúbulos subpericulares aparentam estar intactatos, bem como a estrutura geral da membrana. Adicionalmente vemos em maior detalhe, o núcleo celular (N) com a cromatina condensada.

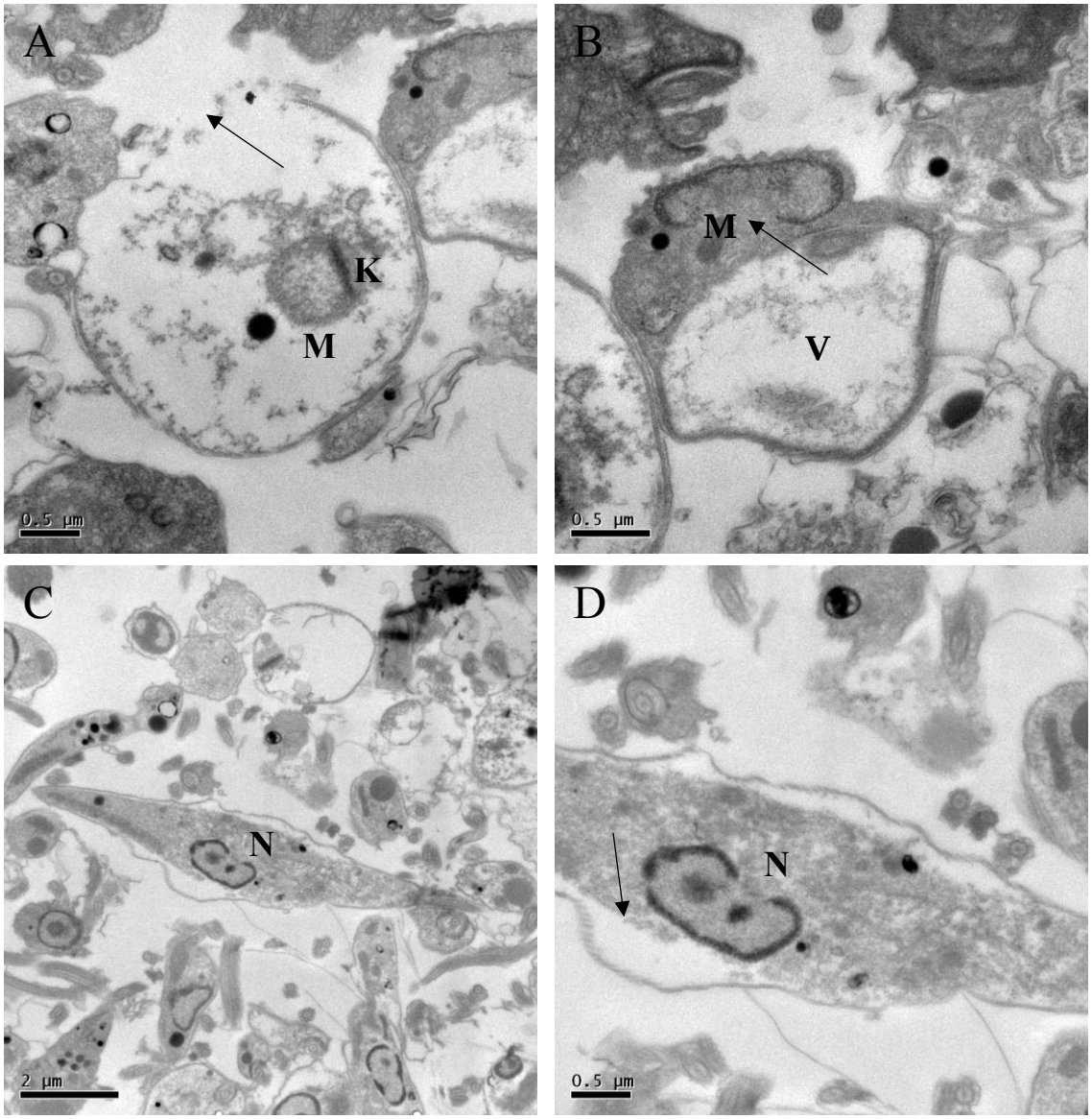

Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos incubados por 24h com a CE_{50} de fenticonazol. A – O parasito perdeu sua forma fusiforme por completo, e já tem sua membrana celular rompida em parte (seta). A mitocôndria (M) parece ter perdido sua forma (Aumento: x30k); B – Outro parasito, mas este já apresenta rompimento da membrana mitocondrial (seta) e um vacúolo (V) o qual ocupa a maior parte do citosol (Aumento: x40k); C e D – Promastigota aparentemente com a forma fusiforme intacta, porém apresenta descolamento do citosol com a membrana celular, visto em maior detalhe em D, apontado pela seta. Adicionalmente, o núcleo (N) apresenta cromatina bastante condensada (Aumento: C – 12k e D – 30k).

A Figura 12 ilustra as alterações ultraestruturais ocorridas nos parasitos incubados por 6h com a CE_{50} do fármaco nistatina. Com 6h os parasitos tratados apresentaram perda de forma fusiforme (Figura 12A), e mostraram formações características da destruição das membranas celulares internas, como a presença de vacúolos (V) com ou sem formações membranares em seu interior. Por exemplo, observaram-se formações mielínicas (FM) (Figura 12B e D) e houve o rompimento de membrana do cinetoplasto (K) (Figura 12B – seta preta). Além disso, observou-se também a ruptura das membranas de vacúolos (Figura 12C e D – setas pretas). O núcleo celular apresentou cromatina condensada (Figura 12A). Adicionalmente, mesmo com a perda da morfologia os microtúbulos subpeliculares não apresentaram maiores alterações (Figura 12A, setas cinza), e também se observou na membrana externa do parasito a formação de bolhas (Figura 12A – setas vermelhas).

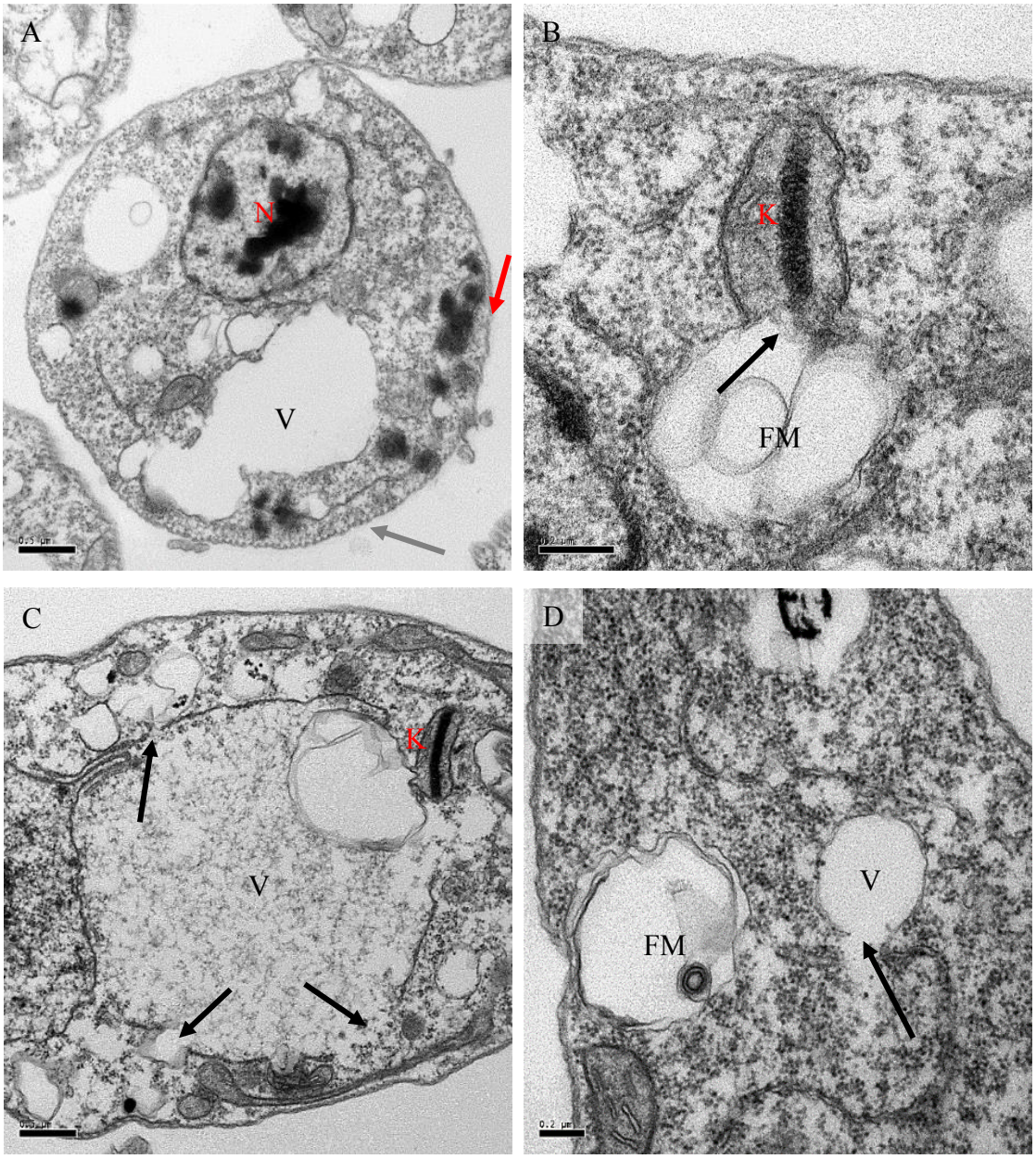

Figura 12: Figuras mostrando a ME do grupo tratado com CE_{50} da nistatina e incubado por 6h. Os parasitos tratados com a droga apresentaram uma série de alterações estruturais nas organelas, principalmente nas membranas. A – O parasito perdeu seu formato fusiforme e se apresenta mais esférico. O núcleo (N) tem sua cromatina condensada e o citoplasma possui vacúolos (V). Apesar dos microtúbulos subpericulares não possuírem alterações (setas cinzas), a membrana externa tem formação de bolhas (setas vermelhas) (Aumento: ×30k); B – Em detalhe o cinetoplasto (K) apresentando lise de membrana (seta vermelha). Dentro do vacúolo podemos encontrar formações mielínicas (FM) características da digestão de lipídeos (Aumento ×100k); C – Em maior detalhe, o vacúolo (V) tem suas membranas rompidas (seta preta) (Aumento: ×30k); D – Em maior detalhe, temos a formação de vacúolos (V) com formações mielínicas seu interior (FM). Um dos vacúolos teve sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×60k)

Quando as formas promastigotas foram tratadas com a CE_{50} da nistatina por 24h (Figura 13A e B), observou-se que os parasitos apresentaram desestruturação completa de sua estrutura externa. Além disso, completa destruição de organelas intracelulares foi observada (setas amarelas), não sendo possível diferenciá-las.

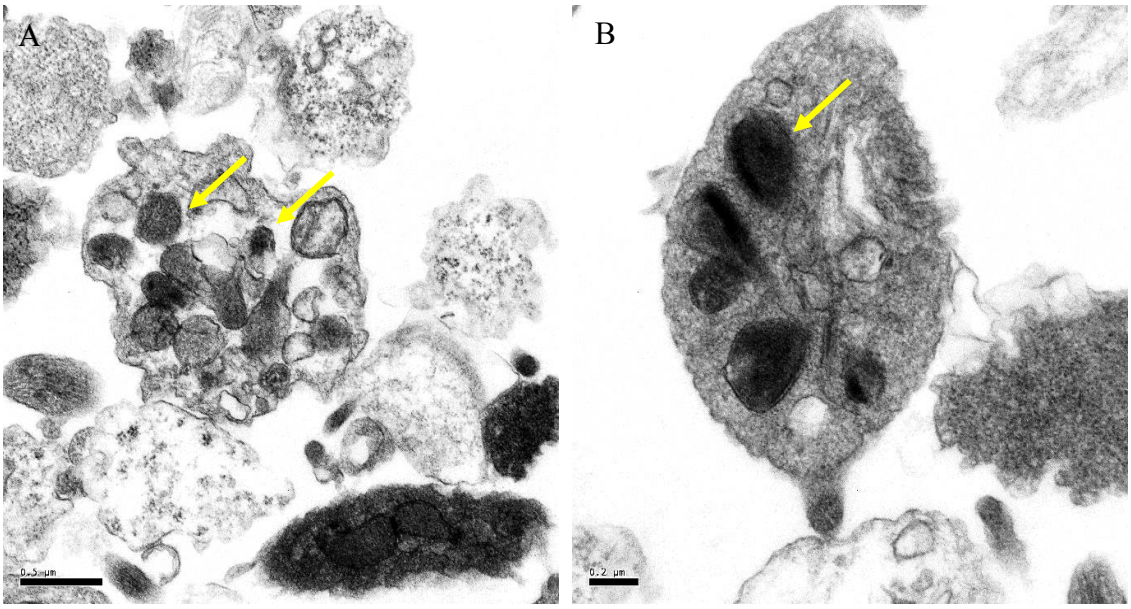

Figura 13: Microscopia eletrônica dos grupos tratados com CE_{50} de nistatina e incubadas por 24h. Em ambas figuras, os parasitos perderam todo o seu formato e é praticamente impossível distinguir suas organelas internas. A – A membrana celular se encontra totalmente rompida e o parasito perdeu completamente sua forma (Aumento: ×40k); B – Apesar de ainda possuir membrana, a mesma aparenta apresentar muitos poros, não sendo possível distinguir em nada no interior do citoplasma (Aumento: ×60k).

Na Figura 14 são mostrados os parasitos tratados com a CE_{50} de tioconazol por 6h. Observou-se que os parasitos perderam a formato fusiforme e se encontram mais esféricos (Figura 14A e B). Apesar disso, os microtúbulos subpericulares aparentam estar intactos (Figura 14B – seta cinza). Além disso, detectaram-se vacúolos no citoplasma (Figura 14A – V). Aparentemente, as membranas nucleares se mostram degradadas e o material nuclear parece estar livre no citoplasma (Figura 14A e B); na Figura 14A a mitocôndria do parasito se encontra fragmentada (M) e o cinteplasto (K) degenerado (Figura 14B). Em maior detalhe na Figura 14C, observa-se uma mitocôndria com morfologia alterada e apresentando sua membrana externa rompida (seta preta). Em adição às alterações de organelas, encontra-se o kDNA com degeneração de membrana como detalhado em maior aumento na Figura 14D.

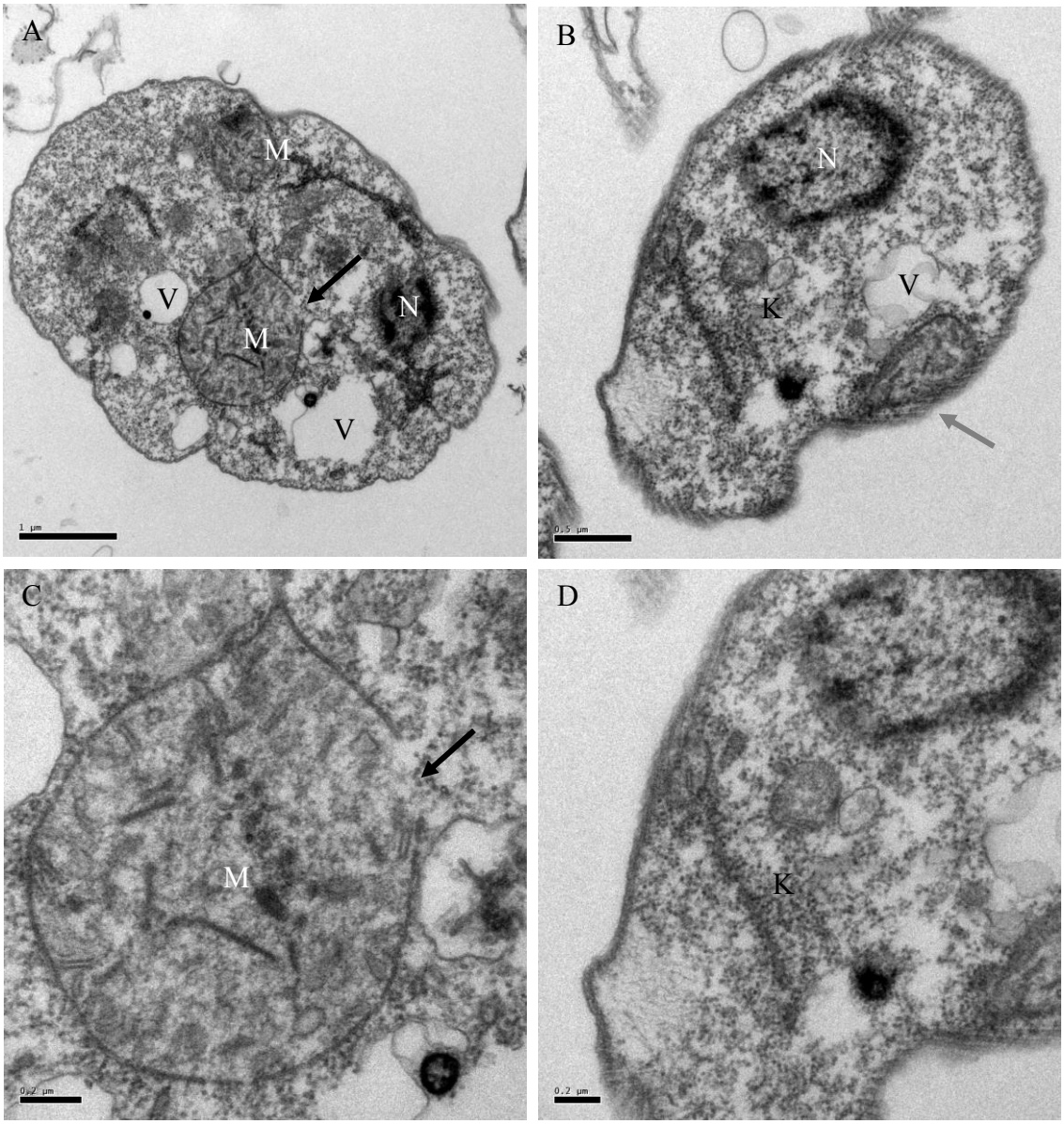

Figura 14: Microscopia eletrônica dos grupos tratados com CE_{50} de tioconazol e incubados por 6h. A – O parasito perdeu sua forma normal, além de apresentar um núcleo (N) com a membrana rompida e vários vacúolos (V) no citoplasma. A mitocôndria (M) tem parte de sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×25k); B – Observa-se perda da forma fusiforme, porém não há alterações de microtúbulos subpericulares (seta cinza), adicionalmente existem alterações no citoplasma, como a presença de vacúolos (V). O núcleo (N) não aparenta estar envolvido por membrana assim como o cinetoplasto (K) (Aumento: ×40k); C – Detalhe da mitocôndria com sua membrana rompida (seta preta) (Aumento: ×80k); D – Detalhe de B, o cinetoplasto (K) aparenta ter perdido sua membrana (Aumento: ×60k).

Na Figura 15, observou-se que os grupos tratados com CE_{50} de tioconazol e incubados por 24h apresentou completa degeneração citoplasmática (Figura 15A e B), restando algumas organelas com material eletro-denso (setas pretas). Embora tenham sido verificadas estas alterações, a membrana celular externa apresentou-se sem poros, e com microtúbulos subpeliculares visivelmente intactos.

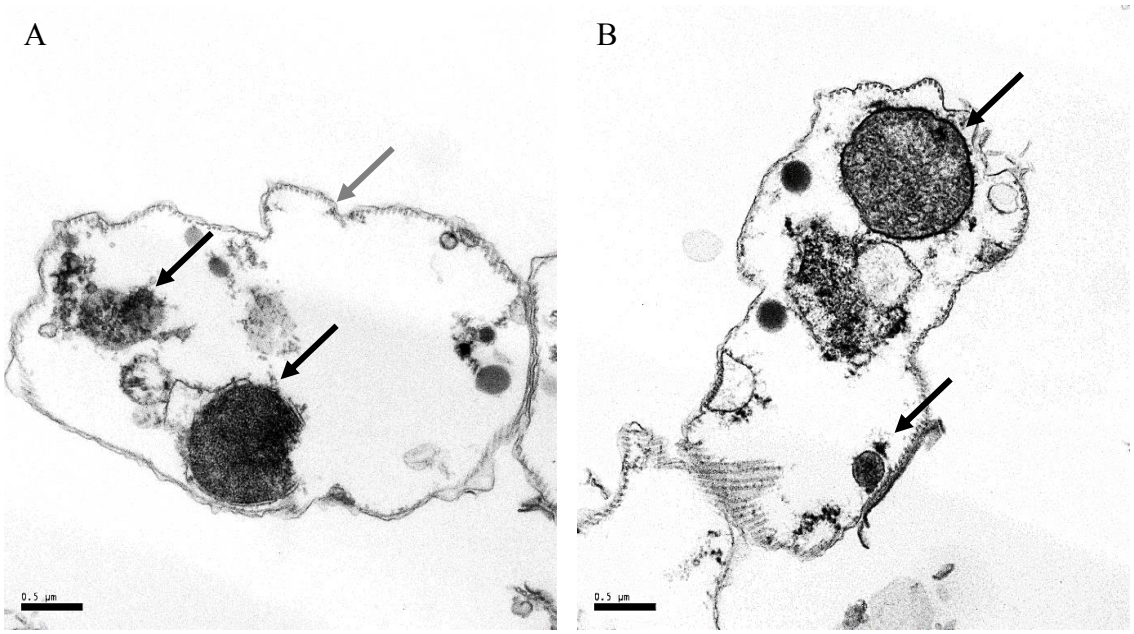

Figura 15: Microscopia eletrônica do grupo tratado com CE_{50} de tioconazol e incubado por 24h. Em ambos os casos, podemos ver que as membranas internas, constituídas por ergosterol, estão praticamente digeridas e sobrando apenas os microtúbulos subpericulares (seta cinza) e restos de organelas de material mais eletro-denso (setas pretas). A – Aumento ×30k; B – Aumento ×40k.

As promastigotas incubadas com a CE_{50} de tolnaftato por 48h apresentaram perda de forma fusiforme, porém sem rompimento de membrana. Apesar disso, há formação de bolhas na superfície da membrana celular (setas). Não há danos observados ao citoplasma neste exemplo, entretanto a mitocôndria (M) aparenta estar inchada, mas sem danos à sua membrana. O núcleo (N) parece estar com sua membrana íntegra também, porém apresenta cromatina condensada (Figura 16A). Em maior aumento, as bolhas encontradas na superfície da membrana celular de alguns parasitos (Figura 16B). Outro exemplo de parasito encontrado na incubação com tolnaftato, o parasito não apresenta danos à membrana celular também, porém é possível observar com maiores detalhes alguma perda do conteúdo do citoplasma. Núcleo apresenta cromatina condensada e mitocôndria não aparenta ter cristas e com aspecto inchado (Figura 16C). Neste último exemplo, além das características já observadas anteriormente, é possível observar em melhor detalhe a formação de um vacúolo (V) no citoplasma (Figura 16D).

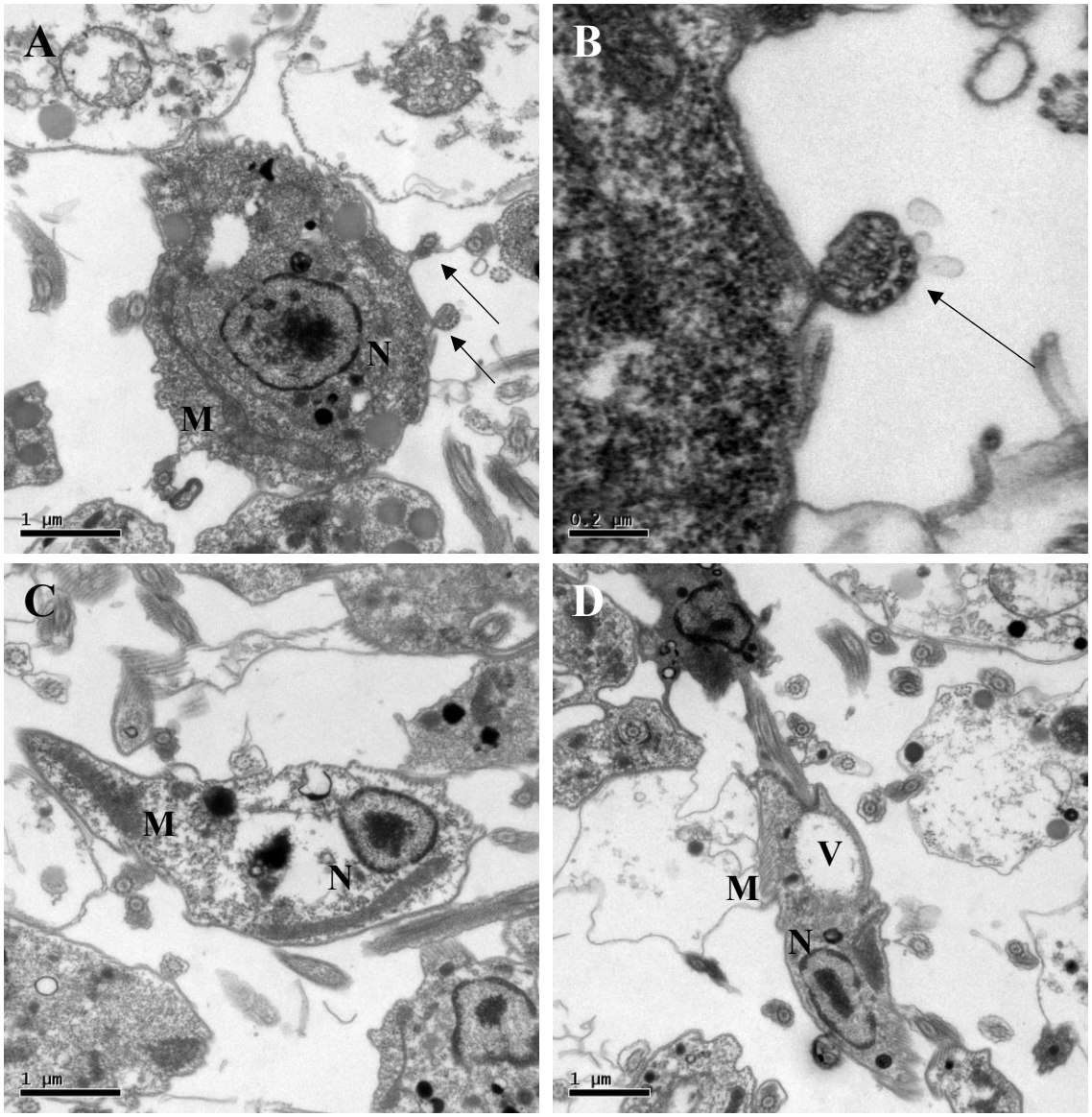

Figura 16: Imagens de MET de parasitos incubados por 48h com a CE_{50} de tolnaftato. De maneira geral, apresenta perda de forma fusiforme e uma série de alterações na membrana celular, citoplasma e organelas. A – Aspecto geral do parasito. A membrana celular apesar de intacta apresenta bolhas (setas). O conteúdo citoplasmático aparenta estar íntegro, bem como as membranas do núcleo (N) e mitocôndria (M). O núcleo apresenta cromatina condensada e a mitocôndria aparenta ter perda de organização interna e inchaço (Aumento: x25k); B – Em detalhe, bolha da membrana celular (seta) (aumento: x100k); C – Aspecto geral do parasito, perda de alongamento e forma fusiforme, núcleo com cromatina densa e mitocôndria com danos às cristas e perda de forma (Aumento: x25k); D – Outro exemplo geral de parasito, neste é possível observar a formação de vacúolo (V) no citoplasma, e em maior detalhe danos à mitocôndria. Núcleo novamente com material condesado (Aumento: x20k).

As promastigotas tratadas com CE_{50} de voriconazol por 48h apresentaram alterações em sua forma normal (Figura 17A e B), se tornando esféricas. Também não foram observadas alterações nos microtúbulos subpericulares (seta cinza) como mostrado na Figura 17B. Em maiores detalhes na Figura 17C, é observado o núcleo (N) com cromatina bastante condensada, e mitocôndrias (M) com sinais de lise (seta preta). O cinetoplasto (K) também se encontra alterado como visto em maior detalhe na Figura 17D.

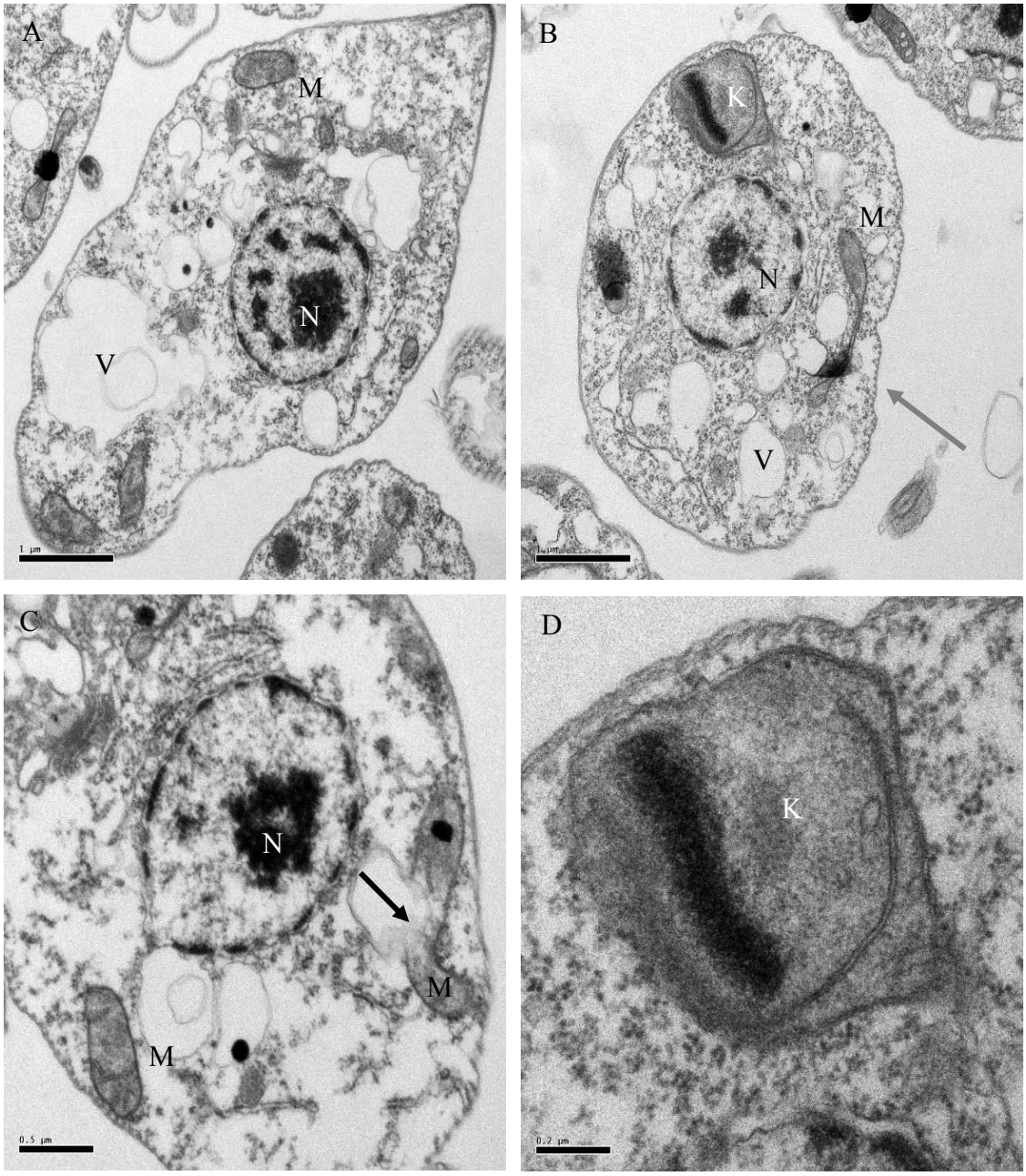

Figura 17: Microscopia eletrônica das promastigota incubadas com CE_{50} do voriconazol por 48h. A – O parasito apresentou perda da forma fusiforme e vacúolos (V) no citoplasma. Observam-se também alterações no formato geral da mitocôndria (M) e a cromatina está condensada no núcleo (N) (Aumento: ×25k); B – Novamente, o parasito perdeu seu aspecto fusiforme, porém os microtúbulos não apresentam alterações (seta cinza). O citoplasma também possui vacúolos (V). A cromatina nuclear também está condensada em N. As mitocôndrias (M) e cinetoplasto (K) perderam seus aspectos normais e apresentam sinais de degeneração; (Aumento: ×25k).

Adicionalmente, realizou-se um controle com a CE_{50} de anfotericina B por 24h. Assim como observado em grupos anteriores, o fármaco causou danos intracelulares visíveis, apesar de não ter causado danos à forma do parasito, e a membrana celular aparenta não ter danos (Figura 18A). Entretanto, internamente são visíveis a vacuolização do citoplasma (V) e a formação de figuras mielínicas (FM). Não se observou também danos à estrutura da bolsa flagelar (BF), ou ao cinetoplasto (K). O núcleo (N) também aparenta sinais de degradação, pois sua cromatina se encontra condensada se comparada ao controle (Figura 10). Podemos ver em detalhe nas Figura 18B e C as formações de vacúolos e mielínicas, o núcleo, bem como a estrutura da mitocôndria (M) que parece estar intacta.

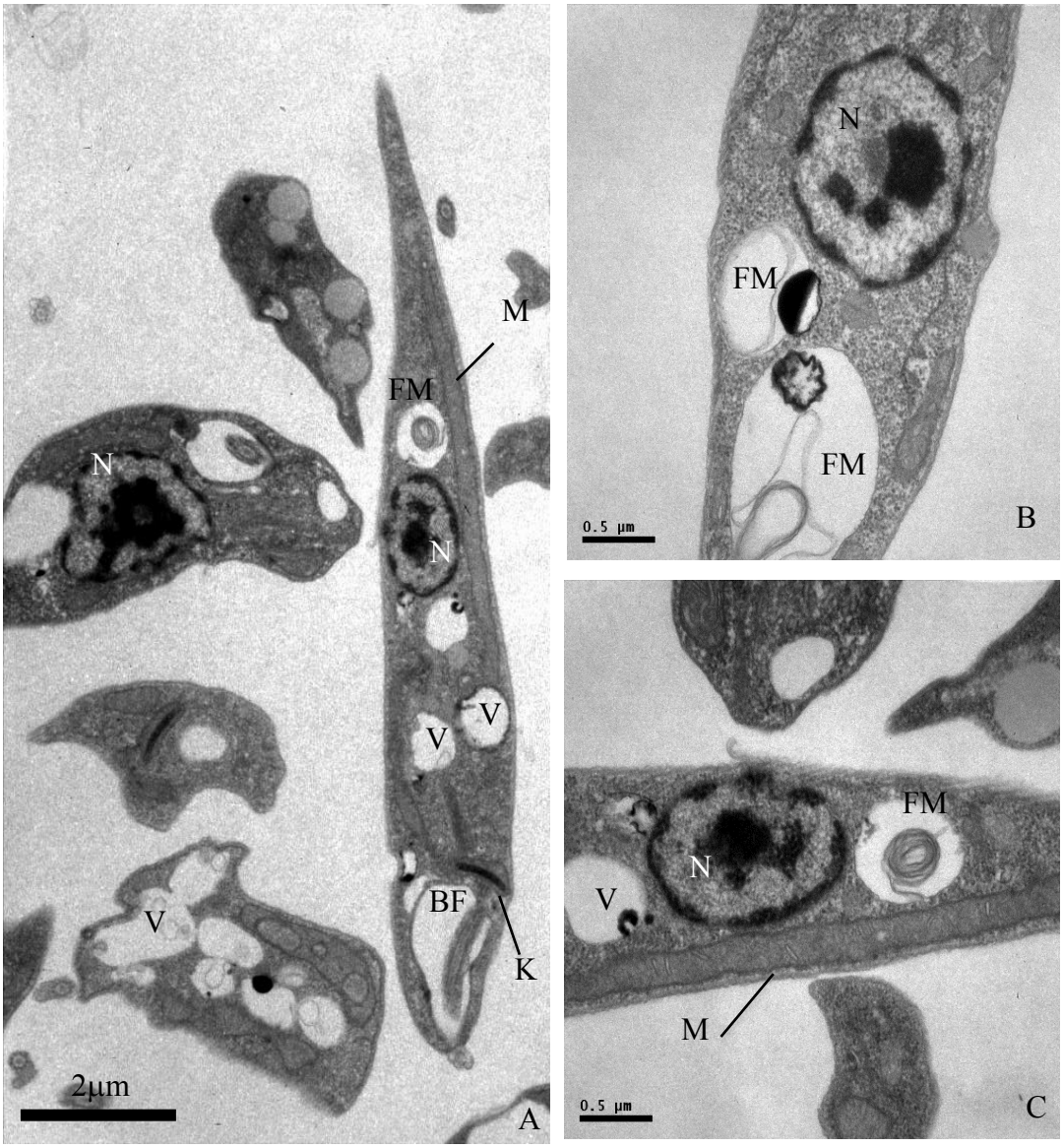

Figura 18: Figuras de microscopia eletrônica de promastigotas incubadas por 24h com CE_{50} de anfotericina B. A – Formato geral do parasito não apresenta alterações, entretanto se pode observar vacuolização interna (V) e presença de formações mielínicas (FM). Não houve maiores danos a estrutura do kDNA (K), porém o material genético do núcleo (N) apresenta cromatina condensada (Aumento: ×10k); B – Detalhe em maior aumento dos vacúolos encontrados no citoplasma. Houve formações mielínicas (FM) típicas de degradação de ergosteróis (Aumento: ×40k); C – Destaque da mitocôndria (M) que aparenta estar com a membrana intacta e sem maior perda de forma. Detalhe de uma FM típica com as cadeias lipídicas espiraladas (Aumento: ×40k).

4.6 Avaliação da integridade de membrana celular e alterações do potencial mitocondrial

As promastigotas de *L. amazonensis* não apresentaram alterações de membrana significantes detectáveis pela sonda Sytox Green ao fim de 60 minutos de incubação nos

parasitos tratados com as diferentes drogas. Os níveis apresentados pelos grupos tratados sugerem resultados próximos a um resultado basal do controle negativo sem tratamento (Controle). Para comparação, os parasitos tratados com Triton X100 do controle positivo (Controle +) apresentaram fluorescência normalizada na ordem de 20, bem acima do observado para todos os outros grupos. Isso pode ser melhor visualizado no gráfico abaixo (Figura 19).

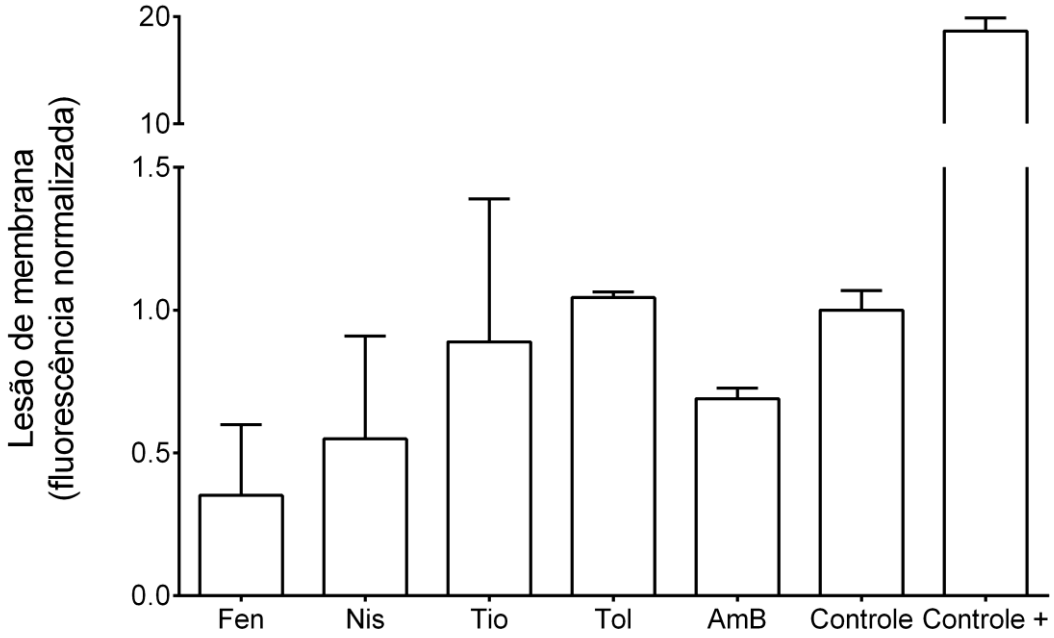

Figura 19: A perturbação de membrana celular dos parasitos tratados com as CE50 de fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB) foi investigada usando a sonda SYTOX Green®, utilizando-se Triton X100 como indutor de lesão de membrana. Não foram observadas maiores mudanças nas membranas celulares quando comparado ao observado do controle positivo (+)

Já para a análise do potencial de membrana mitocondrial, os parasitos tratados com as CE_{50} de fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tolnaftato (Tol) e anfotericina B (Amb) apresentaram diminuição no potencial de membrana mitocondrial, sendo estatisticamente diferentes do controle negativo sem tratamento (Controle) e próximos aos níveis observados nos parasitos do controle positivo (Controle +) tratados com oligomicina. Este resultado é condizente ao observado nas imagens de MET, onde se observou danos variados à estrutura e organização da mitocôndria dos parasitos.

Porém, de maneira inesperada, os resultados para os parasitos tratados com tioconazol (Tio) indicam que não houve mudanças no potencial de membrana mitocondrial, pois houve um alto nível de fluorescência detectado, muito próximo ao controle negativo (Figura 20).

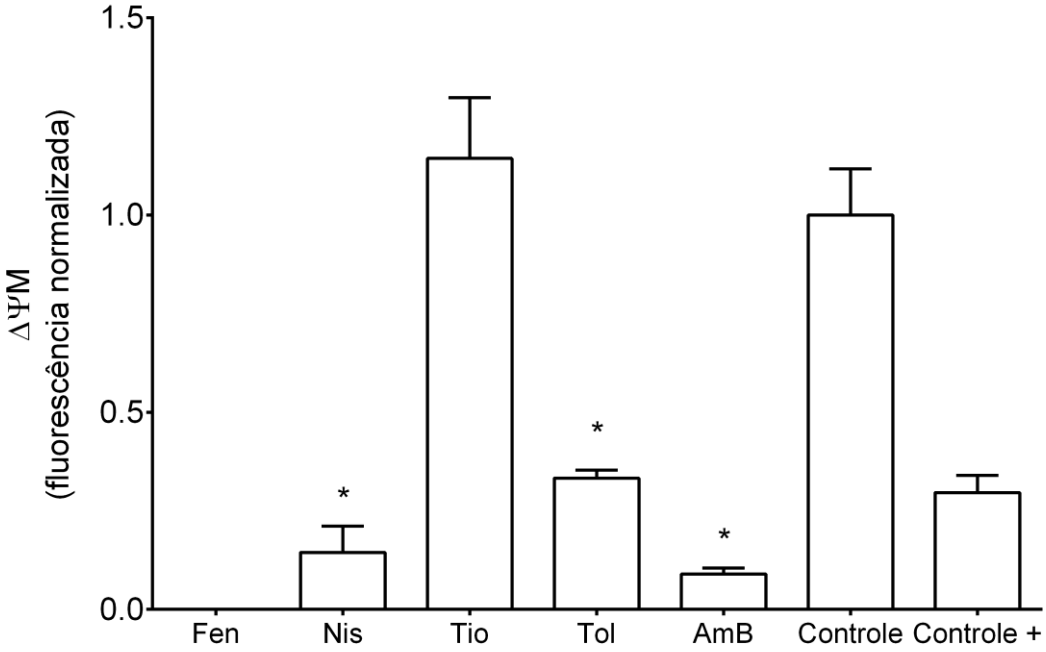

Figura 20: O potencial transmembrana mitocondrial dos parasitos tratados com CE50 de fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB) foi investigado utilizando-se da sonda Rodamina 123; a oligomicina (5) foi utilizada como controle positivo (Controle +) devido a sua habilidade de inibir o potencial transmembrana mitocondrial.

4.7 Produção de NO e H_2O_2 e alteração do pH intracelular

Para avaliar se as drogas alteravam a resposta da célula hospedeira, foram mensuradas as concentrações de NO, H_2O_2 assim como o pH intracelular.

Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a CE_{50} de fenticonazol (Fen) apresentaram diminuição significativa dos níveis de fluorescência quando comparado ao controle infectado (Inf controle) e estando próximo aos controles positivos, tanto infectado quanto não-infectado, Inf controle + e NI controle +, respectivamente.

Isso indicaria uma alcalinazação do citoplasma (Figura 21). Já os macrófagos tratados com nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotericina B (AmB) não apresentaram mudanças significativas no pH quando comparados com os controles positivos, onde mesmo os macrófagos infectados quando tratados com o alcalinizante $NHCl_4$, apresentaram nível de fluorescêcia menores que os controles negativos infectados ou não-infectados, Inf controle e NI controle, respectivamente.

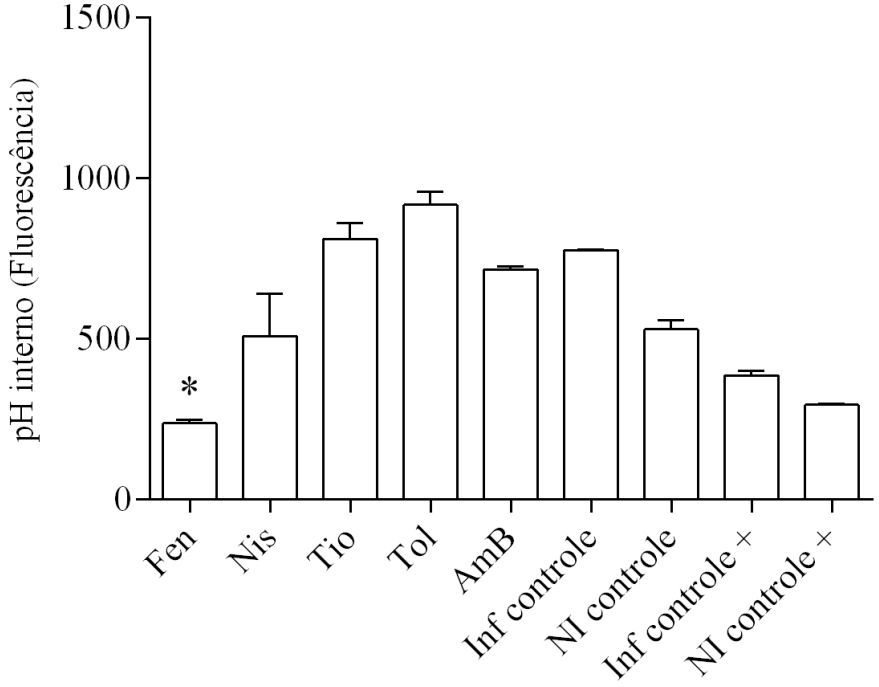

Figura 21: Macrófagos infectados e tratados com as CE50 do fenticonazol (Fen), nistatina (Nis), tioconazol (Tio), tolnaftato (Tol) e anfotercina B (AmB). Apenas Fen apresentou diferença significativa quando comparados aos controles. Os controles negativos são controles de macrófagos infectados (Inf) ou não-infectados (NI) que não receberam nenhum tipo de composto durante sua incubação. Os controles positivos (Inf controle + e NI controle + foram células infectadas (Inf) ou não (NI) as quais foram incubadas juntamente com um conhecido alcalinizante citoplasmático, o $NHCl_4$.

Os sobrenadantes dos macrófagos infectados e tratados foram coletados, porém não produziram níveis detectáveis de H_2O_2 ou NO.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram caracterizados os efeitos dos fármacos em formas promastigotas, macrófagos e amastigotas intracelulares, além disso, caracterizou-se as alterações ultraestruturais dos parasitos tratados com os fármacos e avaliaram seus índices de seletividade tanto para formas promastigotas quanto amastigotas. Com os resultados de atividade antiamastigota, os fármacos com as melhores seletividades tiveram seus mecanismos de ação avaliados como possíveis alterações à membrana celular e ao potencial de membrana mitocondrial, bem como possíveis alterações à fisiologia interna de macrófagos como o pH intracelular e sua produção de NO e H_2O_2. Os achados deste estudo são de grande importância devido à carência de fármacos disponíveis para tratamento, os quais possuem efeitos tóxicos a vertebrados. Além disso, o uso da monoterapia aumenta o risco do aparecimento de cepas resistentes ao tratamento (PONTE-SUCRE et al., 2017) e atualmente, e mesmo a melhor opção ainda possui limitações de transporte, impedindo sua maior distribuição, e também está sujeita à falhas de tratamento (CHAPPUIS et al., 2007; HENDRICKX et al., 2017).

Neste sentido, estudos com inibidores da rota de esteróis em tripanossomatídeos apresentam grande potencial na busca por alternativas menos tóxicas, pois os parasitos pertencentes a esta família, assim como fungos, são dependentes da formação do ergosterol e outros esteróis do tipo 24-alquila para constituição de suas membranas biológicas, que conferem a estes parasitos, meios de sobrevivência na célula hospedeira (GHOSH et al., 2012; SEMINI et al., 2017). A via metabólica para produção de ergosterol é bastante complexa, e envolve a ação de diferentes enzimas, assim o bloqueio das mesmas pode gerar perturbação nas membranas celulares, levando a morte celular destes organismos (DE VITA et al., 2016). Assim, neste estudo estão sendo mostrados resultados referentes à ação da rosuvastatina que age na enzima HMG-CoA responsável pelo primeiro passo na via de produção do ergosterol (DINESH; SOUMYA; SINGH, 2015; HU et al., 2016), os fármacos triazóis (tioconazol, fenticonazol e voriconazol) que agem na enzima CYP51/14DM (HAEGLER et al., 2017), dois fármacos (tolnaftato e naftifina) que agem na SEO (ARNOLDI et al., 2007; BARRETT-BEE; LANE; TURNER, 1986) e a nistatina a qual age diretamente no ergosterol (SZWARC et al., 2016).

Os triazóis agem na enzima 14-DM, e tais fármacos apresentaram efeito contra formas promastigotas e/ou amastigotas. Na família dos azóis, o fenticonazol e o tioconazol mostraram-se eficazes contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Entretanto com 24h de incubação, também se observou citotoxicidade aos macrófagos peritoneais para ambos os fármacos, ainda assim, observou-se tendência do fenticonazol ser mais seletivo para as formas promastigotas e amastigotas das três espécies. Sendo que as amastigotas *L. (V.) braziliensis* apresentaram maior sensibilidade ao fármaco, sendo até 30 vezes mais seletivo ao fim de 48h de incubação. Os resultados para *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* também apresentam sensibilidade ao tratamento com fármaco, mas apresentaram uma sensibilidade moderada de até 11,5 vezes mais seletivo às amastigotas.

Já o tioconazol apresentou baixa seletividade às formas amastigotas para todas as espécies, mesmo com uma seletividade moderada às promatigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* com 48h de incubação, que foram respectivamente de 15,9 e 33,8. Essa atividade anti-*Leishmania* não se manteve e nas espécies de parasito causadoras do quadro cutâneo, *L. amazonensis* e *L. braziliensis,* e houve baixa seletividade para amastigotas com um IS calculado de no máximo 3 com 48h de incubação. Mesmo com *L. infantum* sendo mais sensível ao tratamento, o resultado calculado de IS foi baixo e não ultrapassou 4,4. Este resultado está associado à citotoxcidade elevada do fármaco.

O voriconazol da mesma família de fármacos por sua vez, foi incapaz de eliminar formas promastigotas com 24h de incubação, mas foi observada atividade anti-promastigota com 48h de incubação. Além disso, sua baixa citotoxicidade fez o fármaco ter uma seletividade elevada para as promastigotas das três espécies testadas. Entretanto, este efeito não se manteve para o teste com amastigotas intracelulares e o fármaco foi incapaz de eliminá-las.

Esses resultados eram esperados para os triazóis, visto que previamente, fármacos azólicos como o itraconazol e cetaconazol apresentaram efeitos leishmanicidas contra diferentes espécies de *Leishmania in vitro* (HART et al., 1989), além de haver evidências clínicas de serem efetivos para o tratamento de espécies dermatotrópicas (DOGRA et al., 1990; DOGRA; SAXENA, 1996). Até o momento, desconhece-se a existência de estudos com o fenticonazol contra espécies de *Leishmania* ou outros parasitas relacionados. E mais recentemente, azóis derivados foram produzidos e testados contra formas

amastigotas de *L. major*, e foram mais seletivos para as formas amastigotas que macrófagos da linhagem J774A.1, sendo até 30 vezes mais seletivos para amastigotas (KEIGHOBADI et al., 2019). Em contrapartida, o voriconazol apresentou atividade apenas contra promastigotas e com 48h de incubação, sendo altamente seletivo para todas as espécies. Mesmo com outros estudos demonstrando sua efetividade para formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (KULKARNI et al., 2013), no presente estudo o fármaco foi incapaz de eliminar amastigotas intracelulares. Tal resultado sugere que a membrana celular dos hospedeiros pode representar uma barreira para a entrada do voriconazol nos vacúolos parasitóforos e eliminar as formas amastigotas.

Quanto aos possíveis mecanismos de ação do fenticonazol, observou-se extensa degradação das promastigotas de *L. amazonensis* nas imagens de MET. Com apenas 24h de tratamento, os parasitos apresentaram perda de forma fusiforme, alguns indivíduos apresentaram a membrana celular pelo menos parcialmente rompida ou com deformações como bolhas, porém a maior parte não apresentou sinais danos a sua constituição ou aos microtúbulos subpeliculares. Quanto a organização geral do citoplasma, alguns parasitos apresentaram o meio intracelular praticamente ocupado por vacúolos e até mesmo descolados da membrana celular. Com relação às organelas, as mitocôndrias apresentaram perda de forma e de sua organização interna das cristas ou até mesmo com a membrana rompida, mas sem maiores alterações ao kDNA. O núcleo por sua vez, foi observado com cromatina condensada, mas sem danos visíveis à estrutura de sua membrana.

Estes resultados são parecidos aos já observados anteriormente por (VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009) onde o fármaco azol, o cetoconazol, quando utilizado para o tratamento de promastigotas de *L. amazonenis* causou danos extensos na estrutura externa da membrana celular (bolhas e perda de forma) e na estrutura de mitocôndria (inchaço e destruição de cristas), além de vacuolização do citoplasma ocorrida por conta do acúmulo de precurssores lipídicos em acidocalciossomos. No estudo de (LUQUE-ORTEGA et al., 2003) também há a formação vacuolar e desestabilização da mitocôndria. A MET parece apontar um mecanismo de ação do meio intracelular e não no rompimento de membrana de *Leishmania* como será discutido nos parágrafos abaixo.

Os resultados de MET são condizentes aos observados nos resultados dos testes para formação de poros de membrana e alterações do potencial de membrana

mitocondrial. No geral, não foi observado a formação de poros de membrana na MET e os valores observados com a sonda Sytox Green (SyG) para o fenticonazol estão próximos do controle sem tratamento, ou seja, um valor basal é observado. Em contrapartida, não houve fluorescência utilizando a sonda Rodamina 123 (Rod-123), indicando ausência do potencial de membrana da mitocôndria dos parasitos tratados com o fármaco, similar ao resultado do controle tratado com oligomicina, o qual inibe o potencial de membrana mitocondrial. De acordo com o observado nas imagens de MET, os parasitos apresentaram mitocôndrias com membranas rompidas, ou mesmo sem forma, inchadas ou organização interna de cristas, com estes resultados é possível confirmar que o fármaco está levando à destruição da viabilidade do parasito através de algum mecanismo associado à perda de potencial de membrana mitocondrial e não à poros de membrana celular. De forma interessante, observou-se que o fenticonazol foi capaz de alterar o pH interno dos macrófagos infectados, próximos aos grupos tratados com alcalinizante $NHCl_4$, estando possivelmente ligado à diminuição da população de amastigotas internalizadas pelos macrófagos, já que não houve produção de NO ou H_2O_2.

A destruição mitocondrial vista na MET e apontada no teste com Rod-123 do fenticonazol é esperada, visto que há enzimas relacionadas à via de ergosterol presentes na parte interna da mitocôndria do parasito (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018), e o acúmulo de esteróis está possivelmente sendo danoso à organela. Adicionalmente, o fármaco foi uma das drogas com maior seletividade para amastigotas, além de alterações mitocondriais diretamente no parasito, o composto parece alcalininzar o pH intracelular dos macrófagos hospedeiros. Sabe-se que o pH intracelular de macrófagos cai rapidamente após a fagocitose dos parasitos, e isso está relacionado à sobrevivência de *Leishmania* no interior dos fagossomos (JIANG; WINGET; MUKKADA, 1994). Isso parece ser similar ao tratamento com tamoxifeno, onde a alcalinização parece estar relacionada à redução da viabilidade das amastigotas internas (MIGUEL et al., 2007).

Apesar da baixa seletividade do tioconazol, esse fármaco foi capaz de causar extensos danos às promastigotas de *L. amazonensis* tratadas. Os parasitos apresentaram perda completa de forma e do conteúdo citoplásmatico e muitas vezes não foi possível identificar as organelas internas. Contudo, a membrana celular parecia intacta sendo compatível com os resultados observados utilizando a sonda SyG. Porém, causa estranheza a ausência de diminuição do potencial mitocondrial dos parasitos tratados,

observados através do teste com Rod-123, sendo que o tioconazol também foi incapaz de alterar o pH intracelular. Por isso, o mecanismo não está relacionado à mitocôndria ou danos à estrutura da membrana celular como observados pelos resultados das sondas fluorimétricas, possivelmente o parasito está acumulando uma série de esteróis metilados tóxicos, que normalmente seriam metabolizados pela 14DM, e isto estaria inibindo o seu crescimento e levando à destruição parasitária (EMAMI; TAVANGAR; KEIGHOBADI, 2017). Sabe-se também que os subprodutos da 14DM são importantes para o crescimento celular (BURDEN; COOKE; CARTER, 1989), logo a inibição da enzima parece ser de fato o mecanismo de ação para o tioconazol.

O outro fármaco, a nistatina que age especificamente no ergosterol, apresentou seletividade elevada para promastigotas e amastigotas de todas as espécies. Associada à uma baixa citotoxicidade e ao fato de a nistatina não ser um inibidor de enzimas (que podem ter alterações em sua estrutura dependendo da espécie analisada) pertencentes à via metabólica como os outros antifúngicos, mas sim do produto final desta via, que é o ergosterol, sua seletividade elevada para todas as espécies é compatível com o esperado, por não haver diferenças estruturais no esqueleto do ergosterol entre as espécies, por isso este fármaco deve agir de forma homogênea entre as espécies. Assim como a anfotericina B, este fármaco pertence à família dos polienos, portanto, seu mecanismo de ação estaria relacionado à formação de poros na superfície de membranas por possuir afinidade com ergosterol, levando a um influxo de fluídos para o interior de células ou organelas, causando a morte do parasito (CHEN et al., 2013; SERHAN et al., 2014), entretanto os resultados de MET e de SyG parecem apontar um outro mecanismo de ação, pois apesar de apresentar extensos danos internamente, sua membrana celular externa aparentou estar intacta, confirmado pela baixa permeabilidade de membrana à sonda observada no resultado de SyG para nistatina.

Até o presente momento não existem estudos realizados sobre a ação da nistatina em espécies neotropicais de *Leishmania* sp., tornando difícil comparações assertivas sobre os resultados encontrados e mostrados neste trabalho. Entretanto, LUQUE-ORTEGA et al., 2003 demonstrou que a nistatina foi capaz de eliminar formas promastigotas da espécie *L. major* com CE_{50} = 1,4 µM, resultado próximo aos apresentados neste trabalho. Neste mesmo estudo de 2003 demonstrou-se que a nistatina possivelmente age na membrana mitocondrial dos parasitos, através da depleção dos níveis de ATP. Este mecanismo parece ser o mais condizente com os resultados obtidos

de Rod-123, pois a nistatina teve diferença significativa quando comparado ao controle negativo não-tratado, e apresentou alta perda de potencial de membrana mitocondrial similar ao controle positivo tratado com oligomicina. Além disso, a nistatina também não estimulou a produção de NO ou H_2O_2 ou a alcalinização dos macrófagos hospedeiros.

Há também estudos anteriores sobre a ação leishmanicida da nistatina, porém estes foram feitos apenas contra formas promastigotas (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2012; GHOSH et al., 1961). Além disso, os estudos de MET reforçam que a nistatina age na depleção de ergosterol, uma vez que características morfológicas associadas a toxicidade de lipídios, como formação de vacúolos citoplasmáticos e formações mielínicas, foram encontradas nas promastigotas avaliadas. Assim como no estudo de LUQUE-ORTEGA et al., 2003 onde as mesmas características foram encontradas. Adicionalmente, os dados sobre pH intracelular e produção de NO e H_2O_2 nas células hospedeiras sugerem que este fármaco de fato tem ação direta sobre os parasitos, parecendo estar relacionado à perturbação do potencial de membrana mitocondrial como visto no teste com Rod-123 e nos resultados de MET.

O fármaco anti-hiperlipidêmico rosuvastina, um inibidor de HMG-CoA redutase apresentou baixa ou ausente citotoxicidade, porém não apresentou ação contra formas promastigotas e amastigotas em nenhum dos períodos considerados, sugerindo que este fármaco não foi capaz de se ligar a enzima HMG-CoA redutase de *Leishmania* sp. Por esta razão, não foi avaliada nos estudos de mecanismo de ação.

O tolnaftato e a nafitfina são dois fármacos relacionados a inibição enzimática da esqualeno epoxidase (SEO) em fungos. No presente estudo, a naftifina apresentou uma baixa atividade antipromastigota, além de baixa seletividade e alta citotoxicidade. Já o tolnaftato, apesar de não ter efeito leishmanicida com 24h de incubação, apresentou maior eficiência com um aumento da exposição dos parasitos a ele. Adicionalmente, o fármaco teve uma moderada citotoxicidade e seletividade às formas promastigotas das três espécies. Em relação às formas amastigotas, observou-se que a nafitfina não teve qualquer efeito contra as formas amastigotas das espécies utilizadas nesse estudo, independentemente do tempo de incubação e por isso, as alterações morfológicas e fisiológicas não foram avaliadas. O tolnaftato foi ativo para todas as espécies, apesar de *L. amazonensis* ser mais resistente ao tratamento que as outras duas espécies do estudo.

A MET dos parasitos tratados com Tol revelaram características similares aos já observados para os outros fármacos, tais como, perda de formato, porém com membrana celular íntegra e com bolhas na sua superfície, danos no citoplasma (vacúolos), mitocôndria inchada e núcleo com cromatina condensada. Em estudo anterior conduzido por VANNIER-SANTOS et al., 1995, foi demonstrado que promastigotas de *L (L.) amazonensis* tratadas com terbinafina, fármaco que também inibe a SEO, detectou-se a presença de corpos multivesiculares no citoplasma celular e também alterações estruturais da parte interna das mitocôndrias, onde as cristas mitocondriais estavam organizadas em padrões de empilhamentos, ou até mesmo circulares, sugerindo que fármacos inibidores da formação do ergosterol de *Leishmania* sp. podem desestabilizar principalmente as membranas de organelas citoplasmáticas. Em um estudo mais recente por (BEZERRA-SOUZA et al., 2016), as promastiogtas tratadas com butenafina, outra droga inibidora da SEO, apresentaram alterações similares às organelas internas vistas na MET dos parasitos tratados com tolnaftato. Além disso, a butenafina também foi capaz de eliminar as promastigotas e amastigotas de maneira significante, e com valores próximos aos encontrados para Milt.

Adicionalmente, as promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o tolnaftato também não apresentaram danos à membrana celular no teste com SyG, e foram observados níveis de fluorescência similares ao controle e abaixo dos parasitos com a membrana rompida utilizando Triton X 100. Já para o teste de Rod-123, os parasitos incubados com a droga apresentaram níveis de fluorescência similar ao controle positivo e uma diferença significante em relação ao controle negativo, indicando que a incubação com Tol estaria alterando o potencial de membrana da mitocôndria. Também não houve alteração do pH intracelular de macrófagos hospedeiros ou alterações nos níveis de NO ou H_2O_2, indicando que a eliminação dos parasitos não estaria se dando por esses mecanismos, mas sim por algum tipo de alteração no funcionamento mitocondrial, visto que o fármaco apresentou alteração significante do potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle e danos a mitocôndria e presença de vacúlos foram observados nas imagens de MET.

O uso de Tol para a eliminação de *Leishmania* até o momento é novo e não há casos reportados para este uso, porém se sabe que a inibição da SEO leva rapidamente à eliminação dos parasitos de *Leishmania* por acúmulo de 2,3-oxidoesqualeno. Outros compostos capazes de inibir a ação da enzima parecem ter efeitos leishmanicidas. Por

exemplo, em um estudo recente por (ARVELO et al., 2019) houve um acúmulo grande de 2,3-oxidoesqualeno. Possivelmente, os compostos estariam interrompendo a via metabólica normal de esteróis e possivelmente levando a diminuição da viabilidade parasitária. Há também o relato do uso de outros inibidores de SEO como a terbanifina (VANNIER-SANTOS et al., 1995) que levam à morte parasitária como a observado no presente estudo em parasitos tratados com Tol. De fato, os inibidores da SEO impedem a formação de lanosterol (ROBERTS et al., 2003), precursor importante para todos os ácidos graxos dessa via metabólica. Juntamente com os resultados aqui apresentados e bases anteriores similares nos leva a afirmar que o mecanismo de ação para os inibidores da SEO esteja de fato ligado ao acúmulo de precursores lipídicos e isso estaria afetando a viabilidade celular.

Sumarizando, os fármacos nistatina, tolnaftato e fenticonazol apresentam potencial para uso alternativo no tratamento para leishmaniose como fármaco de reposição, e apesar de sua citotoxicidade, seu índice de seletividade é maior que 10, além de apresentarem seletividade amastigotas das três espécies testadas. Os fármacos naftifina, rosuvastatina e voriconazol não apresentaram efeito leishmanicida. Além disso, o mecanismo de ação dos fármacos estudados em *Leishmania* está associado a alterações lipídicas, porém não se observou alterações na membrana celular do parasito. Porém, há indícios fortes de que o alvo celular destes fármacos esteja associado à uma perturbação do potencial de membrana mitocondrial em *Leishmania*.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O fármaco com maior atividade leishmanicida foi a nistatina, seguido pelo tolnaftato e fenticonazol, entretanto a anfotericina ainda se apresentou como o composto mais ativo. Porém, deve-se considerar que a anfotericina lipossomal mesmo sendo bastante efetiva e não tóxica, ainda tem restrições logísticas que a impedem de uma penetração maior em algumas regiões geográficas. No presente estudo foram apresentados fármacos com potencial leishmanicida e menor toxicidade comparados aos tratamentos convencionais da leishmaniose. Vale ressaltar que esses fármacos podem ainda estão disponíveis na forma tópica ou oral, formas ainda não amplamente disponíveis no mercado para como tratamento da leishmaniose. Sendo assim, há potencial terapêutico para o reposicionamento desses fármacos como alternativa à terapia convencional no tratamento das leishmanioses.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/12/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **511/15** intitulado**: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE FÁRMACOS QUE ATUAM NA ROTA BIOQUÍMICA DE ESTERÓIS"** apresentado pelo **Departamento de PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Luiz Felipe Domingues Passero
Pesquisador (a) Executante: Eduardo Seiji Yamamoto

CEP-FMUSP, 09 de Dezembro de 2015.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

7.2 ANEXO 2

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018, *18*, 2338-2346

RESEARCH ARTICLE

Activity of Fenticonazole, Tioconazole and Nystatin on New World *Leishmania* Species

Eduardo Seiji Yamamoto[1], Jéssica Adriana Jesus[1], Adriana Bezerra-Souza[2], Márcia Dalastra Laurenti[1], Susan Pereira Ribeiro[3] and Luiz Felipe Domingues Passero[2,4,*]

[1]*Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM50), Department of Pathology, Medical School of São Paulo University, Av. Dr. Arnaldo, 455. Cerqueira César, São Paulo, 01246-903, SP, Brazil;* [2]*São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, São Vicente, Praça Infante Dom Henrique, s/n, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil;* [3]*Pathology Department, Case Western Reserve University, 2103 Cornell Rd, Room 5503, Cleveland, OH 44106 USA;* [4]*São Paulo State University (UNESP), Institute for Advanced Studies of Ocean, São Vicente. Av. João Francisco Bensdorp, 1178, 11350-011 São Vicente, SP, Brazil*

ARTICLE HISTORY

Received: September 20, 2018
Revised: November 22, 2018
Accepted: December 14, 2018

DOI:
10.2174/1568026619666181220114627

Abstract: Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoal parasites belonging to *Leishmania* genus. Different clinical outcomes can be observed depending on the parasite species and health condition of patients. It can range from single cutaneous lesion until deadly visceral form. The treatment of all forms of leishmaniasis is based on pentavalent antimonials, and in some cases, the second-line drug, amphotericin B is used. Beside the toxicity of both drugs, parasites can be resistant to antimonial in some areas of the world. This makes fundamental the characterization of new drugs with leishmanicidal effect. Thus, the aim of the present work was to study the leishmanicidal activity of drugs able to interfere with ergosterol pathway (fenticonazole, tioconazole, nystatin, rosuvastatin and voriconazole) against promastigote and amastigote forms of *L.(L.) amazonensis, L.(V.) braziliensis* and *L.(L.) infantum,* and its impact on morphological and physiological changes in *L.(L.) amazonensis* or in host macrophages. We observed that fenticonazole, tioconazole and nystatin drugs eliminated promastigote and intracellular amastigotes, being fenticonazole and nystatin the most selective towards amastigote forms. Rosuvastatin and voriconazole did not present activity against amastigote forms of *Leishmania* sp. In addition, the drugs with leishmanicidal activity interfered with parasite mitochondrion. Although drugs did not stimulate NO and H_2O_2, specially fenticonazole was able to alkalize infected host macrophages. These results suggest well established and non-toxic antifungal drugs can be repurposed and used in leishmaniasis.

Keywords: New World Leishmaniasis, Drug repurposing, Anti-fungal drugs, Anti-hyperlipidemic drugs, Nystatin, Fenticonazole, Tioconazole.

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoal parasites of the *Leishmania* genus (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) [1] and transmitted by an insect vector from the Phlebotominae subfamily [2]. The clinical form depends on both the host-parasite interaction and infecting species [3].

Although different clinical forms exist raging from single cutaneous lesion until deadly visceral forms, the treatment is restricted to pentavalent antimonial as a first line drug; amphotericin B (AmB) can be used as the second line due to increasing reports of failure treatment with antimonial, or the existence of parasites resistance to antimonial, especially in Bihar, India [4-6]. Additionally, both drugs are highly toxic, with nephrotoxicity and cardiotoxicity associated with chemotherapy of AmB and antimonial, respectively [7]. Some alternative drugs have been used to overcome the side effects or ineffectiveness of the aforementioned drugs. Miltefosine has been used in some parts of the world, with varying results on the pathogen killing, but it has some degree of toxicity [8]. Paromomycin has also been used, but it was inefficient in treating post-kalazar dermal leishmaniasis in India and shows variable efficacy in parts of the world, additionally to the toxicity, limiting its use [9]. Altogether, the prevalence of the disease with drastic distinct outcomes, the inefficiency and toxicity of the currently available drugs, emphasizes the need for more effective and less toxic treatments.

*Address correspondence to this author at the São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, São Vicente, Praça Infante Dom Henrique, s/n, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil and São Paulo State University (UNESP), Institute for Advanced Studies of Ocean, São Vicente. Av. João Francisco Bensdorp, 1178, 11350-011 São Vicente, SP, Brazil;
E-mail: felipe.passero@unesp.br

1873-4294/18 $58.00+.00 © 2018 Bentham Science Publishers

Current Topics in Medicinal Chemistry

As potential target is the sterol biosynthetic pathway present in Trypanosomatidae family. Sterols are important components of cellular membranes, vital to cellular function and organelle structure [10]. Unlike mammalian cells that utilize cholesterol as their main membrane sterol, fungi and *Leishmania* synthesize ergosterol and other 24-methyl sterols as vital molecules to their growth [11]. Since these sterols are absent on mammalian cells, this pathway is an interesting specific target for new drugs development against leishmaniasis [12]. Currently available drugs able to inhibit enzymes from the sterol biosynthetic route used for other applications can be repurposed for leishmaniasis treatment [13]. Interestingly, the current drugs used in leishmaniasis were also repurposed. As an example amphotericin B was initially developed for invasive mycosis [7], miltefosine to treat cancer [14], and paromomycin to treat intestinal infections [15]. This is as an interesting strategy to find new treatments for leishmaniasis as well as to other diseases, since new compounds production may take up to 17 years from basics research to clinical tests [16], where only about 10% of them get approved by regulatory agencies, not to mention the high costs for its development, characterization, laboratory tests (PK-PD, *in vitro*, *in vivo*), GMP production and clinical trial [17].

In the present work, five drugs able to inhibit the sterols pathway enzymes were selected to study their leishmanicidal activity. Three azoles antifungals that inhibit conversion of lanosterol to zymosterol by inhibiting 14α-demethylase [18, 19], one statin that blocks the 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA reductase (HMG-R) [10, 20, 21], which is mainly used against human hypercholesterolemia [22] and nystatin, that is a polyene antimycotics similar to AmB, which interacts with the parasite membrane [23] and its used to treat severe systemic fungal infections [24] were used.

Previous works showed the efficacy of these drugs against different *Leishmania* species. Azoles efficacy has been studied, in this case, Kulkarni *et al.* 2013 showed that voriconazole eliminated *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) major* axenic promastigotes and amastigotes [25]. Macedo-Silva 2018 has tested the efficacy of ravuconazole, a second-generation triazole, against *Leishmania (L.) amazonensis* with promising results [26]. The statins were also evaluated as an alternative to treat *L. (L.) amazonensis* infected mice. Pravastatin was able to prolong the life of infected animals (Kucelhaus *et al.* 2011) [27], in addition, the leishmanicidal activity was related to higher phagocytic activity and nitric oxide production [28]. Finally, Tewary *et al.* demonstrated that nystatin is able to prevent the binding and entrance of *L. donovani* in J774 macrophages [29]. Additionally, nystatin presented the capacity of increasing TNF-α levels on mice blood serum [30]. This cytokine is an important immunological mediator able to activate macrophages to a leishmanicidal state [31].

Considering all these data about trypanosomatid sterol metabolism and the existence of inhibitors of this pathway, the present study aimed to analyze drugs already available on the market for potential alternatives to the treatment of different types of leishmaniasis.

2. METHODOLOGY

2.1. Drugs

The following azole drugs were used: voriconazole, tioconazole and fenticonazole. The following statin drug was used: rosuvastatin. The following polyene drug was used: nystatin. Amphotericin B was used as standard drug. All drugs were obtained from Sigma-Aldrich (Germany).

2.2. Parasites

Parasites were kindly provided by Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira from the cryobank of the "Leishmaniasis Laboratory Prof. Dr. Ralph Laison", Department of Parasitology, Ministry of Health, Evandro Chagas Institute (Belem, Para - Brazil). They were identified using monoclonal antibodies and isoenzyme electrophoretic profiles at the Leishmaniasis Laboratory of the Evandro Chagas Institute. Three species of *Leishmania* were used: *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269); *L. (L.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280); and *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/46). Parasites in late log stage were used for all experiments. Parasites were maintained in Schneider's Medium (Sigma-Aldrich, Germany), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 50,000 IU/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin.

2.3. Experimental Animals and Ethical Considerations

BALB/c mice, 6 weeks old, were obtained from the Medical School of the University of Sao Paulo, Brazil. This study was carried out in strict accordance with the recommendations detailed in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (http://www.cobea.org.br). The protocol was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the Institutional Committee of Animal Care and Use at the Medical School of Sao Paulo University (CEP 511/15). For all experimental procedures, the animals were anaesthetized with thiopental (1 mg/200 mL).

2.4. Promastigote Assay

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis, L. (L.) infantum and L. (V.) braziliensis* ($2x10^6$ promastigotes/well) were incubated in 96-well culture plate in RPMI 1640 medium with the drugs in a range of 0.01 to 400 μM. The standard drug AmB was added in culture in the range of 0.001 to 1.0 μM. The negative control group was cultivated in medium and vehicle solution (PBS plus 1% DMSO). The parasites were incubated for 24 and 48h at 25°C, washed with 200 μL of sodium chloride 0.9% (w/v) three times with centrifugation at 1200 g, 10 min at 4°C, followed by addition of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (9.6 μM). Four hours later, 50 μL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added to each well. The plates were further incubated for 18h and read in ELISA reader at 595 nm. Effective concentration 50% (EC_{50}) was estimated using Graph Pad Prism 5.0 software.

2.5. Cytotoxicity Assay

Approximately 10^6 peritoneal macrophages from BALB/c mice were cultured in RPMI 1640 medium with the drugs or standard drug, AmB (0.01 to 400 µM) in 96-well plates. As a negative control, macrophages were cultivated with vehicle solution. After 24h, cell viability was analyzed by the MTT method. Cytotoxic concentration 50% (CC_{50}) was estimated with Graph Pad Prism 5.0 software. The index of selectivity was obtained through the expression:

$$SI = \frac{CC_{50}}{EC_{50}}$$

2.6. Macrophage Infections and Treatments, Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Evaluation

Peritoneal macrophages from BALB/c mice (10^6 macrophages) were cultivated in round cover slips in 24-well plate, followed by infection with *L. (L.) amazonensis* or *L. (L.) infantum* promastigotes at a ratio of 10 parasites per 1 peritoneal macrophage. Plates were incubated at 5% CO_2 at 35°C for *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* or 37°C for *L. (L.) infantum*. After 24h or 48h of culture, drugs were added from 2.5 to 20 µM and amphotericin B as a positive control. After 24 and 48h, supernatants were collected and stored at -80°C for nitric oxide (Life Technologies, USA) and hydrogen peroxide (Life Technologies, USA) quantifications, according to manufacturer's instructions. Round cover slips from each experimental time- point were dried at room temperature, fixed in methanol, and stained by Giemsa. The Infection Index (II) was then estimated according to Passero *et al.* 2009 [32], following the expression:

$$II = \%\,Infected\ macrophages \times \frac{Internalized\ amastigotes}{Macrophages}$$

2.7. Ultrastructural Alterations induced by Drugs in *L. (L.) Amazonensis*

L. (L.) amazonensis was chosen as a prototype parasite. In this case, promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* ($2x10^6$ promastigotes/well) were incubated in 96-well culture plate in RPMI 1640 medium with the drugs EC_{50} for 24h, 25°C. Control group was cultivated with medium and vehicle solution. The plate was centrifuged at 1200 g, 4°C, 10 min and washed three times with 200 µL of sodium chloride 0.9%. Then the pellets were resuspended in glutaraldehyde 2% and incubated at 4°C, during 60 min. Parasites were post-fixed in 1% osmium tetroxide, and these materials were stained and block staining in 1% aqueous uranyl acetate overnight, dehydrated using alcohol. Then, samples were embedded in a polyester resin, thin sectioned with LKB ultratome, double stained by uranyl acetate and lead citrate (Ladd Research Industries), and examined with a Jeol 1010 (Tokyo, Japan) Transmission Electron Microscope (TEM).

2.8. Membrane Integrity Assay

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* ($2x10^6$ promastigotes/well) were incubated in 96-well culture plate in Schneider's medium with the EC_{50} of drugs. As a positive control, parasites were incubated with Triton X 100. Followed this step, the probe SYTOX Green (life technologies) was added to the well (5 µM) and readings at every 15 minutes were carried out during 60 minutes. The plate was read in fluorescence reader with an emission filter of 535 nm and excitation of 615 nm.

2.9. Mitochondrial Membrane Potential Assay

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* ($2x10^6$ promastigotes/well) were incubated in 96-well culture plate in Schneider's medium with the EC_{50} of the drugs. As a positive control, parasites were incubated with 5 mM of oligomycin A (Cayman Chemicals, USA). After 120 minutes of drug incubation, rhodamine 123 (5 µM) was added to the wells and the plate was read with fluorescence reader with an emission filter of 535 nm and excitation of 615nm.

2.10. Changes in Intracellular pH of Host Macrophages

Peritoneal macrophages were cultured in 96-well black microplate and infected with *L. (L.) amazonensis* according to instructions on item 2.6. Twenty-four hours later amastigotes EC_{50} of drugs were added to the wells and then incubated for 24h. Different controls were added: 1) Infected control; 2) Non-infected control; 3) Infected control plus 5 µM of NH_4Cl, a known macrophage alkalization agent [33], 4) Non-infected control plus 5 µM of NH_4Cl , 5) only NH4Cl as blank well. Plates were washed 3 times with PBS, and the probe pHrod Red (Life Technologies, USA) was added to the wells. For readout interpretation, the fluorescence increases as intracellular pH decreases to neutral to acidic, conversely, fluorescence drops as intracellular pH increases to alkaline.

3. RESULTS

3.1. Effect of Drugs on Promastigote Forms and in Host Cells

Fenticonazole showed an EC_{50} against *L. (L.) amazonensis* of 6.5 ± 0.8 µM at 24h of incubation. At 48h of incubation, its effect maximized, presenting an EC_{50} of 0.30 ± 0.03 µM. In respect to the cytotoxicity, fenticonazole presented moderated toxicity (~ 30 µM) at 24 and 48h. Thus, the Selective Index (SI) increased from 5.2 at 24h to 111.0-fold at 48h of incubation (Table **1**). Concerning nystatin, it was observed at 24h an EC_{50} of 2.1 ± 0.6 µM and of 2.7 ± 0.2 µM at 48h. Nystatin presented low cytotoxic drug amongst the drugs which had a leishmanicidal effect ($CC_{50} \geq$ 110.0 µM) for both periods. Nystatin has a SI of at least 52.4-fold at 24h, and at least 40.7-fold at 48h. Rosuvastatin did not present toxicity to the parasite on the highest concentration tested (210.0 µM) neither to macrophages, thus no SI was calculated. Tioconazole at 24h of incubation showed an EC_{50} of 6.3 ± 0.7 µM, and at 48h of incubation of 0.7 ± 0.1 µM. Tioconazole presented the highest cytotoxicity at 24h and 48h. The SI estimated at 24h was 2.5 while 15.8 at 48h. Voriconazole had no effect on promastigotes forms neither to peritoneal macrophages at 24h. At 48h, it was observed an EC_{50} of 7.4 ± 0.5 µM on promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, but no cytotoxicity has been observed using up to 286.2 µM at 48h. As for 48h, the drug presented an SI of at least 39.2. The standard drug, amphotericin B, was active at

Table 1. The table shows the effective concentration 50% (EC_{50}s) of drugs against different species of *Leishmania* promastigotes, cytotoxic concentration 50% (CC_{50}) for peritoneal macrophages and selectivity index (SI) of drugs during the incubation periods of 24 and 48h. All results are expressed in µM. SI_a - selectivity index at 24h; SI_b - selectivity index at 48h.

-	EC_{50} - *L. (L.) amazonensis*				EC_{50} - *L. (V.) braziliensis*				EC_{50} - *L. (L.) infantum*				CC_{50} - Macrophage	
-	24h	48h	SI_a	SI_b	24h	48h	SI_a	SI_b	24h	48h	SI_a	SI_b	24h	48h
Fen	6.5 ± 0.8	0.30± 0.03	5.2	111.0	7.9 ± 0.5	1.8 ± 0.2	4.3	18.5	5.4 ± 0.1	5.1±0.9	6.3	6.5	34.1 ± 1.5	33.3 ± 1.25
Nys	2.1 ± 0.6	2.7 ± 0.2	≥52.4	≥ 40.7	6.5 ± 0.3	3.7 ± 0.2	≥16.9	≥ 29.7	1.6 ± 0.7	3.7 ± 0.3	≥ 29.7	≥ 68.7	≥ 110.0	≥ 110.0
Ros	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NC	NC
Tio	6.3 ± 0.7	0.70 ± 0.05	2.5	15.8	6.4 ± 0.3	0.33 ± 0.02	2.5	33.6	7.6 ± 0.4	6.8 ± 0.8	2.1	1.6	16.1 ± 1.0	11.1 ± 1.0
Vor	NA	7.4 ± 0.5	-	≥39.2	164.9 ± 4.7	1.90 ± 0.01	≥1.7	≥152.6	NA	5.10 ± 0.06	-	≥56.9	≥ 290.0	≥ 290.0
AmB	1.9 ± 0.2	0.10 ± 0.01	32.6	642.0	1.0 ± 0.2	0.41 ± 0.04	62.0	156.6	0.28 ± 0.01	0.06 ± 0.01	221.4	1070.0	62.0 ± 10.1	64.2 ± 2.3

24h with an EC_{50} of 1.9 ± 0.2 µM and at 48h, the drug had its effects maximized (EC_{50} of 0.10 ± 0.01 µM). AmB showed a low cytotoxicity CC_{50} ~ 60 µM at 24 and 48h. The SI for AmB at 24h was 32.3 and at 48h was 642.0.

Concerning the leishmanicidal activity of drugs on *Leishmania (V.) braziliensis* it has been observed that fenticonazole at 24h eliminated promastigotes with an EC_{50} of 7.9 ± 0.5 µM. At 48h it was observed that parasites enhanced their sensibility to this drug, showing an EC_{50} of 1.8 ± 0.2 µM. The SI at was 4.3 and 18.5 at 48h. *L. (V.) braziliensis* incubated with nystatin at 24h showed an EC_{50} of 6.5 ± 0.3 µM and at 48h of 3.7 ± 0.2 µM. At 24h, the SI was at least 16.9 and for 48h presented a SI of approximately 29.0. Rosuvastatin did not present activity against *L. (V.) braziliensis* promastigote forms. Tioconazole presented an EC_{50} of 6.4 ± 0.3 µM against promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* at 24h of incubation and an EC_{50} of 0.33 ± 0.02 µM at 48h. Regarding the SI, at 24h tioconazole was 2.5-fold more selective to promastigotes and a higher incubation period of 48h made the selectivity increase to 33.6-fold. Voriconazole presented low activity at 24h against *L. (V.) braziliensis*, but at 48h the sensitivity of *L. (V.) braziliensis* was recorded with an EC_{50} of 1.9 ± 0.04 µM. At 24h the SI of voriconazole was up to 1.7 and at 48h of up to 156.6. The standard drug AmB presented an EC_{50} of 1.0 ± 0.2 µM at 24h and at 48h this effect was enhanced (EC_{50} of 0.4 ± 0.01 µM). These values showed that AmB is the most selective drug to promastigotes with an SI of 62 at 24h, and 156.6 at 48h.

At 24 and 48h fenticonazole was effective in *L. (L.) infantum* promastigotes (EC_{50} ~ 5 µM), resulting in an SI around 6 at 24 and 48h of incubation. At 24 and 48h, nystatin was the highest active drug against *L. (L.) infantum* (EC_{50} of 3.7 ± 0.7 and 1.6 ± 0.3, respectively). In these timepoints, nystatin was at least 26.7-fold more selective to promastigotes than to macrophages. Rosuvastatin was again not active against *L. (L.) infantum* promastigotes.

L. (L.) infantum promastigotes were more resistant to tioconazole in comparison with other species and presented the highest EC_{50} at 24 and 48h (7.6 ± 0.4; 6.8 ± 0.8 µM, respectively). The SI of tioconazole at 24 and 48h were 2.1 and 1.6, respectively. Voriconazole showed no effect against *L. (L.) infantum* promastigotes at 24h. At 48h, voriconazole was effective, showing an EC_{50} of 5.1 ± 0.1 µM, and SI of at least 56.9. Amphotericin B was the most effective drug compared with the other ones and at 24 and 48h, showing EC_{50} of 0.28 ± 0.01 and 0.06 ± 0.01 µM, respectively. At 24 and 48h, the SI of AmB was 221.4 and 1070.7, respectively.

3.2. Activity of Drugs in Intracellular Amastigotes

L. (L.) amazonensis infected peritoneal macrophages and treated with fenticonazole at 24 and 48h presented EC_{50} values of 3.6 ± 0.7 and 3.7 ± 0.6 µM (Table **2**). The SI to amastigotes at 24 and 48h was around 9. Infected macrophages treated with nystatin presented an EC_{50} of 2.1 ± 0.1 µM. A better efficacy has been observed at 48h (EC of 0.8 ± 0.2 µM). The SI was higher than 52.4 at 24h and 137.5 at 48h. *L. (L.)* amazonensis-infected macrophages treated with rosuvastatin did not present leishmanicidal effect. In infected macrophages, tioconazole showed at 24h an EC_{50} of 7.0 ± 0.7 µM and at 48h of incubation an EC_{50} of 4.4 ± 0.7 µM. The SI of 2.3 at 24h was observed and of 2.5 at 48h. In comparison with all drugs studied, tioconazole was the least selective. Voriconazole showed no activity against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*. The standard drug amphotericin B at 24 and 48h presented an estimated EC_{50} of 0.1 µM. This made amphotericin the most selective drug against amastigotes: 620.0 at 24h and 642.0 at 48h.

L. (V.) braziliensis infected peritoneal macrophages and treated with fenticonazole at 24 and 48h presented EC_{50} values of 1.6 ± 0.2 and 1.1 ± 0.1 µM, respectively (Table **2**). The SI to amastigotes at 24 and 48h was 21.3 and 30.3, respectively. Infected macrophages treated with nystatin presented an EC_{50} of 4.6 ± 0.4 µM while to 48h a better efficacy has been observed (EC_{50} of 2.6 ± 0.3 µM). The SI was higher than 23.9 at 24h and 42.3 at 48h. *L. (L.) braziliensis*-infected macrophages treated with rosuvastatin did not present leishmanicidal effect. In infected macrophages, tioconazole showed at 24h an EC_{50} of 6.4 ± 0.1 µM and at 48h of incubation, an EC_{50} of 4.0 ± 0.5 µM was observed. The SI of 2.5 at 24h and of 2.8 at 48h were observed. In comparison with all drugs studied tioconazole was the least selective. Voriconazole showed no activity against amastigote forms of *L. (L.) braziliensis*. The standard drug amphotericin B at 24

Table 2. The table shows the effective concentration 50% (EC_{50}s) of drugs against different species of *Leishmania* amastigotes and the selectivity index (SI) of drugs during the incubation periods of 24 and 48h. All results are expressed in µM. SI_a - selectivity index at 24h; SI_b - selectivity index at 48h.

-	EC_{50} - *L. (L.) amazonensis*				EC_{50} - *L. (V.) braziliensis*				EC_{50} - *L. (L.) infantum*			
-	24h	48h	SI_a	SI_b	24h	48h	SI_a	SI_b	24h	48h	SI_a	SI_b
Fen	3.6 ± 0.7	3.7 ± 0.6	9.4	9.0	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	21.3	30.3	3.9 ± 0.8	2.9 ± 0.3	8.7	11.4
Nys	2.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	≥ 52.4	≥ 137.5	4.6 ± 0.4	2.6 ± 0.3	≥ 23.9	≥ 42.3	4.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2	≥ 22.9	≥ 42.3
Ros	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
Tio	7.0 ± 0.7	4.4 ± 0.7	2.3	2.5	6.4 ± 0.1	4.0 ± 0.5	2.5	2.8	4.5 ± 0.3	4.0 ± 0.2	3.6	2.8
Vor	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-	NA	NA	-	-
AmB	0.10 ± 0.07	0.10 ± 0.01	620.4	642.0	0.09 ± 0.02	0.030 ± 0.001	688.9	2140.0	0.070 ± 0.001	0.020 ± 0.001	885.7	3210.0

and 48h presented estimated EC_{50} of 0.09 ± 0.02 and 0.030 ± 0,001 µM, respectively, being the most selective drug against amastigotes: 688.9 at 24h and 2140.0 at 48h.

L. (L.) infantum-infected macrophages and treated with fenticonazole showed an EC_{50} of 3.9 ± 0.8 µM with 24h of incubation, further incubation increased the drug's activity and 2.9 ± 0.3 µM EC_{50} was estimated (Table **2**). The SI of fenticonazole at 24h was 4.8 and at 48h was 11.4 (Table **2**). Nystatin showed an EC_{50} of 1.8 ± 0.2 µM on treated macrophages at 24h and 2.6 ± 0.2 µM at 48h of incubation. At 24h the SI of nystatin over amastigote was 22.9 and at 48h it was higher than 42.3. Rosuvastatin showed no activity to *L. (L.) infantum* amastigotes. Tioconazole presented an EC_{50} of 4.5 ± 0.3 µM at 24h, and 4.0 ± 0.2 µM at 48h against *L. (L.) infantum* amastigotes. The SI was 3.6 at 24h and 2.8 at 48h. Voriconazole had also no effect against Li amastigotes. The estimated EC_{50} for amphotericin B at 24h was 0.07 ± 0.001 µM and at 48h of 0.02 ± 0.001 µM. The SI at 24h was 885.7 and at 48h of 3210.0.

L. (L.) amazonensis was chosen as a model to study morphological changes by transmission electron microscopy. Untreated promastigotes incubated for 24h presented no morphological alterations (Fig. **1A**). Promastigotes treated with fenticonazole at 24h show signs of alteration in the morphology, such as loss of fusiform shape, but without cell membrane damages. The cytoplasm presented with numerous vacuoles (V) and organelle degradation. In this case, mitochondrion (M) had signs of internal disorganization, the membrane of kinetoplast (K) was lysed (black arrow) and the nucleus (N) has its chromatin condensed (Fig. **1B**). In the Fig. (**1C**). damage of internal membranes can be observed in details. In Fig. (**1D**). parasites incubated with nystatin are shown. In the cell membrane, no visible damage could be detected, but there are bleb-like formations on the external membrane. In the cytoplasm, vacuoles are visible and the nucleus present with condensed chromatin. In (Fig. **1E**) degradation of kDNA can be observed.

Parasites incubated with tioconazole are shown in the Fig. (**1F**). *L. (L.) amazonensis* promastigotes show similar external and cytoplasm alterations to the promastigotes of the fenticonazole treated group. The kDNA shows signs of complete membrane degradation, the mitochondrion presented similar alterations observed on fenticonazole group and the nuclear membrane seems to be degraded. In the Fig. (**1G**) mitochondria lesion can be observed in higher detail. The general aspect of promastigote forms treated with AmB is shown in Fig. (**1H**). No major changes have been observed in cell membranes, however, in the cytoplasm, there were detected vacuoles, with degraded membranes and myelinic-like formation.

3.3. Membrane Integrity and Alterations of Mitochondrial Membrane Potential

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* did not show major physiological alterations in cell membrane after incubation with assayed drugs (Fig. **2A**). In the other hand, it has been verified that parasites treated with fenticonazole (Fen), nystatin (Nys) and amphotericin B (AmB) EC_{50}s decreased the mitochondrial transmembrane potential, what in fact corroborates the morphological changes observed in transmission electron microscopy. Interestingly, the results for tioconazole (Tio) treated promastigotes indicate no major changes in mitochondrial transmembrane potential, as it had a high fluorescence level, even higher when compared to the negative control. This is the opposite to what is observed on TEM of tioconazole treated groups (Fig. **2B**).

3.4. Changes in the Intracellular pH and Production of NO and H_2O_2 in Treated Infected Macrophages

In order to study the response of host infected macrophages to drugs used herein, changes in the pH and the production of NO and H_2O_2 were investigated. Macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with the EC_{50} of fenticonazole presented a significant decrease in the fluorescence compared with infected control, indicating alkalization of cytoplasm (Fig. **3**). Nystatin, tioconazole and amphotericin B- treated macrophages did not present significant changes in pH compared with infected control. Both infected and non-infected macrophages treated with $NHCl_4$ showed elevation in the pH. Infected macrophages did not produce NO and H_2O_2 in response to all drugs analyzed in this study.

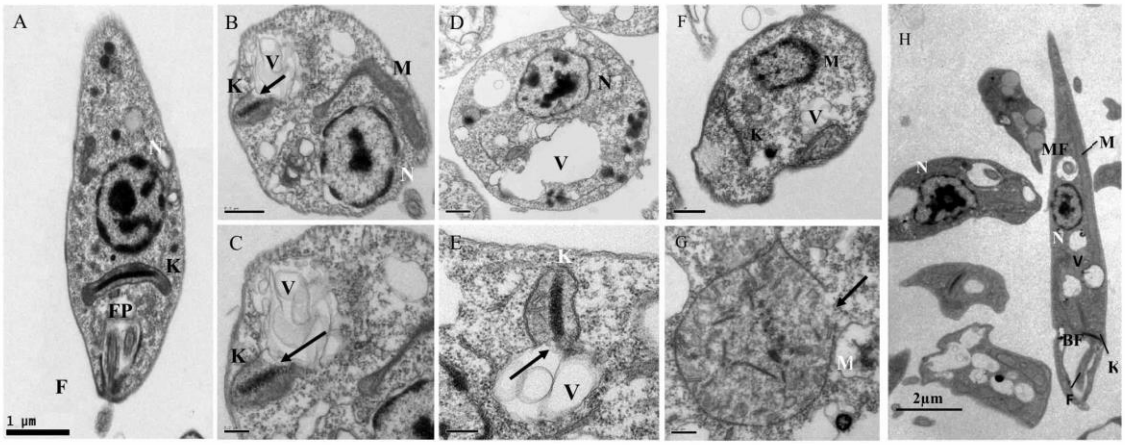

Fig. (1). TEM of *L. (L.) amazonensis* promastigotes incubated or not with drugs. **A** - Untreated promastigote. (x 25k). **B** - Promastigote forms incubated with fenticonazole for 24h (x 50k); **C** - Detail of promastigote on figure B (x 60k). **D** - Example of promastigotes incubated with nystatin for 6h (x 30k); **E** - A more detailed section of a nystatin-treated parasite (x 100k). **F** - General aspect of a promastigote treated for 6h with tioconazole (x 40k); **G** - Detailed section of a parasite treated with tioconazole (x 80k). **H** - General aspect of parasite incubated for 24h with AmB (x 10k). Legend: (**FP**) - Flagellar pocket; (**M**) - Mitochondrion; (**MF**) - Myelin-like formation (**N**) - Nucleus; (**K**) - Kinetoplast; (**V**) - Vacuole. (Black arrow) - Membrane rupture.

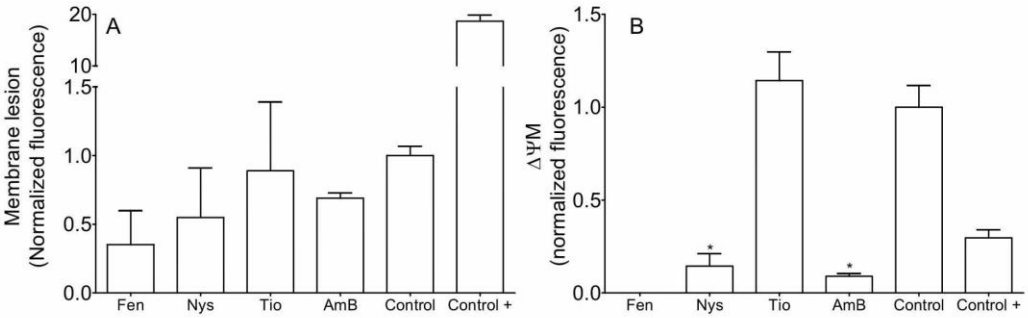

Fig. (2). Perturbation of parasite's cell membranes after incubation with fenticonazole (Fen), nystatin (Nys), tioconazole (Tio) and amphotericin B (AmB) was investigated using the probe SYTOX Green®, in this case, Triton X100 was used as an inductor of membrane lesion. In addition, changes in the mitochondrial transmembrane potential were investigated using the probe Rhodamine 123; Oligomycin (5 µM) was used as the positive control since it is able to inhibit mitochondria transmembrane potential. $p<0.05$ in comparison with control.

4. RESULT AND DISCUSSION

In the present study, the effects of drugs able to interfere with ergosterol synthesis were tested on promastigotes, macrophages and intracellular amastigotes, furthermore, their selective indexes toward parasites were analyzed. In addition, ultrastructural alterations, permeabilization of the cell membrane and changes on the mitochondrial membrane potential of *L. (L.) amazonensis* promastigotes were studied; host macrophages changes in intracellular pH and production of NO and H_2O_2 were also investigated. The findings of this study are of great importance due to the lack of pharmaceuticals that have no toxic effects to vertebrates [9], thus it is essential the characterization of new leishmanicidal drugs. In spite of the introduction of miltefosine as of a promising oral treatment, it fails in some clinical forms leishmaniasis in Americas [34, 35]. Studies with sterol pathway inhibitors in trypanosomatids present potential to develop new drugs or treatments in leishmaniasis. It basically happens because parasites of this family and fungi are dependent on the formation of ergosterol and other 24-alkyl sterols to constitute biological membranes [36, 37]. The sterol metabolic pathway is complex and involves the action of different enzymes, thus their inhibition may generate disturbance on the cellular membranes, inducing the death in *Leishmania* sp. [38]. Therefore, in the present study rosuvastatin, that is able to block the enzyme HMG-CoA responsible for the first step to ergosterol production [39, 40], triazole drugs (fenticonazole, tioconazole and voriconazole) that act on 14α-demetylase [41] and nystatin that acts directly on membrane sterol [42] were tested.

The triazoles fenticonazole and tioconazole were effective at eliminating promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* suggesting a multispectral action of these drugs on *Leishmania* genus. In the present work, it was verified that fenticona-

zole presented interesting results of selectivity to amastigote forms of *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*. By contrast, even with high activity against promastigote forms at 48h, tioconazole was the most cytotoxic compound to macrophages, that in turn compromised its selectivity towards intracellular amastigotes of *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis* by *L. (L.) infantum*. Previous works demonstrated that some azoles, such as itraconazole and ketoconazole presented effectivity against different leishmanial species *in vitro* [43], and some clinical evidence showed its effectivity in humans infected with dermatotropic parasites [44, 45]. In spite of the action of these well-known azoles in *Leishmania* sp., until now to the best of our knowledge there are no reports of fenticonazole effect in *Leishmania* or other related parasites. Differently of all azole drugs used herein, voriconazole presented activity only at 48h against promastigote forms, and this effect was specific since high selective indexes were obtained against all assayed species, however this drug failed to eliminate intracellular amastigote forms, possibly voriconazole was not able to gain the intracellular environment of infected macrophages, and thus eliminate amastigote forms, however it has been demonstrated the activity of this drugs at killing axenic amastigotes of *L. (L.) amazonensis* [25]. This suggests that the cellular membrane of host cells can represent an important obstacle for voriconazole gains the parasitophorous vacuoles and eliminates amastigote forms.

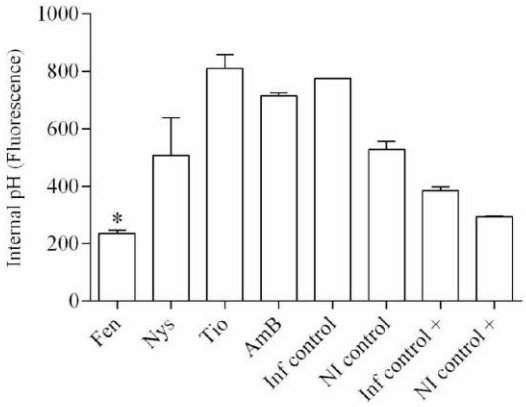

Fig. (3). Infected macrophages were treated with EC_{50} of fenticonazole (Fen); nystatin (Nys); tioconazole (Tio) and amphotericin B (AmB) for 24h; after this period changes in intracellular pH were investigated. $p<0.05$ in comparison with infected control.

The other drug tested was rosuvastatin, an antihyperlipidemic medicine able to inhibit the HMG-CoA reductase. In this case, it was observed no activity against promastigotes or amastigotes even with high incubation time (up to 72h, data not shown), suggesting that this particular statin was not able to inhibit *Leishmania* sp. HMG-CoA reductase enzyme. By the other side, other statins, such as simvastatin and atorvastatin were able to inhibit the growth of *L. donovani* promastigotes as well as the activity of HMG-CoA reductase [20]. Mevastatin, another antihyperlipidemic was able to inhibit both promastigote and amastigote forms of *L. donovani*. Possibly, rosuvastatin had low potential to inhibit *L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* parasites compared with others already studied.

In the present study, nystatin was tested against promastigote and amastigote forms of three important species of *Leishmania* sp. of New World, and in all cases, a high impact on the parasite was observed, since compromising of promastigotes viability and decreased the number of internalized amastigotes were verified. This is not exactly a novel discovery since it was previously tested, in *L. donovani* isolated from patients [46] or *L. major* [24] or on its promastigotes [29]. Additionally, the results generated on TEM reinforces that the mechanism of action of nystatin might be associated with sterol depletion, since morphological alterations are linked with lipid remodelling, such as myelinic formations and cytoplasmic vacuoles. Similar aspects using nystatin were also observed by Luque-Ortega *et. al.* 2003 [24] and seems to corroborate our results. Noteworthy, nystatin was the less toxic tested drugs presenting high values of SI on amastigotes forms of three neotropical agents of the disease.

Regarding studies aiming at analyzing possible cell targets of drugs in *L. (L.) amazonensis* promastigotes, we analyzed the morphological changes of parasites, followed by physiological alterations of plasmatic membrane and mitochondria. We also analyzed changes in the physiology of host macrophages, by measuring pH changes in treated infected macrophages as well as nitric oxide and hydrogen peroxide. In general, parasite ultrastructural alterations were associated with vesicular compartments, with or without myelin-like structure or rest of membranes. Furthermore, these vacuoles seem to be ruptured, mitochondrial fragmentation and lysis of kDNA membrane were also found. In spite of intracellular disorganization, no parasite cell membrane lysis was observed, and it was further confirmed using the probe SYTOX Green®, that is impermeable in intact cell membrane, but after disturbance it penetrates through cell membranes, binds to DNA, increasing fluorescence [47]. In our study, the increase in fluorescence has been verified only in the parasites treated with AmB and in positive control, suggesting that at 12h drugs are not capable to interfere with the cell membrane.

On the other hand, using transmission electron microscopy, it has been verified that mitochondria were completely altered in treated parasites. In this case, to verify the physiology of this organelle Rho -123 was used, since in active mitochondria Rho-123 is rapidly sequestered, and it can be detected by fluorescence. In this case, parasites treated with fenticonazole, nystatin and amphotericin B for 24h, the mitochondria transmembrane potential decreased in comparison with control, suggesting that these drugs are also able to interfere with this organelle. By the other side, tioconazole did not change the transmembrane potential of mitochondria, and although mitochondria seemed to be altered, this drug did not affect mitochondria transmembrane potential at 24h, possibly other mechanisms are related with mitochondrion morphological changes. The mitochondrion of *Leishmania* sp. is an interesting target for drugs, since this parasite has a single one and once altered possibly the viability of parasites will be impacted [48]. In addition, *L. (L.) amazonensis* incubated with azole drug (ketoconazole) or squalene epoxidase inhibitors (terbinafine and butenafine) had extended damages

on external membrane structure (bleb-like formation and loss of shape) and on mitochondrion structure (swelling and cristae destruction), besides cytoplasmic vacuolization, which occurred due to accumulation of lipid precursors. These results suggest that inhibitors of the sterol pathway in *Leishmania* sp are capable to destabilize the cytoplasmic organelles' membrane. The study by Luque-Ortega *et. al.* 2003 [24] also demonstrated the formation of vacuoles and destabilization of mitochondria in *L. donovani* promastigotes using nystatin, and our results seem to be also confirming these previous results. Therefore, the results presented on this study about ultrastructural alterations, the use rhodamine 123 and SYTOX Green® probes on parasites treated with sterol inhibitor drugs suggest that the main morphological and physiological changes are related with the intracellular environment, especially mitochondrion.

In addition, the response of infected host cells was also checked during 24h of incubation with the drugs analyzed. In this case, changes in cell host pH and production of NO and H_2O_2, metabolites were analyzed. One of the most selective drugs, fenticonazole, induced alkalization of intracellular pH. It is known that parasitic phagosomes containing *Leishmania* rapidly decrease the internal pH after phagocytosis [49], and amastigote forms are adapted to this condition since this parasitic form has ATPases dependent on acidic environment [50]. Thus, alkalization of host cells phagosomes can impact the viability of amastigotes, as observed in infected macrophages treated with tamoxifen [51]. In the present study, it has been verified that a direct effect of fenticonazole on promastigote forms, and the alkalization of infected macrophages treated with fenticonazole can be an additional mechanism associated with amastigote elimination.

CONCLUSION

Taken together, results presented herein show that fenticonazole, nystatin and tioconazole have leishmanicidal activity against both promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum*, the etiological agents of the most important clinical forms of leishmaniasis, such as anergic diffuse, mucosal and visceral leishmaniasis. In addition, nystatin was the most selective drug, followed by fenticonazole and tioconazole. By morphological and physiological studies, the parasite mitochondrion seems to be the main affected organelle. In addition, the effect of fenticonazole on intracellular amastigotes seems to be associated with alkalization of phagosomes. By the other side, voriconazole and rosuvastatin failed to eliminate promastigote and/or amastigote forms of *Leishmania* sp. Considering the paucity of drugs for leishmaniasis treatment, the present work shows that important antifungal drugs can be repurposed for usage in leishmaniasis increasing the bunch of available options to treat this neglected tropical disease.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The protocol was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the Institutional Committee of Animal Care and Use at the Medical School of Sao Paulo University (CEP 511/15).

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

This study was carried out in strict accordance with the recommendations detailed in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (http://www.cobea.org.br).

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the support (Grants 2015/17623-6 and 2016/00468-0) and HCFMUSP-LIM50. Authors also thank CNPq scientific research award to MDL.

REFERENCES

[1] Rêgo, F.D.; Rugani, J.M.N.; Shimabukuro, P.H.F.; Tonelli, G. B.; Quaresma, P.F.; Gontijo, C.M.F. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies(Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at xakriabá indigenous reserve, Brazil. *PLoS One,* **2015**, *10*(4), 1-14.

[2] Dostálová, A.; Volf, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors,* **2012**, *5*, 276.

[3] Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the Host-Pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.,* **2011**, *9*(8), 604-615.

[4] Kafetzis, D.A.; Velissariou, I.M.; Stabouli, S.; Mavrikou, M.; Delis, D.; Liapi, G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int. J. Antimicrob. Agents,* **2005**, *25*(1), 26-30.

[5] Mittal, M.K.; Rai, S.; Gupta, S.; Sundar, S.; Goyal, N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*(4), 681-688.

[6] Santos, D.O.; Coutinho, C.E.R.; Madeira, M.F.; Bottino, C.G.; Vieira, R.T.; Nascimento, S.B.; Bernardino, A.; Bourguignon, S.C.; Corte-Real, S.; Pinho, R.T.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C. Leishmaniasis Treatment--a challenge that remains: A review. *Parasitol. Res.,* **2008**, *103*(1), 1-10.

[7] Lemke, A.; Kiderlen, A.F.; Kayser, O. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **2005**, *68*(2), 151-162.

[8] 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.,* **2012**, *55*(4), 543-550.

[9] Sundar, S.; Singh, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. *Parasitology,* **2017**, *145*(4), 1-7.

[10] de Macedo-Silva, S.; Souza, W.; Rodrigues, J. Sterol biosynthesis pathway as an alternative for the anti-protozoan parasite chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22*(18), 2186-2198.

[11] Keighobadi, M.; Emami, S.; Lagzian, M.; Fakhar, M.; Rafiei, A.; Valadan, R. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: *In vitro* and *in silico* analysis of a laboratory strain. *Molecules,* **2018**, *23*(3), E696.

[12] Chawla, B.; Madhubala, R. Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.,* **2010**, *34*(1), 1-13.

[13] Shahreza, M.L.; Ghadiri, N.; Mousavi, S. R.; Varshosaz, J.; Green, J.R. A review of network-based approaches to drug repositioning. *Brief. Bioinform.,* **2017**, *2016*, 1-15.

[14] Hilgard, P.; Klenner, T.; Stekar, J.; Unger, C. Alkylphosphocholines: A new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.,* **1993**, *32*(2), 90-95.

[15] Petri, W.A. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol.,* **2003**, *19*(11), 523-526.

[16] Emmert-Streib, F.; Tripathi, S.; Simoes, R. de M.; Hawwa, A.F.; Dehmer, M. The human disease network. *Syst. Biomed.,* **2013**, *1*(1), 20-28.

[17] Weng, L.; Zhang, L.; Peng, Y.; Huang, R.S. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: A bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics,* **2013**, *14*(3), 315-324.

[18] Pereira, M.; Fachin, A.L.; Martinez-Rossi, N.M. The Gene that determines resistance to tioconazole and to acridine derivatives in *Aspergillus nidulans* may have a corresponding gene in *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia,* **1998**, *143*(2), 71-75.

[19] Mast, N.; Zheng, W.; Stout, C.D.; Pikuleva, I.A. Antifungal Azoles: structural insights into undesired tight binding to cholesterol-metabolizing CYP46A1. *Mol. Pharmacol.,* **2013**, *84*(1), 86-94.

[20] Dinesh, N.; Pallerla, D.S.R.; Kaur, P.K.; Kishore Babu, N.; Singh, S. Exploring *Leishmania donovani* 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase(HMGR) as a potential drug target by biochemical, biophysical and inhibition studies. *Microb. Pathog.,* **2014**, *66*, 14-23.

[21] Van De Pas, N.C.A.; Rullmann, J.A.C.; Woutersen, R.A.; Van Ommen, B.; Rietjens, I.M.C.M.; De Graaf, A.A. Predicting individual responses to pravastatin using a physiologically based kinetic model for plasma cholesterol concentrations. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.,* **2014**, *41*(4), 351-362.

[22] Vuorio, A.; Kuoppala, J.; Kovanen, P.T.; Humphries, S.E.; Strandberg, T.; Tonstad, S.; Gylling, H. Cochrane review: Statins for children with familial hypercholesterolemia. *Evidence-Based Child Heal. A Cochrane Rev. J.,* **2011**, *6*(4), 1086-1129.

[23] Brautaset, T.; Sletta, H.; Degnes, K.F.; Sekurova, O.N.; Bakke, I.; Volokhan, O.; Andreassen, T.; Ellingsen, T.E.; Zotchev, S.B. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated *via* biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. *Appl. Environ. Microbiol.,* **2011**, *77*(18), 6636-6643.

[24] Luque-Ortega, J.R.; Saugar, J.M.; Chiva, C.; Andreu, D.; Rivas, L. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.,* **2003**, *375*(Pt 1), 221-230.

[25] Kulkarni, M.M.; Reddy, N.; Gude, T.; McGwire, B.S. Voriconazole suppresses the growth of *Leishmania* species *in vitro*. *Parasitol. Res.,* **2013**, *112*(5), 2095-2099.

[26] Teixeira de Macedo Silva, S.; Visbal, G.; Lima Prado Godinho, J.; Urbina, J.A.; de Souza, W.; Cola Fernandes Rodrigues, J. *In Vitro* antileishmanial activity of ravuconazole, a triazole antifungal drug, as a potential treatment for leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.,* **2018**, *73*(9), 2360-2373.

[27] Kückelhaus, C.S.; Kückelhaus, S.A.S.; Muniz-Junqueira, M.I. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.,* **2011**, *127*(3), 658-664.

[28] Kückelhaus, C.S.; Kückelhaus, S.A.S.; Tosta, C.E.; Muniz-Junqueira, M.I. Pravastatin modulates macrophage functions of *Leishmania*(*L.) amazonensis*-Infected BALB/c Mice. *Exp. Parasitol.,* **2013**, *134*(1), 18-25.

[29] Tewary, P.; Veena, K.; Pucadyil, T.J.; Chattopadhyay, A.; Madhubala, R. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2006**, *339*(2), 661-666.

[30] Semis, R.; Nili, S.S.; Munitz, A.; Zaslavsky, Z.; Polacheck, I.; Segal, E. Pharmacokinetics, tissue distribution and immunomodulatory effect of intralipid formulation of nystatin in mice. *J. Antimicrob. Chemother.,* **2012**, *67*(7), 1716-1721.

[31] Bhattacharya, P.; Dey, R.; Dagur, P.K.; Kruhlak, M.; Ismail, N.; Debrabant, A.; Joshi, A.B.; Akue, A.; Kukuruga, M.; Takeda, K.; Selvapandiyan, A.; McCoy, J.P.; Nakhasi, H.L. Genetically modified live attenuated *Leishmania donovani* parasites induce innate immunity through classical activation of macrophages that direct the th1 response in mice. *Infect. Immun.,* **2015**, *83*(10), 3800-3815.

[32] Passero, L.F.; Sacomori, J.V.; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.; da Silveira, F.T.; Laurenti, M.D. *Ex vivo* and *in vivo* biological behavior of *Leishmania*(*Viannia) shawi*). *Parasitol. Res.,* **2009**, *105*(6), 1741-1747.

[33] Galloway, C.J.; Dean, G.E.; Marsh, M.; Rudnick, G.; Mellman, I. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **1983**, *80*(11), 3334-3338.

[34] Dorlo, T.P.C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J.H.; de vries, P.J. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.,* **2012**, *67*(11), 2576-2597.

[35] Ghorbani, M.; Farhoudi, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.,* **2018**, *12*, 25-40.

[36] Ghosh, J.; Das, S.; Guha, R.; Ghosh, D.; Naskar, K.; Das, A.; Roy, S. hyperlipidemia offers protection against *Leishmania donovani* infection: Role of membrane cholesterol. *J. Lipid Res.,* **2012**, *53*(12), 2560-2572.

[37] Semini, G.; Paape, D.; Paterou, A.; Schroeder, J.; Barrios-Llerena, M.; Aebischer, T. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *leishmania* parasites infection. *Microbiologyopen,* **2017**, *2016*, e00469.

[38] De Vita, D.; Moraca, F.; Zamperini, C.; Pandolfi, F.; Di Santo, R.; Matheeussen, A.; Maes, L.; Tortorella, S.; Scipione, L. In Vitro Screening of 2-(1H-Imidazol-1-Yl)-1-Phenylethanol derivatives as antiprotozoal agents and docking Studies on *Trypanosoma cruzi* CYP51. *Eur. J. Med. Chem.,* **2016**, *113*, 28-33.

[39] Dinesh, N.; Soumya, N.; Singh, S. Antileishmanial effect of mevastatin is due to interference with sterol metabolism. *Parasitol. Res.,* **2015**, *114*(10), 3873-3883.

[40] Hu, M.; Lee, H.K.; To, K.K. W.; Fok, B. S.P.; Wo, S.K.; Ho, C.S.; Wong, C.K.; Zuo, Z.; Chan, T.Y.; Chan, J.C. Tomlinson, B. Telmisartan increases systemic exposure to rosuvastatin after single and multiple doses, and *in vitro* studies show telmisartan inhibits ABCG2-mediated transport of rosuvastatin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.,* **2016**, *72*(12), 1471-1478.

[41] Haegler, P.; Joerin, L.; Krähenbühl, S.; Bouitbir, J. Hepatocellular toxicity of imidazole and triazole antimycotic agents. *Toxicol. Sci.,* **2017**, 1-13.

[42] Szwarc, K.; Płosiński, M.; Czerniejewska, K.; Laskowski, T.; Leniak, A.; Czub, J.; Kubica, P.; Sowiński, P.; Pawlak, J.; Borowski, E. Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin a1 into its isomer, iso-nystatin A1 - structural and molecular modeling studies. *Magn. Reson. Chem.,* **2016**, *54*(12), 953-961.

[43] Hart, D.T.; Lauwers, W.J.; Willemsens, G.; Vanden Bossche, H.; Opperdoes, F.R. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. *Mol. Biochem. Parasitol.,* **1989**, *33*(2), 123-134.

[44] Dogra, J.; Aneja, N.; Lal, B.B.; Mishra, S.N. Cutaneous leishmaniasis in india. clinical experience with itraconazole(R51 211 Janssen). *Int. J. Dermatol.,* **1990**, *29*(9), 661-662.

[45] Dogra, J.; Saxena, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: A randomised double-blind trial in cutaneous disease. *Int. J. Parasitol.,* **1996**, *26*(12), 1413-1415.

[46] Ghosh, B.K.; Haldar, D.; Ray, J.C.; Chatterjee, A.N. Leishmanicidal property of nystatin and its clinical application. *Ann. Biochem. Exp. Med.,* **1961**, *21*, 25-28.

[47] Luque-Ortega, J.R.; Rivas, L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides; Giuliani, A., Rinaldi, A.C., Eds.; Methods in molecular biology; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**, Vol. *618,* pp 393-420.

[48] Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.,* **1999**, *26*(3-4), 463-471.

[49] Sturgill-Koszycki, S.; Schlesinger, P.H.; Chakraborty, P.; Haddix, P.L.; Collins, H. L.; Fok, A.K.; Allen, R.D.; Gluck, S.L.; Heuser, J.; Russell, D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular Proton-ATPase. *Science,* **1994**, *263*(5147), 678-681.

[50] Jiang, S.; Winget, G.D.; Mukkada, A.J. Plasma membrane K+/H+-ATPase from. *J. Cell. Physiol.,* **1994**, *159*, 60-66.

[51] Miguel, D.C.; Yokoyama-Yasunaka, J.K.U.; Andreoli, W.K.; Mortara, R.A.; Uliana, S.R.B. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania*(*Leishmania) amazonensis* Amastigotes. *J. Antimicrob. Chemother.,* **2007**, *60*(3), 526-534.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONIA, R. et al. Design of two alternative routes for the synthesis of naftifine and analogues as potential antifungal agents. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1–22, 2018.

AL-MOHAMMED, H. I.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3274–3280, 2005.

ALRAJHI, A. A. et al. Fluconazole for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major*. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 12, p. 891–895, 21 mar. 2002.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ANDERSEN, E. M. et al. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 133–7, fev. 2005.

ANTONIOU, M. et al. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 18, n. 30, p. 20540, 2013.

ARANA, B. A. et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 466–470, 2001.

ARMIJOS, R. X. et al. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 91, n. 2, p. 153–160, 2004.

ARNOLDI, A. et al. Synthesis and Antifungal Activity of a Series of N - Substituted [2-(2,4-Dichlorophenyl)-3-(1,2,4-triazol-1-yl)]propylamines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8187–8192, out. 2007.

ARVELO, F. et al. Anti-leishmanial effect of spiro dihydroquinoline-oxindoles on volume regulation decrease and sterol biosynthesis of *Leishmania braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 198, n. January, p. 31–38, 2019.

BAGINSKI, M. et al. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 655–658, 2005.

BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. **Curr Drug Metab**, v. 10, n. 5, p. 459–469, 2009.

BARRETT-BEE, K. J.; LANE, A. C.; TURNER, R. W. The mode of antifungal action of tolnaftate. **Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. 155–160, jan. 1986.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Promastigotes and Axenic Amastigotes. **Biochemistry Journal**, v. 315 (Pt 2, p. 631–4, 1996.

BEAUMIER, C. M. et al. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144–155, 2013.

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V. In vitro antileishmanial activity of inhibitors of steroid biosynthesis and combinations of antileishmanial agents. **The Journal of parasitology**, v. 73, n. 3, p. 671–3, jun. 1987.

BEZERRA-SOUZA, A. et al. The antifungal compound butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology International**, v. 65, n. 6, p. 702–707, 2016.

BHATTACHARYA, P. et al. Genetically Modified Live Attenuated Leishmania donovani Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3800–3815, out. 2015.

BLOCH, K. Cholesterol: evolution of structure and function. In: **New Comprehensive Biochemistry**. [s.l: s.n.]. p. 363–381.

BRAJTBURG, J. et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of

action. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 2, p. 183–188, 1990.

BRAUTASET, T. et al. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6636–6643, 2011.

BRAZUNA, J. C. M. et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande , State of Mato Grosso do Sul , Brazil , from 2002 to 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 601–606, 2012.

BURDEN, R. S.; COOKE, D. T.; CARTER, G. A. Inhibitors of sterol biosynthesis and growth in plants and fungi. **Phytochemistry**, v. 28, n. 7, p. 1791–1804, 1989.

CAFFREY, P. et al. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 8, p. 639–53, 2008.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, n. 1–2, p. 7–12, 2011.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. Role of Membrane Cholesterol in Leishmanial Infection. In: [s.l: s.n.]. p. 201–213.

CHEN, C. Z. et al. High-throughput Giardia lamblia viability assay using bioluminescent ATP content measurements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 667–675, 2011.

CHEN, Y. et al. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART8, p. 1175–1183, 2013.

CHONG, C. R.; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 645–646, 9 ago. 2007.

COCKELL, S. J. et al. An integrated dataset for in silico drug discovery. **Journal of integrative bioinformatics**, v. 7, n. 3, p. 1–13, 2010.

COELHO, A. C. et al. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in

pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3030–3032, 2007.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267–274, 2011.

COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 426–437, 2015.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

DALY, K. et al. Intermediate cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* successfully treated with fluconazole. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 39, n. 6, p. 708–712, 2014.

DANTAS-TORRES, F.; LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: Do not forget the law of priority. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117–118, 2006.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DE ASSIS SOUZA, M. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 27–32, 2013.

DE CARVALHO, R. F. et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 217–222, 2013.

DE VITA, D. et al. In vitro screening of 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-phenylethanol derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on *Trypanosoma cruzi* CYP51. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 28–33, 2016.

DINESH, N.; SOUMYA, N.; SINGH, S. Antileishmanial effect of mevastatin is due to interference with sterol metabolism. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p. 3873–3883, 2015.

DOGRA, J. et al. Cutaneous leishmaniasis in India. Clinical experience with itraconazole (R51 211 Janssen). **International journal of dermatology**, v. 29, n. 9, p. 661–2, nov. 1990.

DOGRA, J.; SAXENA, V. N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1413–5, dez. 1996.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DUDLEY, J. T.; DESHPANDE, T.; BUTTE, A. J. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 303–311, 2011.

EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14α-demethylase for antileishmanial therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 241–259, 2017.

EMMERT-STREIB, F. et al. The human disease network. **Systems Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 20–28, 22 jan. 2013.

ESPADA, C. R. et al. Susceptibility to Miltefosine in Brazilian Clinical Isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 16-0811, 2017.

FAGHIHI, G.; TAVAKOLI-KIA, R. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 13–16, 2003.

GALIULLINA, L. F. et al. Interaction of statins with phospholipid bilayers studied by solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 3, p. 584–593, 2019.

GANGNEUX, J. P. et al. Lipid formulations of amphotericin b in the treatment of experimental visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 574–7, 1996.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

GHOSH, B. K. et al. Leishmanicidal property of nystatin and its clinical application. **Annals of biochemistry and experimental medicine**, v. 21, p. 25–8, jan. 1961.

GHOSH, J. et al. Hyperlipidemia offers protection against *Leishmania donovani* infection: role of membrane cholesterol. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 12, p. 2560–72, 2012.

GOLDSTEIN, I. et al. Oral Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1397–1404, 14 maio 1998.

GOMEZ URCUYO, F.; ZAIAS, N. Oral Ketoconazole in the Treatment of Leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 21, n. 7, p. 414–416, set. 1982.

GRAUL, A. I.; CRUCES, E. The year's new drugs & biologics, 2010. **Drugs of Today**, v. 47, n. 1, p. 27, 2011.

GUERIN, P. J. et al. Personal view Visceral leishmaniasis Visceral leishmaniasis : current status of control , diagnosis , and treatment , and a proposed research and development agenda Personal view. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, 2002.

HAEGLER, P. et al. Hepatocellular Toxicity of Imidazole and Triazole Antimycotic Agents. **Toxicological Sciences**, p. 1–13, 2017.

HART, D. T. et al. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 33, n. 2, p. 123–34, 1 mar. 1989.

HARTMANN, M. Plant sterols and the membrane environment. v. 3, n. 5, 1998.

HAUBRICH, B. A. et al. Discovery of an ergosterol-signaling factor that regulates *Trypanosoma brucei* growth. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 2, p. 331–341, 2015.

HENDRICKX, S. et al. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–10, 2017.

HU, M. et al. Telmisartan increases systemic exposure to rosuvastatin after single and multiple doses, and in vitro studies show telmisartan inhibits ABCG2-mediated transport of rosuvastatin. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1471–1478, 2016.

IWATANI, W.; ARIKA, T.; YAMAGUCHI, H. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 785–8, abr. 1993.

JEFFREYS, L. N. et al. Novel insights into P450 BM3 interactions with FDA-approved antifungal azole drugs. **Scientific Reports**, n. August 2018, p. 1–12, 2019.

JIANG, S.; WINGET, G. D.; MUKKADA, A. J. Plasma Membrane K+/H+-ATPase From. **Journal of Cellular Physiology**, v. 159, p. 60–66, 1994.

KAFETZIS, D. A. et al. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: Amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 26–30, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEIGHOBADI, M. et al. Repurposing azole antifungals into antileishmanials: Novel 3-triazolylflavanones with promising in vitro antileishmanial activity against *Leishmania major*. **Parasitology International**, v. 69, n. December 2018, p. 103–109, 2019.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KÜCKELHAUS, C. S. et al. Pravastatin modulates macrophage functions of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 18–25, maio 2013.

KÜCKELHAUS, C. S.; KÜCKELHAUS, S. A. S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis.* **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 658–664, 2011.

KULKARNI, M. M. et al. Voriconazole suppresses the growth of *Leishmania*

species in vitro. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2095–2099, 2013.

LAMP-FREUND, M. T.; FERREIRA, V. F. N.; SCHREIER, S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 38, n. 6, p. 753–757, 1985.

LARA-SILVA, F. DE O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 2015.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 2005.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, p. 1–17, 2018.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060–2071, 2011.

LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. Pentalinon andrieuxii Root Extract is Effective in the Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania mexicana*. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 909–916, jun. 2014.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. **The Biochemical journal**, v. 375, n. Pt 1, p. 221–230, 2003.

MAST, N. et al. Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1. **Molecular pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 86–94, jul. 2013.

MAURÍCIO IL, STOTHARD JR, M. M. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MCCALL, L. I.; MCKERROW, J. H. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 342–349, 2014.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 526–534, 2007.

MONDOLFI, A. E. P. et al. Tropical medicine rounds Intermediate / borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 52, p. 446–455, 2013.

MORRISON, B. et al. Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B: Clinical dermatology • Concise report. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 4, p. 116–119, 2010.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. **Experimental parasitology**, v. 59, n. 2, p. 151–60, abr. 1985.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani.* **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 1–10, 2006.

MUKHERJEE, A. K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565–572, 2012.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, out. 2005.

OSTYN, B. et al. Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

PAPPAS, P. G. Antifungal Clinical Trials and Guidelines: What We Know and Do Not Know. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 11, p. a019745–a019745, 1 nov. 2014.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; SANTOS-GOMES, G. Modelos Roedores Utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1a Edição ed. Salvador, BA: [s.n.]. p. 75–90.

PEREIRA-CARVALHO, R. et al. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

PEREIRA, M.; FACHIN, A. L.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. The gene that determines resistance to tioconazole and to acridine derivatives in *Aspergillus nidulans*

may have a corresponding gene in *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 143, n. 2, p. 71–75, 1998.

PHAM, T. T. H.; LOISEAU, P. M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 539–552, 2013.

PIRES, M. Q. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: Evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 243–246, 2014.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

RAMOS, B. et al. Case Report Good response to pentamidine isethionate in a case of Mucosal Leishmaniasis caused by that was difficult to treat : Case Report. n. August 2018, p. 0–3, 2019.

READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, n. MAY 2014, p. 147, maio 2014.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

RICHTER, J. et al. Mucosal *Leishmania infantum* infection. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 959–962, 2011.

ROBERTS, C. W. et al. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 129–142, 2003.

ROJAS, R. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p. 1375–83, 2006.

ROUTT, E. What is new in Fungal Pharmacotherapeutics? **Plast Surg Nurs**, v. 30, n. 4, p. 202–207, 2010.

SALAIZA-SUAZO, N. et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 12, p. 801–811, 1999.

SALMANPOUR, F HANDJANI, M K NOUHPIS, R. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 12, n. 3, p. 159–162, 12 jan. 2001.

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

SAÚDE, O. M. DE. **Leishmaniasis 2016**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 29 mar. 2017.

SEMINI, G. et al. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. **MicrobiologyOpen**, n. October 2016, p. e00469, 2017.

SEMIS, R. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and immunomodulatory effect of intralipid formulation of nystatin in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1716–1721, 1 jul. 2012.

SERHAN, G. et al. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 13, n. 1, p. 18, 2014.

SHAHREZA, M. L. et al. A review of network-based approaches to drug repositioning. **Briefings In Bioinformatics**, n. November 2016, p. 1–15, 2017.

SHARLOW, E. R. et al. Auranofin is an apoptosis-simulating agent with in vitro and in vivo anti-leishmanial activity. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 663–672, 2014.

SHEN, M. et al. Identification of Therapeutic Candidates for Chronic Lymphocytic Leukemia from a Library of Approved Drugs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525–534, ago. 2005.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto**

Oswaldo Cruz, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.

SRIVASTAVA, P. et al. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3088–91, ago. 2011.

SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.

SUN, W. et al. Rapid Identification of Antifungal Compounds against Exserohilum rostratum Using High Throughput Drug Repurposing Screens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

SUNDAR, S. et al. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, out. 2000.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481–489, 2018.

SZWARC, K. et al. Intramolecular transformation of an antifungal antibiotic nystatin A1 into its isomer, iso-nystatin A1 - structural and molecular modeling studies. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 953–961, 2016.

TANG, B. et al. Study on the supramolecular multirecognition mechanism of β-naphthol/β-cyclodextrin/anionic surfactant in a tolnaftate hydrolysis system. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 17, p. 8877–8884, 2006.

TESSAROLLO, N. G. et al. Functional analysis of iron superoxide dismutase-A in wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. **Parasitology International**, v. 64, n. 2, p. 125–129, 2015.

TEWARY, P. et al. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. **Biochemical and Biophysical**

Research Communications, v. 339, n. 2, p. 661–666, 2006.

THOR, K. B.; KATOFIASC, M. A. Effects of duloxetine, a combined serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on central neural control of lower urinary tract function in the chloralose-anesthetized female cat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 1014–24, 1995.

TOBINICK, E. L. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. **Drug News & Perspectives**, v. 22, n. 1, p. 53, 2009.

TORRES, D. C. et al. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 727–733, 2010.

UZONNA, J. E.; BRETSCHER, P. A. Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 11, p. 3175–3184, 2001.

VAN DE PAS, N. C. A. et al. Predicting individual responses to pravastatin using a physiologically based kinetic model for plasma cholesterol concentrations. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 41, n. 4, p. 351–362, 2014.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDINA, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–294, 2015.

VANNIER-SANTOS, M. A. et al. Alterations Induced by the Antifungal Compounds Ketoconazole and Terbinafine in *Leishmania*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 337–346, jul. 1995.

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Current drug targets**, v. 10, n. 3, p. 246–60, mar. 2009.

VIEIRA, É. L. M. et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 2, p. 65–72, 2013.

VUORIO, A. et al. Cochrane Review: Statins for children with familial hypercholesterolemia. **Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal**, v. 6, n. 4, p. 1086–1129, jul. 2011.

WENG, L. et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 3, p. 315–324, fev. 2013.

WU, Z.; WANG, Y.; CHEN, L. Network-based drug repositioning. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 6, p. 1268, 2013.

XU, W. et al. Sterol Biosynthesis Is Required for Heat Resistance but Not Extracellular Survival in *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.

YAMAMOTO, E. S. et al. The effect of ursolic acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is related to programed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2015.

YE, H.; LIU, Q.; WEI, J. Construction of Drug Network Based on Side Effects and Its Application for Drug Repositioning. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87864, 4 fev. 2014.

ZERBINI, L. F. et al. Computational repositioning and preclinical validation of pentamidine for renal cell cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, p. 1929–41, 2014.