SIMONE CAROLINA SOARES PETRI

Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sintéticos sobre formas promastigotas e amastigotas intracelular de *Leishmania (Leishmania) infantum*

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

São Paulo

2015

SIMONE CAROLINA SOARES PETRI

Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sintéticos sobre formas promastigotas e amastigotas intracelular de *Leishmania (Leishmania) infantum*

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Petri, Simone Carolina Soares

Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sintético sobre formas promastigotas e amastigotas intracelular de *Leishmania (Leishmania) infantum* / Simone Carolina Soares Petri. -- São Paulo, 2015.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Compostos heterocíclicos 2.*Leishmania Leishmania infantum*
3.Doenças negligenciadas 4.Citotoxicidade imunológica 5.Apoptose 6.Anexina A5
7.Óxido nítrico

“Bendito és Tu, Senhor Deus de Israel, nosso pai, de eternidade em eternidade. Tua é, Senhor, a magnificência, e o poder, e a honra, e a vitória, e a majestade; porque Teu é tudo quanto há nos céus e na terra; Teu é, Senhor, o reino, e Tu te exaltaste por chefe sobre todos.

E riquezas e glória vêm de diante de Ti, e Tu dominas sobre tudo, e na Tua mão há força e poder; e na Tua mão está o engrandecer e o dar força a tudo.

Agora, pois, ó Deus nosso, graças Te damos, e louvamos o nome da Tua glória.

¹Porque quem sou eu (..)?Porque tudo vem de ti, e do que é teu to damos”
(I Crônicas 29:10 a 14)

Agradeço a Deus por tão grande amor, e por ter me sustentado e guiado durante todo o processo. Senhor, tudo vem de Ti!

Agradeço em especial aos meus pais, que me sustentaram, me consolaram, ajudaram, deram força e amparo quando mais precisei. Edson e Odete, vocês são chaves essenciais na minha vida! Obrigada por tão grande amor e por sempre estarem comigo em qualquer situação.

Ao amor da minha vida Bruno Henrique, meu melhor amigo e companheiro, que sempre esteve ao meu lado, e trouxe uma linda história de amor e risos à minha vida.

Aos meus irmãos Vanessa, Eduardo e Rebeca, que sempre me incentivaram e torceram por mim. Vocês são essenciais a minha vida.

Ao anjo da minha vida, meu irmão Fabrício. Vejo em você o cuidado de Deus por nós. Te amo de todo o meu coração.

Aos meus sobrinhos lindos e amados, Stéphanie, Isabelle, André e Gabriel. A tia ama vocês.

Meu avô Miguel, minha tia Odila e meu tio Onésimo. Obrigada por serem meus “pais” aqui em São Paulo. Morar com vocês foi maravilhoso, uma experiência que estará todos os dias na minha memória.

Tio Osias, Ana Maria e Sidney, estar com vocês foi uma aventura. Me diverti muito! Obrigada por me suportarem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao profº Dr. José Angelo Lauletta lindoso por me suportar durante todo o processo, e muitas vezes me tratar como filha e não como uma aluna. Obrigada pelas lições valiosas.

Agradeço à Dra. Sandra Regina Castro Soares. Não tenho palavras para descrever a pessoa maravilhosa que você é, e quão importante você foi em minha caminhada. Sem você, nada deste trabalho estaria completo ou realizado. Te considero como minha co-orientadora. Muito obrigada por tudo.

Agradeço a Dra. Hiro Goto por tão gentilmente ter cedido o laboratório para que eu pudesse realizar meus estudos.

A minha amiga Fanny Palace-Berl, que com seu jeito carinhoso e tímido me ensinou muito e me ajudou nos primeiros passos. Você é uma pessoa a quem admiro muito.

Às minhas amigas inseparáveis Ive, Amanda Lima e Amanda Torres. Foi muito bom conhecer e estar com vocês. Aprendi muito com nossa amizade.

A minha grande amiga Débora, que se tornou uma parceira inseparável nos experimentos, nas conversas, nos cafezinhos. Sei que a nossa amizade vai muito além do laboratório. Aprendi muito com você.

Ao laboratório de Soroepidemiologia, Beatriz, Bete, Cris, Luiza, Eduardo, Dra. Carmen, Dra Guita., Ariane. Obrigada por todo apoio.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de anexos

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos epidemiológicos das leishmanioses.....	3
1.2 Ciclo biológico e transmissão.....	5
1.3 Tratamento da leishmaniose.....	9
1.3.1 Tratamento à base de antimoniais.....	9
1.3.2 Tratamento com a Anfotericina B.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Alvos moleculares potenciais.....	16
2.2 Método de planejamento de fármaco.....	16
2.3 Nitrocompostos.....	17
2.4 Parâmetros que expressam a atividade biológica.....	19
2.5 Escolha dos grupos substituintes.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	22
3.2 Específico.....	22
4. METODOLOGIA.....	23
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Atividade anti- <i>Leishmania</i>	33
5.1.1 Avaliação da marcação de externalização da fosfatilserina na membrana do parasito por citometria de fluxo.....	36
5.2 Avaliação da citotoxicidade em células THP-1 sem infecção.....	39
5.3 Avaliação da citotoxicidade em células THP-1 infectadas com formas promastigotas de <i>L. L. Infantum</i>	41
5.3.1 Avaliação da produção de óxido nítrico.....	44
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
9. ANEXOS.....	65

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AmB	Anfotericina B
BSF	Derivados 5-nitro-2-furfurilideno-azometínicos
CDMSO	Controle de DMSO
CE₅₀	Concentração efetiva 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DL₅₀	Dose letal em 50% dos indivíduos
DMSO PA	Princípio ativo de sulfóxido de dimetil
DO	Densidade ótica
DP	Desvio Padrão
ED₅₀	Dose terapêutica em 50% dos indivíduos
GSH	Glutathione
iNOS	óxido nítrico induzível
<i>L. L. Infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
LPDC	Leishmaniose Pós Dérmica Calazar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral ou Calazar
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-brometo de difeniltetrazólio
NO	<i>nitric oxide</i> (óxido nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PMA	Phorbol 12-myristate 13 acetate
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i>
QT	Intervalo do eletrocardiograma que compreende as fases de despolarização e repolarização dos ventrículos
SBF	Soro bovino fetal
SbIII	Tártaro emético (antimonial trivalente)
SbV	Glucanato de antimônio (V) sódico (antimonial pentavalente)

SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFM	Sistema fagocítico monuclear
SOD	Superóxido dismutase
ST	Parte do segmento QT, que vai dar o fim da despolarização ao início da repolarização
THA	Tripanossomíase africana
THP-1	Human acute monocytic leukemia cells
TryR	tripanotiona redutase
T[SH]²	Tripanotiona
TS₂	produto da ação da tripanotiona redutase sobre seu substrato T(SH) ₂

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP.....	65
----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Novas Entidades Químicas (ENC) aprovou, entre 1975 e 1999, por classe de droga e em relação à carga da doença e venda de drogas (Trouiller P, Oliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N., 2002).....	2
Figura 2	Estratificação por municípios dos casos de Leishmaniose Visceral ou Calazar no Brasil, no período de 2006 a 2008 (Fonte: SVS/MS, 2010).....	4
Figura 3	Ilustração do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> no inseto vetor (adaptado de KAMHAWI, 2006).....	6
Figura 4	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	7
Figura 5	Estrutura química de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica, com os respectivos nomes químicos e comerciais (RATH, TRIVELIN, <i>et. al.</i> 2003).....	10
Figura 6	Estrutura química de antimonais pentavalentes empregados na clínica médica (RATH, TRIVELIN, <i>et. al.</i> 2003).....	10
Figura 7	Estrutura química dos antimoniais trivalentes empregados em clínica médica. (a) Tártaro de antimônio e potássio ou Tártaro emético; (b) antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®); (c) tioglicolato de sódio e antimônio (CORBETT, 1973).....	12
Figura 8	Fórmula estrutural da anfotericina B.....	13
Figura 9	Estrutura química da nifuroxazida e de análogos antileishmanicidas potenciais.....	18
Figura 10	Rotas de biorredução anaeróbica e aeróbica de nitrocompostos aromáticos e os intermediários, formados em reações subsequentes, ativos frente ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e a bactérias. Adaptado de Viodé <i>et. al.</i> , 1999 e Edwards, 1993.....	18
Figura 11	Diagrama de intercorrelação δ VS π em substituição <i>para</i> -aromática do ácido benzóico. Adaptado de Craig, 1971.....	20
Figura 12	Representação em dot plot da evolução da externalização de fosfatidilserina das formas promastigotas de <i>L. L. infantum</i> incubadas por 48 horas com os compostos. As células foram marcadas com FITC-anexina V e iodeto de propídeo e analisadas pelo citômetro BD LRSFortessa (Beckton Dickson®). Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (Tree Star®, Inc.) e foram analisados 10.000 eventos por composto e para cada concentração.....	37
Figura 13	Efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos. Os macrófagos foram incubados na presença e ausência de lipopolissacarídeos (LPS) e na presença dos compostos (eixo Y: concentração em mM de nitrito).....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre formas promastigotas de <i>L. L. infantum</i> . A anfotericina B foi utilizada como padrão.....	35
Gráfico 2	Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre células THP-1 diferenciadas em macrófagos. A anfotericina B foi utilizada como padrão.....	40
Gráfico 3	Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre células THP-1 diferenciadas em macrófagos infectados. A anfotericina B foi utilizada como padrão.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação com as densidades óticas dos compostos da série BSF, nas diferentes concentrações, na avaliação de viabilidade da atividade anti- <i>Leishmania</i> nas formas promastigotas de <i>L. L. infantum</i>	33
Tabela 2	Determinação do EC ₅₀ dos compostos da série BSF na avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> em promastigotas de <i>L.L. infantum</i>	34
Tabela 3	Porcentagem de sobrevida das formas promastigotas de <i>L. L. infantum</i> submetidos aos compostos da série BSF no intervalo de concentração de 400µM a 0,04µM, pelo método MTT.....	36
Tabela 4	Percentagem de células marcadas com iodeto de propideo e anexina V com fluoresceína, tratadas com diferentes concentrações de anfotericina b e compostos da série BSF derivados nitro-heterocíclico. Foram analisados 10.000 eventos por amostra, em citometria de fluxo.....	38
Tabela 5	Porcentagem de sobrevida de células THP-1 incubadas por 48 horas nos compostos da série BSF no intervalo de concentração de 400µM a 0,04µM, e avaliadas pelo método MTT.....	39
Tabela 6	Avaliação de viabilidade celular de células THP-1 incubadas nos compostos da série BSF.....	40
Tabela 7	Porcentagem de sobrevida de células THP-1 diferenciadas em macrófagos incubados por 48 horas com os compostos da série BSF e com a anfotericina B no intervalo de concentração de 400µM a 0,04µM, e avaliados pelo método MTT.....	41
Tabela 8	Avaliação da citotoxicidade nas células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectados com promastigotas de <i>L. L. Infantum</i> incubadas por 48 horas nos compostos da série BSF e com a anfotericina B.....	42
Tabela 9	Porcentagem de sobrevida de macrófagos infectados incubados por 48 horas com os compostos da série BSF e com a anfotericina B nas concentrações de 400µM a 1,56µM, e avaliados pelo método MTT.....	43
Tabela 10	Porcentagem de macrófagos infectados e não infectados após o período de 48 horas de tratamento em macrófagos previamente infectados.....	44
Tabela 11	Relação de parasito por célula submetidas a tratamento com os compostos da série BSF e anfotericina B. A contagem de lâminas foi realizada por microscopia ótica, onde foram lidas noventa e cinco células por lâmina.....	44

RESUMO

Petri SCS. *Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sobre formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) infantum e sobre células THP-1 infectadas*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV), pertence ao grupo de endemias consideradas prioritárias no mundo. É uma doença grave e com poucas opções de tratamento e, mesmo quando adequadamente tratada, possui um nível de letalidade de 5 a 7%. Apesar da expansão da doença, o tratamento para leishmaniose visceral não obteve avanços. O tratamento da leishmaniose possui apenas dois grupos de medicamentos utilizados: os antimonoiais e os não-antimoniais. Os compostos nitroheterocíclicos foram utilizados pois acredita-se que a eficácia desta classe de compostos está na habilidade desses compostos inibirem a tripanotona redutase. Os compostos foram obtidos por via sintética e refinados pelo método QSAR por remodelagem molecular. Foram obtidos séries de compostos nitroheterocíclicos, onde a série BSF (derivados 5-nitro-2-furfurilideno – azometínicos) foi utilizada para avaliar a bioatividade *in vitro* destes compostos frente à *Leishmania*. Para avaliação da atividade anti-*Leishmania* foram usadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os métodos utilizados para determinar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos da série BSF foram os métodos colorimétrico 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 brometo de difeniltetrazólio (MTT), apoptose por Anexina V e reação de Griess (dosagem de NO). Ao comparar os resultados com os respectivos controles positivos e com a Anfotericina B, foi observado que a atividade anti-*Leishmania* em formas promastigotas de *L. L. infantum* dos compostos foi menos significativa quando comparado com anfotericina B. Porém, ao comparar os resultados de macrófagos infectados e citotoxicidade com a anfotericina B, os compostos mostraram resultados expressivos, ao apresentarem baixa taxa de citotoxicidade e significativa diminuição da proliferação intracelular. A expressiva produção de nitrito pelos macrófagos

infectados tratados com os compostos da série BSF sugere-se que estes compostos possuam uma ação indireta de potencialização de produção de NO nas células hospedeiras. Os resultados *in vitro* utilizando derivados nitroheterocíclicos mostraram atividade destes sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares, e são compostos em potencial para avaliação de efeito *in vivo* contra leishmaniose visceral.

Descritores: Compostos heterocíclicos; *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*; doenças negligenciadas; citotoxicidade imunológica; apoptose; anexina A5; óxido nítrico.

SUMMARY

SCS Petri. Effects of nitro-heterocyclic derivatives on *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and on THP-1 infected cells. [Dissertation]. São Paulo: Medicine College, University of São Paulo; 2015.

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) belongs to the group of endemics prioritized worldwide. It is a serious disease with few treatment options, and even when adequately treated, it has a lethality level of 5 to 7%. Despite the expansion of the disease, treatment for visceral leishmaniasis has not made progress. Treatment of leishmaniasis has used only two groups of drugs: antimonial and non-antimonial. Nitro-heterocyclic compounds were used in this study because it is believed that the effectiveness of this class of compounds is the ability to inhibit trypanothione reductase. The compounds were obtained synthetically and refined by QSAR method molecular remodeling. Nitro-heterocyclic series of compounds were obtained, where the BSF series (derived from 5-nitro-2-furfurylidene - azometínicos) was used to evaluate the *in vitro* bioactivity of these compounds against the *Leishmania*. To evaluate the anti-*Leishmania* activity, promastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum* were used. The methods used to determine the anti-*Leishmania* activity of the BSF series compounds were colorimetric methods 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), apoptosis by Annexin V, and Griess reaction (IN dosage). By comparing the results with the respective positive controls and with amphotericin B, it was observed that the anti-*Leishmania* activity of *L. L. infantum* promastigotes of the compounds was less significant when compared with amphotericin B. However, comparing the results of infected macrophages and cytotoxicity with amphotericin B, compounds showed significant results, presenting low cytotoxicity rate and significant decrease in intracellular proliferation. The significant nitrite production by infected macrophages treated with the BSF series compounds suggested that these compounds have an indirect potentiation action in the NO production in the host cells. *In vitro* results using nitro-heterocyclic derivatives showed their activity on these

promastigotes and intracellular amastigotes, and presented them as potential compounds for *in vivo* effect evaluation against visceral leishmaniasis.

Key words: nitroheterocyclic compounds; *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*; neglected diseases; immune cytotoxicity; apoptosis; Annexin A5; nitric oxide.

1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais, como a malária, a doença de Chagas, a doença do sono (tripanossomíase humana africana, THA), as leishmanioses, a filariose linfática, a dengue e a esquistossomose são conhecidas como doenças negligenciadas, as quais afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos grandes progressos registrados na medicina, desde o conhecimento básico até o conhecimento das doenças infecciosas - bem como o avanço do desenvolvimento e descoberta de drogas - doenças como Chagas, esquistossomose, malária e leishmaniose continuam a causar morbidade e mortalidade elevadas. A carga de doenças infecciosas têm sido agravada pelo ressurgimento de doenças como a tuberculose, dengue e a tripanossomíase africana. E estas doenças afetam, principalmente, as populações pobres e menos desenvolvidas no mundo. A OMS identificou três fatores-chave que podem contribuir coletivamente para a carga de doença associada com doenças infecciosas: falta de uso de ferramentas existentes efetivas, ferramentas inadequadas ou inexistentes e conhecimento insuficiente da doença. (WHO, 1996; Trouiller *et al*, 2002; Pedrique *et al*, 2013). Apesar de uma necessidade cada vez maior de medicamentos seguros, eficazes e com preços acessíveis para o tratamento das doenças infecciosas, o desenvolvimento de medicamentos para essas doenças não é de interesse farmacêutico-econômico (Trouiller *et al*, 2002). Do total de novos fármacos produzidos no mundo no período de 1975 a 1999, somente 17 drogas foram desenvolvidas para doença tropicais (figura 1).

Therapeutic areas	Approved NCEs 1975–99*	Disability-adjusted life-years (DALYs)†				Proportion of worldwide sales, 1999‡	NCEs by DALY	Drug sales (millions of US\$) by DALY
		Number (×10 ⁶)	World-wide (%)	High-income countries (%)	Low- and middle-income countries (%)			
Central nervous system	211 (15.1%)	159.46	11.5	23.5	10.5	15.1%	1.32	193
Cardiovascular	179 (12.8%)	143.02	10.3	18.0	9.7	19.8%	1.25	283
Cytostatics (neoplasms)	111 (8.0%)	84.87	6.1	15.8	5.2	3.7%	1.31	90
Respiratory (non-infectious)	89 (6.4%)	61.60	4.5	7.4	4.2	9.3%	1.44	307
Anti-infectives and antiparasitics§	224 (16.1%)	409.08	29.6	4.2	31.8	10.3%	0.55	52
HIV/AIDS¶	26 (1.9%)	70.93	5.1	0.9	5.5	1.5%	0.37	44
Tuberculosis	3 (0.2%)	28.19	2.0	0.1	2.2	0.2%	0.11	11
Tropical diseases (total)**	13 (0.9%)	130.35	9.4	0.3	10.2	0.2%	0.10	3
Malaria	4 (0.3%)	39.27	2.8	0.0	3.1	0.1%	0.10	5
Other therapeutic categories	579 (41.6%)	524.54	37.94	31.08	38.59	41.9%	1.10	163
Total	1393 (100%)	1382.56	100	100	100	100%	1.01	148

*Sources: IMS Health drug monitor 1999 (<http://www.imshealth.com>); EMEA and FDA data; reference 5. †Data from WHO World Health Report, 1999. ‡Total pharmaceutical sales for 1999 was US\$204 700 million (IMS health). Includes private pharmacy sales for all drug classes except anti-infectives and parasitics, which also include public pharmacy sales. §Includes antibiotics, antituberculosis drugs, antivirals, vaccines, and immunoglobulins. ¶Including 20 AIDS antiviral drugs and six drugs for opportunistic infections; atovaquone is also quoted under malaria. ||Pyrazinamide, rifabutin, rifampentine. **Benznidazole, nifurtimox (Chagas' disease); albendazole (helminthic infection); efloinitine (human African trypanosomiasis); artemether, atovaquone+proguanil, halofantrine, mefloquine (malaria); ivermectin (onchocerciasis); oxamniquine, praziquantel (schistosomiasis) and two reformulations of already approved drugs: liposomal amphotericin B (leishmaniasis) and pentamidine (African trypanosomiasis). After 1999, two new drugs were registered for malaria: artemether and artemether/lumefantrine.

Figura 1: Novas Entidades Químicas (ENC) aprovou, entre 1975 e 1999, por classe de droga e em relação à carga da doença e venda de drogas (Trouiller *et al*, 2002).

Uma análise das tendências de desenvolvimento de drogas publicado em 2002 mostrou que somente 1% de todos os medicamentos aprovados ao longo de 25 anos (1975-1999) foram para doenças negligenciadas, mesmo essas doenças sendo responsáveis por 12% do problema de saúde global (figura 1). A falta de investigação adequada, investimento e desenvolvimento têm sido atribuída à ausência de retorno financeiro para pesquisas farmacêuticas e biotecnologia, além de uma falha em estabelecer políticas públicas de saúde eficientes (Pedrique *et al.*, 2013).

As doenças negligenciadas afetam mais de 1 milhão de pessoas, representando uma necessidade médica importante que permanece não atendida (DNDi, 2012). As leishmanioses fazem parte do grande grupo de doenças negligenciadas por não despertarem o interesse das indústrias farmacêuticas, uma vez que são doenças principalmente relacionadas com a pobreza e cujo mercado consumidor é potencialmente de baixa renda (ABC, 2010). A leishmaniose é considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, atingindo 98 países, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas, 350 milhões vivendo em áreas de risco e 2 milhões casos novos relatados por ano (WHO, 2010).

1.1 Aspectos epidemiológicos das leishmanioses

Estima-se que ocorram anualmente de 200 a 400 mil novos casos de leishmaniose visceral de 700 mil a 1,2 milhões de leishmaniose tegumentar. Apenas três países concentram 90% dos casos de leishmaniose mucosa, enquanto que 10 países concentram 75% dos casos de leishmaniose cutânea. O Brasil está entre os países de maior incidência das formas cutânea e mucocutânea. Em relação a leishmaniose visceral, 90% dos casos de leishmaniose visceral se concentram principalmente na Índia, Bangladesh, Etiópia, Quênia, Sudão e Brasil (Alvar *et al.* 2012).

No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão considerado o principal reservatório urbano. É uma doença grave com poucas opções terapêuticas e que, mesmo quando adequadamente tratada, tem letalidade de cerca de 5 a 7%. De 1980 a 2008, foram notificados mais de 70 mil casos de LV no

país, com mais de 3.800 óbitos. O número médio de casos registrados anualmente cresceu de 1.601 (1985-1989), para 3.630 (2000-2004) (Alvar *et al.*, 2012).

Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da região Nordeste, mas em 2007, esta cifra chegou a 50% dos casos. Entre os anos de 2006 e 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 Unidades Federadas. No entanto, a leishmaniose visceral está presente com alta taxa de mortalidade. Dados recentes do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde indicam a ocorrência de 5 mil casos de leishmaniose visceral por ano (Desjeux, 2004; MS/Brasil, 2006-2007; Alvar *et al.*, 2012).

Devido à mudança do comportamento epidemiológico da LV no Brasil ao longo dos anos, a LV tornou-se uma doença urbana, acometendo também pacientes com AIDS à semelhança do que se observa na região do Mediterrâneo. No Estado de São Paulo, a LV reapareceu de forma autóctone a partir de 1999 com aumento crescente no número de casos e no aumento de municípios com transmissão de LV humana (SES, 2010). Pobreza, migração, ocupação urbana não planejada, destruição ambiental, condições precárias de saneamento e habitação e desnutrição são alguns dos determinantes que contribuem para o aumento de sua ocorrência (Werneck, 2010) (figura 2).

Figura 2: Estratificação por municípios dos casos de Leishmaniose Visceral ou Calazar no Brasil, no período de 2006 a 2008 (Fonte: SVS/MS, 2010).

O gênero *Leishmania* possui em torno de 30 espécies já nomeadas (Bates, 2007), e cerca de 20 espécies e subespécies infectam os humanos, causando diferentes manifestações clínicas (Cupolillo *et al.*, 2000; TDR Strategics, 2002). O gênero *Leishmania* apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas Américas Central e do Sul, bem como em partes da Europa, África e Ásia (Alvar *et al.*, 2012). Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida e podem ser subdivididos em dois subgêneros, o *Vianna* e o *Leishmania*. Esta subdivisão do gênero está relacionada principalmente ao desenvolvimento das formas promastigotas no inseto vetor. São 21 espécies descritas no mundo atualmente, e destas, 12 espécies são reconhecidas nas Américas. No Brasil, até o presente momento, foram identificadas oito espécies, sendo seis do subgênero *Vianna* e duas do gênero *Leishmania*. As três principais espécies no Brasil causadoras de doença tegumentar ou visceral são *Leishmania (Vianna) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (Shaw, 2006).

1.2 Ciclo Biológico e Transmissão

As leishmanias apresentam-se em duas formas durante o ciclo biológico nos organismos hospedeiros: as formas amastigotas e promastigotas. A infecção do homem e de outros hospedeiros vertebrados ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica o mamífero, inoculando a promastigota metacíclica (infectiva) durante o repasto sanguíneo (Turco e Descoteaux, 1992). Hoje se sabe que a simples picada libera uma série de fatores que induzem rápida inflamação na região afetada por neutrófilos e recrutamento de macrófagos (Peters *et al.*, 2008). As promastigotas metacíclicas (apresentam flagelo quando se encontram no trato digestório do flebotomíneo - hospedeiro invertebrado) são regurgitadas e penetram na pele do hospedeiro, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas como, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos. Inicialmente, a forma metacíclica é fagocitada pelos neutrófilos e macrófagos e no interior do vacúolo parasitóforo começa a se diferenciar em amastigota (Ashford, 1998; Stuart *et al.*, 2008). Após a diferenciação, a forma amastigota adere à membrana interna do vacúolo. Dentro dos macrófagos multiplica-se por divisão binária até ocupar grande parte do citoplasma. Em seguida, a membrana do macrófago se rompe liberando as amastigotas que poderão invadir novos

macrófagos ou serem sugados por uma nova fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.

Figura 3: Ilustração do ciclo de vida da *Leishmania* no inseto vetor (adaptado de KAMHAWI, 2006).

Gossage, Rogers e Bates (2003) e Bates (2007) sequenciaram o desenvolvimento das promastigotas, classificando-as em cinco formas: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonades, promastigotas leptomonades, promastigotas haptomonades e promastigotas metacíclicas. A forma promastigota metacíclica é o estágio infectante para os mamíferos. Em meio de cultura, as promastigotas na fase estacionária são mais infectivas ao se comparar com as promastigotas em fase logarítmica de crescimento. Isso ocorre provavelmente por causa da mudança de antígenos na superfície (Sacks, 1985) (figura 3).

No intestino do vetor, durante seu desenvolvimento, as diferentes espécies de *Leishmania* sofrem transformações morfológicas. A infecção do inseto vetor ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebotomíneo, que é hematófaga, pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas e outras células, especialmente macrófagos, contendo formas amastigotas. No trato digestório do vetor, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos e os parasitos são liberados. Na região anterior do trato digestório, ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Com o rompimento da matriz peritrófica, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se multiplicam e aderem pelo flagelo. Após a divisão, migram para a região anterior do intestino até a válvula estomodeal, onde se concentram e sofrem um processo de diferenciação, denominado

metaciclologênese (Sacks e Perkins, 1984). Durante a metaciclologênese, os promastigotas apresentam redução no tamanho do corpo celular tronam-se etremamente móveis e altamente infectivos e passam a ser denominados promastigotas metacíclicos. Ao danificar a válvula estomodeal, as formas metacíclicas migram para a prosbócide e são regurgitados e transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo (figura 4).

Figura 4: Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro. 1) Infecção do inseto (mosquito-palha) ocorre durante repasto sanguíneo (Fonte: Atlas Didático: Ciclo de vida da *Leishmania*, CECIERJ, 2013).

Ao se estudar o gênero *Leishmania*, observa-se que algumas espécies são responsáveis pela maioria dos casos em humanos, e nota-se que uma das suas principais características é a diversidade e complexibilidade das manifestações clínicas. Todo curso da infecção e suas manifestações clínicas são dependentes de complexas interações específicas: interações entre as respostas imunológicas (que é mediada por

células do hospedeiro) e a virulência (uma característica das diferentes espécies do gênero) (Deane & Grimaldi, 1985; Grimaldi & Tesh, 1993; Ashford e Bates, 1998).

A leishmaniose representa um conjunto de enfermidades diferentes entre si, que podem comprometer pele, mucosas e vísceras dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. Fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro são responsáveis pelo controle ou evolução da infecção, sendo que a resposta celular do hospedeiro está intrinsecamente relacionada com o favorecimento ou controle da doença (Goto e Lindoso, 2004). Diversos fatores relacionados ao hospedeiro humano, principalmente aqueles relacionados à resposta imune celular parecem contribuir para o controle ou desenvolvimento da doença. Sabidamente, residentes de áreas de transmissão de LV que apresentam uma resposta celular efetora são capazes de controlar a infecção e não desenvolver manifestações clínicas, com um perfil de resposta Th1, com produção de IL2 e IFN-gama (Kumar e Nylén, 2012). Por outro lado, pacientes que evoluem com doença plenamente e com sinais de gravidade apresentam resposta imune celular deficiente, e com expressão aumentada da resposta humoral, que parece ser um fator de favorecimento do desenvolvimento da doença, com um perfil de resposta celular Th2, com produção preponderante de IL4 e IL-10 (Nylén e Sacks, 2007). As citocinas são importantes moduladoras da expressão da iNOS. De uma maneira geral, citocinas do perfil Th1 induzem a iNOS (Drapier *et al.*, 1988), enquanto as do padrão Th2 inibem a sua indução (Cunha *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1992). *In vivo*, várias evidências correlacionam a produção de NO com o controle da infecção (Wei *et al.*, 1995; Stenger *et al.*, 1996). Entre os fatores de virulência intrínsecos ao parasito, está sua capacidade de escapar ao estresse oxidativo no interior de macrófagos ativados. Em leishmânias, ambos os sistemas antioxidantes; glutathione e tripanotiona/tripantion redutase estão envolvidos na proteção contra os efeitos tóxicos do óxido nítrico (Romão *et al.*, 2007).

Os tripanossomatídeos como a *Leishmania* mantêm o balanço de óxido-redução (*redox*) por um mecanismo singular, pois são desprovidos de glutathione redutase que, na maioria dos outros organismos, é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular redutor/protetor dependente de GSH. Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona (T[SH]₂; duas moléculas de GSH ligadas por uma unidade de espermidina) como principal tiól reduzido (Fairlamb & Cerami,

1992), a qual é responsável pela defesa contra oxidantes e metais pesados (Mukhopadhyay *et al.*, 1996) e xenobióticos (Fairlamb & Cerami, 1992). A tripanotiona é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TryR), de modo que a TryR exerce um papel central na proteção de *Leishmania* contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (produzidos pelo hospedeiro) por meio da reciclagem de tripanotiona oxidada (Dumas *et al.*, 1997; Romão *et al.*, 2006). Na leishmaniose visceral, os parasitos acometem o sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, causando a esplenomegalia, no fígado causando a hepatomegalia, tecidos linfóides e medula óssea. As características clínicas são caracterizadas principalmente por febre intermitente, perda de peso e hepatoesplenomegalia, podendo evoluir com sinais e sintomas de gravidade, tais como hemorragias e edemas, com evolução desfavorável para óbito se não tratada adequadamente (Badaró *et al.*, 1986, Manual do MS 2004).

1.3 Tratamento da leishmaniose

No Brasil as únicas drogas disponíveis para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil Glucamina) e a anfotericina B nas formulações deoxicolato e lipossomal.

1.3.1 Antimoniais

O uso de compostos a base de antimônios para diversos fins terapêuticos é descrito desde a Antiguidade. Porém, somente em 1912 Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético, antimonial trivalente, era eficaz na terapia da leishmaniose tegumentar americana. Ao longo dos anos, com o uso do tártaro emético, efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais (tais como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotóxicos) (figura 5) foram observados, sendo este substituído por compostos estibiados pentavalentes (Rath, Trivelin, *et al.* 2003) (figura 6).

Fórmula estrutural	Nome químico/ Nome comercial
$\left\{ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CO} - \\ \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\ \\ \text{HCO} - \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right\} \text{K}$	Tartarato de antimônio e potássio ¹⁶ Tártaro emético
Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico ¹⁶ Stibophen, Repodral, Fuadina
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{S} \\ \quad \diagdown \\ \text{O} = \text{C} - \text{O} \quad \text{Sb} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COONa} \end{array}$	Tioglicolato de sódio e antimônio ¹⁶

Figura 5: Estrutura química de antimoniais trivalentes empregados na clínica médica, com os respectivos nomes químicos e comerciais (RATH, TRIVELIN, *et. al.* 2003).

Fórmula estrutural proposta	Nome químico Nome comercial
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-$	Antimoniato de N-metilglucamina ¹⁴ Glucantime®; Antimoniato de meglumina
$\left\{ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{HCO} - \\ \\ \text{HCO} - \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \right\} \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Gluconato de antimônio (V) sódico ^{14, 17} ou Estibogluconato de sódio Pentostam® Solustibosan®
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2 \end{array}$	Uréia estibamina ¹⁶ Estibamine®

Figura 6: Estrutura química de antimonais pentavalentes empregados na clínica médica (RATH, TRIVELIN, *et. al.* 2003).

Foi proposto que o SbV se comportaria como uma pró-droga, sendo reduzido por tióis a SbIII no organismo hospedeiro. Segundo essa hipótese, SbIII seria a forma ativa e tóxica do antimônio. A biomolécula glutathiona, que contém o grupo sulfidril e é o tiol predominante no meio intracelular, seria um forte candidato a redutor de SbV a Sb III (Frézard *et al*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que nos meios biológicos SbIII interagiria com os grupos sulfidrilas de certas proteínas, resultando na perda de sua função. Por outro lado, foi também demonstrado que SbV forma complexos com ribonucleosídeos, e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais (Demicheli *et al.*, 2002).

O composto é obtido sinteticamente a partir de SbV e N-metil-Dglucamina, mas não possui fórmula estrutural definida. Porém, tem sido sugerido que o antimônio se liga ao N-metil-D-glucamina através do oxigênio do carbono-3 (Marsden *et al.*, 1985). Com relação ao mecanismo de ação, foi proposto que esses quimioterápicos atuam no parasito pela indução do efluxo de glutathiona (GSH) e tripanotiona (T[SH]₂) e a inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase (TryR) (Wyllie *et al.*, 2004). A pentamidina foi a primeira droga a ser utilizada em pacientes refratários ao SbV, e altos índices de cura foram relatados (Jha, 1983), mas sua eficácia diminuiu ao longo dos anos, com taxa de cura atual de 70% (Jha *et al.*, 1991; Thakur *et al.* 1991 a,b). Outras drogas têm sido empregadas para o tratamento das leishmanioses e dentre estas pode-se destacar a anfotericina B, miltefosina, mefloquina e sulfato de aminosidina, muitas dessas com resultados ainda pouco consistentes (Goto e Lindoso, 2010). A anfotericina B é considerada uma droga de elevada eficácia contra *Leishmania* e apresenta boa resposta terapêutica, sendo preconizado seu uso de rotina na prática clínica em pacientes que apresentem contra-indicação ao uso de antimoniais ou em casos de refratariedade a este.

Com o uso dos antimoniais trivalentes (figura 7) , entretanto, percebeu-se uma série de problemas, tais como resistência ao parasito e indução de efeitos colaterais (Lira, Sundar *et al*, 1999) como: artralgia, mialgia, náusea, vômito, cefaléia, anorexia, aumento da atividade de algumas enzimas (transaminases, fosfatase alcalina, lipase e amilase), leucopenia, alargamento do intervalo QT (intervalo do eletrocardiograma que compreende as fases de despolarização e repolarização dos ventrículos) e supra- ou infra-desnívelamento do segmento ST (parte do segmento QT).

Figura 7: Estrutura química dos antimoniais trivalentes empregados em clínica médica. (a) Tártaro de antimônio e potássio ou Tártaro emético; (b) antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®); (c) tioglicolato de sódio e antimônio (CORBETT, 1973).

Outros efeitos colaterais menos frequentes são: aumento de uréia e creatinina, arritmia cardíaca, morte súbita e herpes zoster (NED/ASCOM/FUNASA, 2000; Rath, Trivelin *et al.*, 2003; MS, 2004), que limitam a utilização desses compostos (Lira, Sundar *et al.*, 1999). Em razão dos efeitos colaterais ocorrentes do antimônio trivalente, este foi substituído pelo antimônio pentavalente (Grimaldi, Tesh *et al.*, 1989; Lira, Sundar *et al.*, 1999).

1.3.2. Anfotericina B

A anfotericina B (AmB) (figura 8) é um antibiótico macrolídeo produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, onde foi inicialmente isolada em meados de 1955 (Gold *et al.*, 1956; Vandeputte, Wachtel, Stiller, 1956). O possível mecanismo de ação da anfotericina B em macrófagos se dá pelo aumento do “burst” oxidativo, mostrado por Wilson, Thorson e Speert (1991), onde sugeriram que a anfotericina B ativaria essas células via efeito direto na membrana plasmática (interação específica com o ergosterol, esteróide presente na membrana plasmática das leishmanias), o que causa aumento da permeabilidade e consequente morte do parasito (Berman *et al.*, 1997; BEPA, 2006). A anfotericina B é aplicada unicamente por via endovenosa (MS, 2004).

Figura 8: Fórmula estrutural da anfotericina B.

As reações adversas agudas relacionadas à anfotericina B podem ser febre, calafrios, tremores, náuseas, vômitos e dores de cabeça. Essas reações ocorrem frequentemente e estão principalmente relacionadas à infusão (Schöffski *et al*, 1998; Nucci *et al*, 1999; Walsh *et al*, 2002). Estudos mostraram que administrações repetidas estavam associadas a hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada (Gerbaud *et al*, 2003), hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) (Schöffski *et al*, 1998). O tratamento da anfotericina B quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, que varia em gravidade de um paciente para outro, sendo claramente uma função da dose total. A nefrotoxicidade da anfotericina B foi constatada com o aumento das concentrações séricas da creatinina, durante o tratamento, onde muitas vezes houve o aumento de até três vezes o limite superior da normalidade (Schöffski *et al*, 1998; Walsh *et al*, 1999; Mora-Duarte *et al*, 2002).

Outro efeito tóxico da anfotericina B descrito foi a cardiotoxicidade induzida pela arritmia ventricular, que é secundária a hipocalemia em pacientes com função renal diminuída, e que são suscetíveis a essas alterações eletrolíticas (Craven, Gremillion, 1985; Schöffski *et al*, 1998). Porém, a sua ocorrência é rara se o balanço eletrolítico for mantido. A manutenção requer suplementação de potássio e magnésio para a maioria dos pacientes (Barton *et al*, 1984). Alguns autores observaram a persistência da arritmia mesmo após o tratamento de suplementação (Schöffski *et al*, 1998).

Apesar de sua atividade eficiente contra a leishmaniose, a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B complexado com micelas de desoxicolato, limita a sua utilização no tratamento da leishmaniose visceral. Para reduzir a sua toxicidade, novas formulações à base de lipídios foram desenvolvidos (Robinson &

Nahata, 1999). Estes sistemas de liberação de drogas, tais como formulações de lipossomas, complexos lipídicos, dispersões e emulsões lipídicas coloidais, foram introduzidos na prática clínica. Apesar de sua eficácia no tratamento contra a leishmaniose (Dietze *et al*, 1993; Davidson *et al*, 1996; Sundar *et al*, 1997) seu alto custo e sua toxicidade são fatores importantes que não podem ser ignorados. (Sesana *et al*, 2011).

Em decorrência da pouca disponibilidade terapêutica para o tratamento das leishmanioses, a busca por novos compostos sintéticos ou não se faz necessário, principalmente no cenário de uma doença negligenciada, em que não há incremento financeiro por parte da indústria farmacêutica. Dessa forma, alvos moleculares potenciais são buscados, e neste contexto se inclui os derivados nitroheterocíclicos.

2- FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

2 FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alvos moleculares potenciais

Cerca de 80 % de mortes por doenças crônicas ocorrem em países em desenvolvimento. Os óbitos que ocorrem nesses países representam 44 % das mortes prematuras do mundo (Chamas, 2009). Em razão de os fármacos atualmente empregados no tratamento da leishmaniose visceral apresentarem elevada toxicidade (cardíaca, renal e hepática), sendo utilizados apenas por via parenteral e por um longo período de tratamento, há uma real necessidade de uma busca por novos tratamentos, onde estes tenham uma melhor resposta terapêutica e uma diminuição expressiva dos efeitos tóxicos.

O tratamento da leishmaniose possui um arsenal terapêutico limitado e precário, e até o momento possui apenas dois grupos de medicamentos utilizados no tratamento: os antimoniais e os não-antimoniais. Os compostos nitroheterocíclicos tem sido uma das principais classes de compostos químicos estudados na tentativa de identificar novas possibilidades de terapêutica anti-protozoário. Acredita-se que a eficácia desta classe de compostos está na habilidade desses compostos inibirem a tripanotiona redutase, enzima responsável pelo mecanismo celular de detoxificação de radicais livres ou por induzir a ocorrência de estresse oxidativo, o qual produz radicais tóxicos ao parasita (Oliveira *et. al.*, 2008; Blumenstiel *et. al.*, 1999).

2.2. Método de planejamento de fármaco

O desenvolvimento e planejamento de fármacos está fundamentado em informações estruturais e de propriedades físico-químicas, onde estas se apresentam como alternativa viável na busca de novos agentes com atividade farmacológica eficiente, com a vantagem relativa de redução do tempo necessário à obtenção e identificação de novos possíveis fármacos. A modelagem molecular se mostra como ferramenta extremamente promissora na busca por novos fármacos (Carvalho *et al*, 2003). O estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR do inglês *Quantitative structure-activity relationship*) baseia-se na hipótese de que variações da resposta biológica de uma série de moléculas estão relacionadas com as mudanças nas suas propriedades estrutural, física e química.

Modelos de QSAR têm sido amplamente aplicados em diversas áreas científicas incluindo química, biologia e toxicologia (Hansch, 1995; Eroglu, 2007). As técnicas de QSAR adquiriram essa relevância devido as suas habilidades de gerar modelos que sejam capazes de prever a atividade biológica e guiar a síntese de compostos com propriedades superiores às das moléculas presentes no conjunto de dados original (Cronin, 2010).

2.3. Nitrocompostos

A partir da década de 40, os nitrocompostos começaram a ser utilizados como agentes terapêuticos, principalmente como antiparasitários, antibacterianos, vasodilatadores, entre outros (Raether & Hänel, 2003; Katzung, 2001; Tavares *et al*, 1999; Tocher, 1997; Kovacic *et al*, 1989; Korolkovas & Burckhalter, 1988; Herlich & Schweigel, 1976; Dodd & Stilman, 1944). Seu amplo espectro de ação se dá devido ao grupo nitro presente nestes compostos, denominados *parasitóforo*. Sua ação consiste quando o grupo nitro se liga aos anéis furânico, tiofênico e imidazólico (Korolkovas & Burckhalter, 1988).

Em face desse quadro, derivados nitroheterocíclicos apresentam-se como alternativa bastante viável para estudos de prospecção de novos compostos líderes para posterior aprimoramento das propriedades físico-químicas que condicionam a ação antichagásica e/ou antileishmaniótica, já que os agentes etiológicos destas doenças pertencem à mesma família, os Trypanosomatidae (Aguirre *et. al.*, 2006). Entre estes compostos, a nifuroxazida (figura 9), 5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxibenzidrazida, utilizada como agente antimicrobiano, mas que também apresenta atividade anti-chagásica e atividade anti-leishmaniótica, se mostra como candidato potencial à modificação estrutural em trabalhos que envolvem estudos de relações estrutura-atividade, com vistas à identificação dos requisitos físico-químicos que modulam estas atividades, permitindo, desta forma, o planejamento de análogos com melhor perfil tanto de atividade farmacológica como de toxicidade (Tavares *et. al.*, 2006; Rando *et. al.*, 2002).

Figura 9: Estrutura química da nifuroxazida e de análogos antileishmanicidas potenciais

SOD e TR representam as enzimas superóxido dismutase e tripanotona redutase presentes no *Trypanossoma cruzi*. TS₂ é o produto da ação da tripanotona redutase sobre seu substrato T(SH)₂.

Figura 10: Rotas de biorredução anaeróbica e aeróbica de nitrocompostos aromáticos e os intermediários, formados em reações subsequentes, ativos frente ao *Trypanossoma cruzi* e a bactérias. Adaptado de Viodé *et. al.*, 1999 e Edwards, 1993.

O grupo nitro presente nestes compostos, considerado parasitóforo é indispensável à ação antiparasitária, principalmente quando ligado a anéis furânicos, tiofênicos ou imidazólicos (Arguello *et. al.*, 2006). Estudos com derivados nitroheterocíclicos demonstram que o grupo nitro na posição 5 do anel heterocíclico é fundamental para o desempenho da atividade antiparasitária. Embora o mecanismo de ação destes compostos ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que este está diretamente relacionado com o processo de biorredução do grupo nitro que pode ocorrer tanto em presença como na ausência de oxigênio. (Viodé *et. al.*, 1999) (figura 10).

2.4. Parâmetros que expressam a atividade biológica

A atividade biológica é o resultado da resposta do organismo frente a um estímulo provocado, e essa atividade geralmente é expressa por meio de potência, e é considerada como sendo o inverso da dose ou concentração necessária para a obtenção de uma determinada resposta biológica (Tavares, 2004; Hansch & Leo, 1995). A escolha do método de quantificação da atividade biológica que resulte em estimativa de sua potência e em determinação fidedigna de modelos matemáticos são requisitos fundamentais para o êxito de estudos de QSAR (Tavares, 2004; Cronin & Schultz, 2003; Grover *et al.*, 2000).

Entre os parâmetros usados para descrever a atividade biológica cita-se a determinação de dados de inibição de crescimento celular, de concentração inibitória mínima (CIM), a dose terapêutica eficaz em 50% dos indivíduos (ED₅₀), a dose letal em 50% dos indivíduos (DL₅₀) e a afinidade de ligantes a determinados receptores entre outros (Tavares, 2004; Cronin & Schultz, 2003; Grover *et al.*, 2000).

2.5. Escolha dos grupos substituintes

O diagrama de Craig é uma ferramenta utilizada na seleção de grupos substituintes de um composto bioativo, que possibilita o planejamento de um conjunto de análogos adequados para a condução de um estudo de QSAR. Este diagrama fornece informações referentes a propriedades físico-químicas de efeitos eletrônicos (δ de

Hammett) e hidrofobicidade (π de Hansch). Essas informações dão suporte aos estudos de QSAR clássicos. A interpretação deste diagrama consiste na distribuição espacial dos grupos substituintes, conforme os valores descritores físico-químicos π (eixo X) e δ (eixo Y) em um sistema cartesiano bidimensional. Cada grupo encontra-se disposto ao longo dos eixos X e Y, dependendo do valor dos descritores físico-químico determinado experimentalmente (Kubiny, 1993; Craig, 1971) (figura 11).

Figura 11: Diagrama de intercorrelação δ VS π em substituição *para*-aromática do ácido benzóico. Adaptado de Craig, 1971.

Ao localizar determinado grupo substituinte no diagrama, observa-se os valores de δ e π correspondentes a partir de suas coordenadas (Craig, 1971). Para os estudos de QSAR que envolvem a análise da atividade biológica em função dos dois descritores estruturais (δ e π), os substituintes devem ser relacionados nos quatro quadrantes diferentes, onde no caso dos compostos nitro heterocíclicos (5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxibenzidrazida), os grupos escolhidos foram $-\text{CH}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{Cl}$ ou $-\text{Br}$, $-\text{H}$, $-\text{NH}_2$ ou $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (Tavares, 2004; Volkhard, 1995). A escolha adequada dos grupos substituintes pode conduzir à obtenção de correlações significativas nos estudos de relação estrutura-atividade (Tavares, 2004).

Diversos compostos ou fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses parecem agir diretamente sobre o parasito, induzindo a morte do mesmo pela via da apoptose, no entanto não há descrição de qual via de morte está sendo ativada. Os derivados nitroheterocíclicos apresentam atividade antiparasitária conhecida, entretanto a via de ativação de morte do parasito não está claramente definida. Uma das prioridades na área de pesquisa em doenças tropicais têm sido a identificação e caracterização de biomoléculas parasito-específicas que possam ser exploradas como alvo molecular ou quimioterápico de ataque seletivo (Dumas *et al.*, 1997). Sendo a LV uma doença negligenciada de populações negligenciadas, tornam-se necessários mais estudos para o desenvolvimento de novas drogas, regimes terapêuticos e protocolos de manejo clínico (Werneck, 2010), com eficácia comprovada e mais ainda, a necessidade de conhecermos melhor o mecanismo de ação desses fármacos.

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a bioatividade *in vitro* de compostos derivados nitroheterocíclicos, obtidos por via sintética, sobre formas promastigotas e amastogotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) infantum*.

3.2 Específico

- Avaliar a viabilidade celular de promastigotas tratadas com os compostos nitroheterocíclicos pelo método colorimétrico MTT.
- Avaliar toxicidade celular dos compostos em células THP-1.
- Avaliar possível via de indução de apoptose por anexina V e o efeito tóxico dos compostos sobre macrófagos infectados com *Leishmania (L.) infantum* por Citometria de Fluxo.
- Avaliar a produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com *Leishmania (L.) infantum* e tratados com os compostos derivados nitro-heterocíclicos

4. METODOLOGIA

Animais: Foram utilizados hamsteres (*Mesocricetus auratus*), machos, de 45 a 60 dias fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em ambiente com ventilação natural, com ração (Purina®, Brasil) e água a vontade. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP), nº 333/11(anexo 1).

Parasito: Cepa de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD46) foi utilizada no experimento, onde os parasitos foram mantidos em hamsteres (*Mesocricetus auratus*) com inoculações intraperitoniais de homogeneizado de baço de animal infectado.

Purificação de amastigotas: Hamsteres com 65 dias de infecção com *Leishmania (L.) infantum* foram sacrificados em câmara de CO₂ para a remoção do baço. Após a remoção do baço assepticamente, o mesmo foi macerado em meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA) e filtrado em gaze estéril. O macerado foi passado, progressivamente, quatro vezes em agulhas de calibre de 19G, 21G e 24G. Após a passagem pelas agulhas, a suspensão foi centrifugada a 250g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação nas mesmas condições e, em seguida, foi submetido a nova centrifugação por 30 minutos a 1200g a 4°C. O precipitado contendo as formas amastigotas foi ressuspenso em meio M199 HANKS (Cultilab, Brasil) com 10% de Soro Bovino Fetal (CRIPION, BRASIL) acrescidas de 1% de antibiótico (100µg/mL de penicilina e gentamicina) e 5% de urina humana (TEMPONE, 2005).

Obtenção de promastigotas em cultura: Após a purificação das amastigotas, as mesmas foram mantidas em cultura em meio M199 HANKS (Cultilab, Brasil) acrescidas de 10% de soro bovino fetal estéril e 2% de urina humana estéril. A cultura em frasco de cultura foi mantida em estufa BOD a 26°C, para a diferenciação do parasito da forma amastigota para a forma promastigota (TEMPONE, 2005)

Compostos Nitroheterocíclicos: Os compostos foram obtidos por via sintética e refinados pelo método QSAR por remodelagem molecular. O método QSAR baseia-se no estudo da relação quantitativa entre a estrutura química e atividade biológica (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). Foram obtidas séries de compostos nitroheterocíclicos, onde a série BSF (derivados 5-nitro-2-furfurilideno – azometínicos, contendo cinco compostos) foi utilizada para avaliar a bioatividade *in vitro* destes compostos frente à *Leishmania*. Os cinco compostos utilizados nos experimento estão descritos abaixo.

(BSF-H) N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida: mp 211,0 – 212,0 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,25 (s, 1H, H8), 8,44 (s, 1H, H6), 7,95 (d, 2H, *J*=7,3 Hz, H11, H15), 7,78 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3,9 Hz, H4), 7,65 (m, 3H, H12, H13, H14), 7,27 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3,6 Hz, H3); ¹³C RMN {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163,4 (C9), 151,8 (C2), 150,1 (C5), 135,5 (C6), 132,8 (C10), 132,1 (C13), 128,5 (C12, C14), 127,7 (C11, C15), 115,1 (C4), 114,5 (C3); Análise elementar para (C₁₂H₉N₃O₃): C, 55,60%; H, 3,50%; N, 16,21%, Experimental: C, 55,33%; H, 3,60%; N, 16,08%.

(BSF-Cl) 4-cloro[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno)]benzidrazida: mp 228,0 – 229,0 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,30 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 7,97 (d, 2H, *J*=8,3 Hz, H11, H15), 7,77 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3,9 Hz, H4), 7,61 (d, 2H, *J*=8,5 Hz, H12, H14), 7,27 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3,4 Hz, H3); ¹³C RMN {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 162,3 (C9), 151,8 (C2), 151,6 (C5), 137,0 (C13), 135,7 (C6), 131,3 (C10), 129,6 (C11, C15), 128,5 (C12, C14), 115,2 (C4), 114,2 (C3); Análise elementar para (C₁₂H₈ClN₃O₃): C, 49,08%; H, 2,75%; N, 14,31%, Experimental: C, 48,95%; H, 2,82%; N, 14,18%,

(BSF-NO₂) 4-nitro[N'-(5-nitrofurano-2-il)metileno)]benzidrazida: mp 236,0 – 238,0 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,29 (s, 1H, H8), 8,43 (s, 1H, H6), 8,35 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H12, H14), 8,14 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, H11, H15), 7,71 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3,6 Hz, H4), 7,24 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3,9 Hz, H3); ¹³C RMN {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 162,2 (C9), 151,9 (C2), 151,5 (C5), 149,5 (C13), 138,6 (C10), 136,4 (C6), 129,4 (C11, C15), 123,4 (C12, C14), 115,0 (C4), 114,2 (C3); Análise elementar para (C₁₂H₈N₄O₆): C, 47,38%; H, 2,65%; N, 18,42%, Experimental: C, 46,98%; H, 3,02%; N, 18,31%,

(BSF-CH3) 4-metil[N'-(5-nitrofuran-2-il)metileno)]benzidrazida: mp 233,8 – 235,2 °C, ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,15 (s, 1H, H8), 8,42 (s, 1H, H6), 7,84 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, H11, H15), 7,78 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3,9 Hz, H4), 7,36 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H12, H14), 7,25 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3,8 Hz, H3), 2,39 (s, 3H, CH₃); ¹³C RMN {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163,3 (C9), 151,9 (C2), 151,8 (C5), 142,3 (C13), 135,1 (C6), 129,9 (C10), 129,0 (C12, C14), 127,8 (C11, C15), 115,0 (C4), 114,6 (C3), 21,0 (CH₃); Analise elementar para (C₁₃H₁₁N₃O₄): C, 47,38%; H, 2,65%; N, 18,42%, Experimental: C, 46,98%; H, 3,02%; N, 18,31%.

Os compostos foram cedidos pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (LPDF, do FBT/FCF/USP) sob coordenação do prof. Leoberto Costa Tavares (PALACE-BERL, 2013)

Diluição dos Compostos: Os compostos foram disponibilizados na concentração de 8.000μM diluídos em 1mL de DMSO PA. A partir desta solução, foi retirada uma alíquota de 100μL e diluída em 9,9mL de RPMI sem fenol (GIBCO, EUA), diluição 1:10, obtendo uma concentração final de 800μM. O cálculo para obtenção desta concentração foi

$$C1V1 = C2V2$$

onde

$$8000\mu\text{M} \times 1000\mu\text{L} = N \times 800\mu\text{M} \text{ (concentração inicial desejada)}$$

$$N = \frac{8000 \times 1000}{800} = 10000\mu\text{L}$$

A concentração inicial dos compostos foi de 800μM, e a partir desta concentração foi realizada uma diluição seriada com doze concentrações.

Diluição seriada dos compostos: os compostos foram diluídos, seriadamente, em doze concentrações. Para cada concentração utilizou-se microtubos Eppendorf (volume de 1 mL), colocados em fileira de 1 a 12. A partir do tubo 2 até o tubo 12,

foi colocado 400µL de meio RPMI 1640 sem fenol (GIBCO, EUA). No tubo 1, foi colocado – a partir da solução de 800µM – uma alíquota de 800µL dessa solução. Foi retirada uma alíquota de 400µL do tubo 1 e diluída no tubo 2 com o RPMI 1640 sem fenol. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 400µL do tubo 2 e diluída no tubo 3. Este procedimento ocorreu sucessivamente em todos os tubos, obtendo desta forma uma diluição seriada dos compostos (de 800µM a 0,1953µM).

Avaliação da atividade *in vitro* dos compostos nas formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*: Para a avaliação da atividade *in vitro* dos compostos em formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, foram utilizadas placas de 96 poços (COSTAR, EUA) para cada composto. As culturas de *Leishmania (L.) infantum*, na fase estacionária, foram centrifugadas a 1200g por 30 minutos a 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensão em meio RPMI 1640 sem fenol, enriquecido com 10% de soro bovino fetal. Os parasitos foram colocados em placas de 96 poços (COSTAR, EUA) na concentração de 10^7 parasito/µL (50µL em cada poço), acrescidos com os compostos a serem avaliados nas concentrações obtidas, em sextuplicata, e incubadas em estufa BOD a 26°C por 48 horas (MORAIS, 2014). Como controles foram utilizados controle negativo (cultura de promastigotas íntegras), controle positivo (cultura promastigota 100% de mortalidade pela ação do DMSO PA), controle de DMSO (RPMI 1640 sem fenol com 0,5% de DMSO) e branco (apenas os compostos, sem a presença de parasito). A anfotericina B também foi utilizada como controle da droga, partindo-se da concentração inicial de 100µM, sendo a mesma diluída em meio RPMI 1640 sem fenol. O período de incubação dos parasitos nos compostos e nos controles foi de 48 horas em estufa BOD, a 26° C (SESANA, A. M., 2011).

Avaliação da anti-*Leishmania* por 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 brometo de difeniltetrazólio (MTT): O ensaio de MTT (MOSMANN, 1983) é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenadas, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato dimetiltiazol (MTT), solúvel em água, no cristal formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O MTT (Sigma, EUA) foi dissolvido (5 mg/mL) em

salina tamponada com fosfato estéril (PBS, do inglês phosphate-buffered saline) e filtrada em filtro de 0,22µm membrana. Em cada poço foi colocado 20µL desta solução de MTT e incubado por 4 horas a 24°C em estufa BOD. A extração do formazan foi realizada usando SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio, do inglês sodium dodecyl sulfate) incubado por 18 horas (80µL/poço) a 24°C em estufa BOD. A densidade optica (DO) foi determinada em espectrofotômetro leitor de placa Multiskan® MCC/340 (Brasil) em filtro 570nm (Morais, 2014). A viabilidade celular foi realizada no seguinte cálculo:

% Citotoxicidade = $100 \times (\text{Densidade ótica experimento} - \text{densidade ótica do branco do composto} / \text{densidade ótica do controle positivo} - \text{densidade ótica branco do controle})$ (Ayesha *et al*, 2014).

Avaliação de anexina V por citometria de fluxo em promastigotas de *L. L. Infantum*: O Kit de Anexina V (Becton Dickson, EUA) foi usado para detecção de células apoptóticas ou necróticas, e o procedimento foi de acordo com o protocolo do fabricante. Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* de cultura na concentração de 1×10^6 foram dispostas em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 sem fenol (acrescido de 10% de soro bovino fetal), em triplicata acrescidos de um espectro de concentração de 800µM a 0,1953µM de cada composto incubados por 48 horas a 26°C. Para a avaliação da expressão de anexina V por citometria de fluxo, primeiramente foi realizado diluição 1:10 em água ultrapura do tampão de ligação (Becton Dickson, EUA) (1ml de tampão em 9 mL de água ultra pura). As células foram lavadas em PBS estéril, por centrifugação a 250g 10 minutos e logo após ressuspensas em tampão de ligação (1x). Adicionado 5µL de Anexina V conjugado ao fluorocromo FITC em 100µL de células ressuspensas. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas em tampão de ligação (1X) e ressuspensas em 200µL de tampão de ligação. Foi acrescido 5µL de solução de iodeto de propídeo, e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FORTESSA LSR (Becton Dickson, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos através do programa FacDiva (BectonDickson, EUA) e as análises dos dados obtidos utilizou-se o software FlowJo 10.0 (Tree Star®, Inc). Os resultados foram expresso em percentagem de células marcadas com base na positividade da marcação para anexina V-FITC.

Cultura de células THP-1: THP-1 (células de linhagem humana leucêmicas monocíticas, em inglês human acute monocytic leukemia cells) foram mantidas em frasco de cultura com meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa CO₂ (5%) a 36°C (JAIN, 2012).

Diferenciação de células THP-1: Para ocorrer a diferenciação da célula THP-1 para macrófago, foi adicionado às células PMA (forbol 12-miristato 13-acetato, em inglês phorbol 12-myristate 13-acetate), na concentração de 25ng/mL. As células foram incubadas por 24 horas em estufa CO₂ (5%) a 36°C, e após este período, as células foram descoladas com auxílio do cell scraper (Costar, NY, EUA) centrifugadas a 250g por 10 minutos a 26°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensão em meio RPMI 1640 sem fenol (Cultilab, Brasil), acrescido de 10% de soro bovino fetal inativado, estéril (Cripion, Brasil). As células foram coradas com azul de tripan contadas em câmara de Neubauer para avaliação das células viáveis (na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml) e plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas em câmara de CO₂ (5%) a 37°C por 24 horas para aderência das células na placa de cultura (Jain, 2012).

Avaliação da toxicidade celular dos compostos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos: Após aderência dos macrófagos nas placas de 96 poços, para determinar a concentração inibitória 50% (IC₅₀) dos compostos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos, os compostos foram incubados por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) num espectro de concentração de 400µM a 0,097µM. Depois do período de 48 de incubação, o MTT foi dissolvido (5 mg/mL) em salina tamponada com fosfato estéril (PBS, do inglês phosphate-buffered saline) e filtrada em filtro de 0,22µm de membrana. Em cada poço foi colocado 20µL desta solução de MTT e incubado por 4 horas a 24°C em estufa BOD (26°C). A extração do formazan foi realizada usando SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio, do inglês sodium dodecyl sulfate) incubado por 18 horas (80µL/poço) a 24°C em estufa BOD. A densidade ótica (DO) foi determinada em espectrofotômetro leitor de placa Multiskan® MCC/340 (Brasil) em filtro 570nm (MORAIS, 2014). A viabilidade celular foi realizada conforme descrito na metodologia da avaliação da atividade anti-*Leishmania* das formas promastigotas de *L. L. infantum*. (AYESH *et al*, 2014).

Infecção de células THP-1: Para a infecção das células THP-1 diferenciadas, foram usadas promastigotas de *L.L. infantum* (fase metacíclica, na proporção de 1:10 = células:promastigotas). Após o período de diferenciação das células THP-1, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^6$ células/mL) e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. Logo após o período de incubação as promastigotas de *L. L. infantum* foram adicionadas à placa de culturado 96 poços, contendo os macrófagos aderidos, e incubados em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24 horas, para efetivação da infecção. Em seguida, os compostos foram adicionados conforme as diferentes concentrações dos diferentes compostos (800µm a 0,1953µm) por 48 horas a 37°c em estufa de CO₂ (5%).

Avaliação de viabilidade celular por 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 brometo de difeniltetrazólio (MTT) em células THP-1 infectadas com *Leishmania (L.) infantum*: Após a diferenciação das células THP-1 de monócitos a macrófagos (indução por PMA) e infecção com promastigotas de *L. L. infantum*, os macrófagos foram incubados com os compostos (concentrações de 400µM a 0,19µM) por 48 horas em estufa de CO₂ 5% a 37° C. Após o período de incubação, o MTT foi dissolvido (5 mg/mL) em salina tamponada com fosfato estéril (PBS, do inglês phosphate-buffered saline) e filtrada em filtro de 0,22µm membrana. Em cada poço foi colocado 20µL desta solução de MTT e incubado por 4 horas a 24°C em estufa BOD. A extração do formazan foi realizada usando SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio, do inglês sodium dodecyl sulfate) incubado por 18 horas (80µL/poço) a 24°C em estufa BOD. A densidade optica (DO) foi determinada em espectrofotômetro leitor de placa Multiskan® MCC/340 (Brasil) em filtro 570nm (MORAIS, 2014). A viabilidade celular foi descrita no item de avaliação da atividade anti-*Leishmania* das formas promastigotas de *L. L. infantum* (AYESH *et al*, 2014).

Dosagem de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de células THP-1 infectadas com *Leishmania (L.) infantum*: Para visualizar a ativação de produção de NO por macrófagos após infecção e tratamento (incubação das células infectadas com os compostos de 48 horas em estufa CO₂ a 5% a 37° C), o sobrenadante foi retirado após o período de incubação. Em placas de 96 poços, foram colocados 100µL de sobrenadante da cultura, e acrescido 100µL de Reagente de Griess (SIGMA), e incubados por 30 minutos protegidos da luz à temperatura ambiente. Após a

incubação, a concentração de nitrito foi calculada usando o padrão (curva de 100 μ M e 400 μ M). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan, Brasil), em filtro de 540nm (T.G., RIBEIRO, 2014).

Análise estatística: Os dados obtidos representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata a partir de pelo menos 3 ensaios independentes. Os valores de IC50 e IC95% foram calculados utilizando as curvas dose-respostas sigmoidal do software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para as análises de viabilidade celular foi utilizado o teste ONE-WAY análise de variância (ANOVA), seguido por Tukey's test post hoc test para múltiplas comparações entre grupos.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade anti-*Leishmania*

O efeito da atividade anti-*Leishmania* da série BSF foi avaliado mediante a inibição da capacidade de redução do MTT, pelo parasito. Observando as DO (tabela 01) da série em diferentes concentrações, encontramos comportamento diferente entre as séries e as respectivas concentrações.

Tabela 1: Comparação com as densidades óticas dos compostos da série BSF, nas diferentes concentrações, na avaliação de viabilidade da atividade anti-*Leishmania* nas formas promastigotas de *L. L. infantum*.

COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA D.O. DOS COMPOSTOS DA SÉRIE BSF EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES														
[] µm	BSF-H		BSF-Cl		BSF-NO2		BSF-CH3		BSF-BUTIL		ANF. B		CP	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
400	0,077	0,008	0,069	0,058	0,069	0,021	0,073	0,012	0,071	0,026	NR		0,072	0,042
200	0,082	0,006	0,077	0,007	0,080	0,029	0,080	0,009	0,082	0,022	NR			
100	0,084	0,012	0,080	0,008	0,082	0,020	0,083	0,003	0,083	0,021	0,064	0,007	CN	
50	0,086	0,036	0,083	0,006	0,086	0,010	0,091	0,004	0,087	0,007	0,076	0,020	MÉDIA	DP
25	0,090	0,023	0,087	0,004	0,089	0,012	0,097	0,004	0,091	0,013	0,079	0,011	0,145	0,047
12,5	0,096	0,005	0,092	0,006	0,093	0,008	0,102	0,005	0,098	0,005	0,083	0,005		
6,25	0,112	0,003	0,097	0,012	0,104	0,005	0,111	0,015	0,107	0,010	0,087	0,002	CDMSO	
3,12	0,145	0,003	0,105	0,018	0,413	0,006	0,241	0,023	0,135	0,009	0,099	0,006	MÉDIA	DP
1,56	0,213	0,009	0,128	0,025	0,929	0,010	0,709	0,009	0,553	0,010	0,125	0,011	0,153	0,023
0,78	0,535	0,012	0,492	0,018	1,112	0,006	0,987	0,036	0,974	0,009	0,284	0,044		
0,39	0,942	0,043	0,769	0,012	1,350	0,012	1,288	0,015	1,201	0,006	0,705	0,023		
0,19	1,188	0,066	0,991	0,035	1,541	0,034	1,447	0,019	1,565	0,024	0,826	0,039		
0,09	NR		NR		NR		NR		NR		1,408	0,022		
0,04	NR		NR		NR		NR		NR		1,514	0,479		

Média realizada por amostragem (análise realizada em sextuplicata). DP: Desvio padrão; NR: Não realizado; CP: parasitos mortos/ inviáveis; CN: parasitos viáveis; CDMO: parasitos viáveis incubados na concentração inicial de DMSO usado na diluição dos compostos.

Ao observar as D.O. obtidas dos compostos, é possível notar que com a diminuição da concentração, há um aumento da densidade ótica. Há uma crescente constante nas D.O. inversamente proporcional à diminuição da concentração dos compostos. Comparando-se as D.O. dos compostos com os controles, observa-se que

em baixas concentrações há maior viabilidade dos parasitos. Os resultados obtidos mostraram:

- em 400 μ M o composto BSF-H apresentou diferença estatística em relação aos compostos BSF-Cl, BSF-NO₂, BSF-Butil e com os controles positivo, negativo e da droga (anfoterencina B) ;

- na concentração de 50 μ M o composto BSF-Cl apresentou diferença com o composto BSF-CH₃.

- Na concentração 6,25 e 3,13 μ M o composto BSF-H mostrou diferença em relação ao composto BSF-Cl,

- em 1,56 μ M o composto BSF-Cl apresentou diferença em relação aos compostos BSF-NO₂ e BSF-CH₃.

- Na concentração de 0,78 μ M, o composto BSF-Cl mostrou diferença em relação ao composto BSF-NO₂.

Em todas as concetrações todos os compostos apresentaram diferenças com o controle e controle da droga , como esperado.

A tabela 02 mostra os valores de EC₅₀ de proliferação e de IC 95% na forma promastigota de *L. L. infantum* após o período de 48 horas de exposição aos compostos da série BSF. Notamos que os compostos BSF-H, BSF-Cl e BSF-NO₂ apresentaram maior efeciência em menor dose em relação ao compostos BSF-CH₃ e BSF-Butil, mas não foram mais efetivos quando comparados com o controle (anfotericina B).

Tabela 2: Determinação do EC₅₀ dos compostos da série BSF na avaliação da atividade anti-*Leishmania* em promastigotas de *L.L. infantum*.

	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO ₂	BSF-CH ₃	BSF-BUTIL	ANF. B
EC ₅₀	0,76	0,72	0,58	2,08	1,97	0,22
(μ M)	(0,67 $\pm$ 0,85)	(0,66 $\pm$ 0,79)	(0,49 $\pm$ 0,68)	(1,85 $\pm$ 2,34)	(1,34 $\pm$ 2,89)	(0,18 $\pm$ 0,27)

EC₅₀: concentração efetiva 50% determinado após 48 horas de incubação.

Gráfico 1: Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre formas promastigotas de *L. L. infantum*. A anfotericina B foi utilizada como padrão.

A curva dose-resposta (gráfico) mostra o comportamento dos compostos frente a *Leishmania*. Quando comparados, o composto BSF-NO₂ mostrou uma atividade mais expressiva, ou seja, em concentrações baixas mostrou maior atividade anti-*Leishmania* quando comparada com os demais compostos. A anfotericina B foi o que apresentou melhor comportamento quando comparado com os compostos da série BSF.

A tabela 03 mostra a viabilidade (%) das formas promastigotas de *L. L. infantum* após o período de 48 horas de incubação dos compostos da série BSF. Podemos notar que a medida que aumenta a concentração dos derivados aumenta a sobrevida, caracterizando a forma dose-resposta dos compostos ao se comparar com a curva dose-resposta do gráfico 1. A tabela 3 mostra que o composto BSF-NO₂ nas concentrações 25 e 12,5 μ M mostrou 50% de morte celular, e o composto BSF-Cl apresentou 50% de morte celular entre as concentrações 12,5 e 6,25 μ M. Ou seja, quanto menor a concentração a maior a sobrevida dos parasitos. O controle anfotericina B mostrou 50% de morte celular na concentração de 6,25 μ M, o que mostra que os compostos apresentaram atividade anti-*Leishmania* significativa quando comparados com o controle.

Tabela 3: Porcentagem de sobrevivência das formas promastigotas de *L. L. infantum* submetidos aos compostos da série BSF e com a anfotericina B no intervalo de concentração de 400µM a 0,04µM, avaliados pelo método MTT.

[] (µM)	VIABILIDADE					
	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO2	BSF-CH3	BSF-BUTIL	ANFO B
	VIABIL. %	VIABIL. %	VIABIL. %	VIABIL. %	VIABIL. %	VIABIL. %
400	38,95	26,68	27,66	31,10	28,97	NR
200	40,10	35,02	38,63	36,99	39,28	NR
100	43,86	37,15	40,10	38,95	43,54	25,70
50	41,65	40,67	39,77	45,83	41,82	34,04
25	49,26	42,72	48,28	56,14	43,37	39,77
12,5	53,36	48,36	50,41	59,74	54,34	39,36
6,25	69,07	51,47	62,44	67,51	65,38	46,97
3,13	100,00	55,89	100,00	100,00	91,24	57,12
1,56	100,00	83,22	100,00	100,00	100,00	82,41
0,78	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0,39	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0,19	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0,09	NR	NR	NR	NR	NR	100,00
0,04	NR	NR	NR	NR	NR	100,00

Avaliação da viabilidade celular (%) segundo Ayeshe *et al* (2014). NR: Não realizado.

5.1.1 Avaliação da marcação de externalização da fosfatidilserina na membrana do parasito por citometria de fluxo

Para analisar o tipo de morte celular estudamos a externalização de fosfatidilserina da membrana das formas promastigotas de *L. L. infantum* como uma das vias de indução de apoptose pelos compostos incubadas por 48 horas comparados com a anfotericina B. Após o período de incubação, as formas promastigotas (em cada composto e em concentrações intermediárias) foram marcadas com anexina V⁺, para fase inicial de apoptose e anexina V⁺ e IP⁺, como fase tardia da apoptose. A figura 12 mostra a representação gráfica dos compostos em diferentes concentrações, com os controles positivos (formas promastigotas de *L.L. infantum* induzidas à morte celular por apoptose) e negativos (formas promastigotas de *L.L. infantum* viáveis) obtidos por análise em citometria de fluxo. Foram realizados três experimentos independentes (figura 12).

Figura 12: Representação em dot plot da evolução da externalização de fosfatidilserina das formas promastigotas de *L. L. infantum* incubadas por 48 horas com os compostos. As células foram marcadas por FITC-anexina V e iodo de propídeo e analisadas pelo citômetro BD LRSFortessa (Beckton Dickson®). Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (Tree Star®, Inc.) e foram analisados 10.000 eventos por composto e para cada concentração.

Eixo X: Anexina V; eixo Y: Iodo de propídeo (PI)

Os valores adquiridos mostraram que os compostos BSF-H e BSF-Cl induziram maior porcentagem de externalização da fosfatidilserina quando comparados com os demais compostos e com a anfotericina B

Tabela 4. Percentagem de células marcadas com iodeto de propídeo e anexina V com fluoresceína, tratadas com diferentes concentrações de anfotericina b e compostos da série BSF derivados nitro-heterocíclico. Foram analisados 10.000 eventos por amostra, em citometria de fluxo.

[400µM]				[100µM]			
	PI	AV	PI + AV		PI	AV	PI + AV
CN	1,75	0,35	1,93	CN	1,75	0,35	1,93
CP	15,9	3,59	48,8	CP	15,9	3,59	48,8
Anf. B	NR	NR	NR	Anf. B	19,9	11,9	50,1
BSF-H	4,56	6,54	63,2	BSF-H	4,61	8,1	71,2
BSF-Cl	3,34	8,59	6,66	BSF-Cl	4,04	11,4	50,0
BSF-NO ₂	5,31	11,0	21,9	BSF-NO ₂	3,37	22,1	24,0
BSF-CH ₃	7,24	5,72	43,0	BSF-CH ₃	5,85	10,6	46,7
BSF-Butil	21,6	13,9	61,4	BSF-Butil	3,44	14,6	47,0
[25µM]				[6,25µM]			
	PI	AV	PI + AV		PI	AV	PI + AV
CN	1,75	0,35	1,93	CN	1,75	0,35	1,93
CP	15,9	3,59	48,8	CP	15,9	3,59	48,8
Anf. B	16,3	8,47	62,3	Anf. B	6,70	16,0	35,1
BSF-H	4,22	16,2	47,3	BSF-H	3,49	19,3	26,2
BSF-Cl	3,62	15,9	23,4	BSF-Cl	2,76	7,14	12,0
BSF-NO ₂	2,75	20,5	22,5	BSF-NO ₂	2,76	8,15	10,2
BSF-CH ₃	4,52	19,3	37,1	BSF-CH ₃	4,62	13,5	19,7
BSF-Butil	1,50	11,9	14,8	BSF-Butil	3,13	6,70	11,9
[1,56µM]				[0,39µM]			
	PI	AV	PI + AV		PI	AV	PI + AV
CN	1,75	0,35	1,93	CN	1,75	0,35	1,93
CP	15,9	3,59	48,8	CP	15,9	3,59	48,8
Anf. B	14,1	13,0	32,0	Anf. B	3,74	1,37	5,62
BSF-H	2,93	11,9	15,0	BSF-H	NR	NR	NR
BSF-Cl	2,80	7,28	10,8	BSF-Cl	NR	NR	NR
BSF-NO ₂	2,22	5,14	7,55	BSF-NO ₂	NR	NR	NR
BSF-CH ₃	8,06	9,76	22,9	BSF-CH ₃	NR	NR	NR
BSF-Butil	2,06	2,88	5,16	BSF-Butil	NR	NR	NR

O composto BSF-H foi positivo para iodeto de propídeo e anexina V em 63,2% (400µM), 71,2% (100 µM), 47,2% (25 µM), 26,2% (6,25 µM) e 15,0% (1,56 µM). O composto BSF-Cl foi positivo em 66,6% (400 µM), 50,0% (100 µM), 23,4% (25 µM), 12,0% (6,25 µM) e 10,8% (1,56 µM). O controle anfotericina B foi positivo em 62,3% (100 µM), 50,1% (25 µM), 35,1% (6,25 µM), 32,0% (1,56 µM) e 5,62% (0,39 µM). Quando compara-se os compostos com a anfotericina B, o composto BSF-H mostrou estatisticamente valores próximos à anfotericina B (tabela 4).

5.2 Avaliação da citotoxicidade em THP-1 sem infecção

Para o ensaio de citotoxicidade em células THP-1 diferenciadas em macrófagos, conforme descrito em material e métodos, a série BSF foi avaliada pelo método MTT. A média das densidades óticas obtidas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Densidade ótica da toxicidade compostos derivados nitroheterocíclicos sobre células THP-1 incubadas por 48 horas com compostos da série BSF no intervalo de concentração de 400 μ M a 0,04 μ M, e avaliadas pelo método MTT.

COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DA D.O. DOS COMPOSTOS DA SÉRIE BSF EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES														
[] μ m	BSF-H		BSF-CI		BSF-NO2		BSF-CH3		BSF-BUTIL		ANF. B		CP	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
400	0,119	0,008	0,119	0,058	0,214	0,021	0,210	0,012	0,164	0,026	NR		0,466	0,023
200	0,126	0,006	0,243	0,007	0,261	0,029	0,229	0,009	0,207	0,022	NR			
100	0,142	0,012	0,257	0,008	0,292	0,020	0,238	0,003	0,228	0,021	0,212	0,007	CN	
50	0,170	0,036	0,266	0,006	0,319	0,010	0,244	0,004	0,246	0,007	0,236	0,020	MÉDIA	DP
25	0,222	0,023	0,284	0,004	0,336	0,012	0,252	0,004	0,263	0,013	0,256	0,011	0,119	0,012
12,5	0,239	0,005	0,290	0,006	0,353	0,008	0,256	0,005	0,273	0,005	0,267	0,005		
6,25	0,244	0,003	0,303	0,012	0,363	0,005	0,280	0,015	0,285	0,013	0,274	0,002	CDMSO	
3,12	0,248	0,003	0,328	0,018	0,372	0,006	0,306	0,023	0,304	0,009	0,284	0,006	MÉDIA	DP
1,56	0,264	0,009	0,357	0,025	0,384	0,010	0,328	0,009	0,316	0,010	0,298	0,011	0,471	0,026
0,78	0,283	0,012	0,393	0,018	0,393	0,006	0,361	0,036	0,329	0,009	0,340	0,044		
0,39	0,319	0,043	0,411	0,012	0,405	0,012	0,407	0,015	0,341	0,006	0,388	0,023		
0,19	0,403	0,066	0,445	0,035	0,428	0,034	0,433	0,019	0,357	0,024	0,451	0,039		
0,09	NR		NR		NR		NR		NR		0,492	0,022		
0,04	NR		NR		NR		NR		NR		0,722	0,479		

[]: Concentração; NR: não realizado; CP: controle positivo (células THP-1 viáveis); CN: controle negativo (células THP-1 inviáveis); CDMSO: controle de DMSO (as células THP-1 foram incubadas por 48 horas em meio RPMI com 0,5% de DMSO).

Observando as densidades óticas dos compostos, comparando-as com os controles e com a anfotericina B, nota-se que os compostos mostram valores maiores em concentrações menores quando comparados com a anfotericina B. Esses valores sugerem que os compostos possuem uma toxicidade menor em relação à anfotericina B, nas mesmas concentrações.

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT, onde se avaliou a viabilidade celular de células THP-1 incubadas por 48 horas com compostos da série BSF. Os valores de EC₅₀ e de IC₉₅% foram também avaliados (tabela 6).

Tabela 6: Avaliação de viabilidade celular de células THP-1 incubadas nos compostos da série BSF.

CITOTOXICIDADE - CÉLULAS TH-1						
EC50 (μm)	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO ₂	BSF-CH ₃	BSF-Butil	ANF. B
	10,520	0,057	10,900	1,910	NR	0,083
	(9,025 $\pm$ 12,27)	(0,005 $\pm$ 2,968)	(9,161 $\pm$ 12,97)	(1,669 $\pm$ 2,168)	NR	(0,027 $\pm$ 2,595)
IS	13,842	0,079	18,793	0,918		0,363

CE₅₀: concentração efetiva 50% determinado após 48 horas de incubação. NR: não realizado. IS: índice de seletividade.

Gráfico 2: Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre células THP-1 diferenciadas em macrófagos. A anftericina B foi utilizada como padrão.

Dos cinco compostos avaliados, os que apresentaram melhor EC₅₀ e índice de seletividade foram os compostos BSF-H e BSF-NO₂ quando comparados com a anftericina B, o que mostra menor citotoxicidade em relação à anftericina B. Os compostos BSF-H e BSF-NO₂ foram mais seletivos para parasitos do que para células, isto é, o BSF-H é 13 vezes mais ativo contra parasito do que contra célula hospedeira e o BSF-NO₂ é 18 vezes mais ativo contra parasito do que contra a célula hospedeira. Os compostos BSF-Cl e BSF-CH₃ apresentam índice de seletividade baixos semelhantes à anftericina B.

O gráfico 3 mostra a curva dose-resposta da citotoxicidade dos compostos da série BSF em células THP-1. Os compostos BSF-NO₂ e BSF-H mostraram

estatisticamente resultados superiores comparados com os demais compostos da série BSF e com a anfotericina B, ao apresentarem baixa toxicidade em altas concentrações.

A avaliação de viabilidade das células THP-1 diferenciadas em macrófagos foi realizado segundo Ayesh *et al* (2014). O composto BSF-NO₂ induziu maior viabilidade em comparação com os outros compostos, exceto o composto BSF-Cl (tabela 7). Em comparação com o composto BSF-Cl, este composto também mostrou uma viabilidade expressiva, além de apresentar um EC50 mais significativo ao comparar com os demais compostos.

Tabela 7: Porcentagem de sobrevivência de células THP-1 diferenciadas em macrófagos incubados por 48 horas com os compostos da série BSF e com a anfotericina B no intervalo de concentração de 400µM a 0,04µM, e avaliada pelo método MTT.

TABELA - % VIABILIDADE						
CONCENTRAÇÃO (µm)	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO ₂	BSF-CH ₃	BSF-BUTIL	ANFO B
400	18,05	37,16	40,86	39,64	28,96	NR
200	19,42	47,12	50,99	44,13	39,13	NR
100	22,45	50,71	58,83	45,23	43,18	39,4
50	30,69	52,60	65,29	47,91	48,66	46,26
25	42,55	57,64	69,98	50,08	52,72	50,71
12,5	47,04	59,10	73,96	51,14	55,24	53,39
6,25	48,18	61,98	75,97	56,58	57,72	55,83
3,13	49,09	67,97	78,13	62,92	62,29	57,33
1,56	52,44	73,80	79,79	66,82	65,13	60,40
0,78	55,43	82,66	82,74	75,49	68,05	70,65
0,39	65,28	87,63	85,86	86,05	70,76	81,91
0,19	83,84	95,59	90,78	92,08	74,23	96,93
0,009	NR	NR	NR	NR	NR	100,00
0,004	NR	NR	NR	NR	NR	100,00

Avaliação da viabilidade celular (%) segundo Ayesh *et al* (2014). NR: Não realizado.

5.3 Avaliação da Citotoxicidade das células THP1 infectadas com promastigotas *L. L. infantum*

Os cinco compostos da série BSF também foram avaliados em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectados com promastigotas de *L. L. infantum*. Além

da a viabilidade celular dos macrófagos infectados foi analisado a produção de óxido nítrico destes macrófagos; fator importantíssimo na defesa contra o hospedeiro. Na tabela 8, o EC₅₀ avaliado mostrou que dentre os compostos testados, os compostos BSF-NO₂ e BSF-CH₃ demonstraram melhor atividade *in vitro*. Resultados similares com os obtidos na avaliação da citotoxicidade.

Tabela 8: Avaliação da citotoxicidade nas células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectados com promastigotas de *L. L. Infantum* incubadas por 48 horas nos compostos da série BSF e com a anfotericina B.

	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO ₂	BSF-CH ₃	BSF-BUTIL	ANF. B
CC ₅₀	4,36	18,62	20,67	21,78	17,76	5,25
(μM)	(2,61±7,30)	(15,37±22,57)	(16,86±25,34)	(18,80±25,23)	(14,36±21,96)	(4,62±5,96)

CC₅₀: concentração citotóxica 50% determinado após 48 horas de incubação.

Uma curva dose-resposta foi realizada com os macrófagos infectados e incubados por 48 horas nos compostos da série BSF. Os resultados obtidos foram avaliados por MTT. O composto BSF-NO₂ apresentou maior indução de viabilidade em relação aos demais compostos, e também em relação à anfotericina B.

COMPARAÇÃO COMPOSTOS (MACRÓFAGO INFETCTADO)

Gráfico 3: Curva dose-resposta dos compostos da série BSF sobre células THP-1 diferenciadas em macrófagos infectados. A anfotericina B foi utilizada como padrão.

A avaliação de viabilidade das células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectadas com formas promastigotas de *L. L. infantum* foi realizado segundo Ayesh *et*

al (2014). Na tabela 9, a sobrevida (%) dos macrófagos infectados mostrou que a partir da concentração de 25 μ M, os compostos BSF-Cl e BSF-NO₂ induziram taxa de sobrevida acima de 50% enquanto que o controle da droga a anfotericina B apresentou em 100 μ M, significando que a toxicidade das séries está em concentrações mais elevadas. Nota-se que a série Cl nas concentrações 400 e 100 μ M apresentaram valores (%) próximas ao controle, entretanto as demais séries não apresentaram atividade similar.

Tabela 9: Porcentagem de sobrevida de macrófagos infectados incubados por 48 horas com os compostos da série BSF e com a anfotericina B nas concentrações de 400 μ M a 1,56 μ M, avaliada pelo método MTT.

TABELA - % VIABILIDADE						
CONCENTRAÇÃO (μ M)	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO ₂	BSF-CH ₃	BSF-BUTIL	ANFO B
400	23,91	24,38	22,86	21,72	23,18	45,83
100	29,43	32,76	25,78	24,17	29,06	63,96
25	44,22	53,18	69,27	35,99	57,55	91,82
6,26	54,32	79,48	100,00	76,35	100,00	100,00
1,56	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Avaliação da viabilidade celular (%) segundo Ayesh *et al* (2014).

Para verificar o nível de infectividade frente as competências das séries em diferentes concentrações, macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. L. infantum* na proporção 10:1, e tratados com os cinco compostos da série BSF por 48 horas em cinco concentrações (de 400 μ M a 1,56 μ M) tendo como controle macrófago infectado e sem tratamento e controle da droga. As lâminas em triplicata foram coradas com Giemsa e observadas em microscopia óptica (100X) e foram lidas 900 células por série e por concentração. O resultado foi expresso em % de macrófagos que permaneceram infectados (tabela 10).

Tabela 10: Porcentagem de macrófagos infectados e não infectados após o período de 48 horas de tratamento com os compostos da série BSF e anfotericina B.

AVALIAÇÃO GERAL - MACRÓFAGOS INFECTADOS												
[] μM	BSF-H		BSF-Cl		BSF-NO2		BSF-CH3		BSF-BUTIL		ANF. B	
	Ø	Ø infectado	Ø	Ø infectado	Ø	Ø infectado	Ø	Ø infectado	Ø	Ø infectado	Ø	Ø infectado
400	56,8	43,2	79,4	20,6	60,8	39,2	48,8	51,2	37,3	62,7	NR	NR
100	54,7	45,3	69,2	23,0	55,6	44,9	42,2	57,8	63,7	36,3	82,7	17,3
25	45,8	54,2	58,8	41,2	35,0	65,0	40,6	59,4	51,7	48,3	NR	NR
6,25	59,7	40,3	46,6	53,4	32,9	67,1	42,9	57,1	18,6	77,7	NR	NR
1,56	45,3	54,7	52,2	47,9	32,4	67,6	33,0	67,0	49,1	50,9	NR	NR
0,39	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	63,1	36,9

Ø: Macrófago sem infecção.; Ø infectado: macrófago infectado com promastigotas de *L. L. infantum*.. NR: não realizado.

Na tabela 11 mostra-se a relação de infecção de parasitos por célula, obtidas por contagem em microscopia. Observa-se que, entre os compostos da série BSF, os compostos BSF-CL e BSF-Butil reduziram a carga parasitária nos macrófagos na concentração de 1,56μM. E o composto BSF-Cl, nas menores concentrações, apresentou maior redução da carga parasitária nos macrófagos. A anfotericina B mostrou resultado semelhante aos obtidos com os compostos BSF-Cl e BSF-Butil.

Tabela 11: Relação de parasito por célula submetidas a tratamento com os compostos da série BSF e anfotericina B. A contagem de lâminas foi realizada por microscopia ótica, onde foram lidas noventa e seis células por lâmina.

RELAÇÃO-QUANTIDADE DE PARASITO/CÉLULA							
[] μm	BSF-H	BSF-Cl	BSF-NO2	BSF-CH3	BSF-Butil	ANF. B	CP
400	2,2:1	3,2:1	3,6:1	3,0:1	2,5:1	NR	7,3:1
100	2,0:1	3,6:1	4,8:1	3,0:1	3,0:1	2,2:1	
25	2,8:1	2,4:1	3,5:1	3,6:1	2,9:1	NR	
6,25	3,0:1	2,8:1	3,4:1	2,6:1	2,9:1	NR	
1,56	3,7:1	2,6:1	3,6:1	3,7:1	2,4:1	NR	
0,39	NR	NR	NR	NR	NR	2,8:1	

5.3.1 Avaliação da produção de óxido nítrico

A incubação dos cinco compostos da série BSF com os macrófagos infectados induzira a produção de óxido nítrico (figura 14). Os compostos mostraram alta produção de óxido nítrico, quando comparados com células incubadas com LPS.

Figura 13: Efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos. Os macrófagos foram incubados na presença e ausência de lipopolissacarídeos (LPS) e na presença dos compostos (eixo Y: concentração em mM de nitrito).

Dentre os cinco compostos avaliados, o composto BSF-NO₂ expressou maior produção de nitrito na concentração de 6,25 mM em relação à anfotericina b. O composto BSF-CL induziu maior produção de nitrito na concentração de 25 mM, bem como os compostos BSF-CH₃ e BSF-Butil.

6. DISCUSSÃO

A busca por novos fármacos anti-*Leishmania* têm-se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes e o aumento de falhas terapêuticas observadas em varias regiões. Diversos compostos, sejam eles derivados de produtos naturais, compostos semi-sintéticos ou sintéticos têm sido propostos para o tratamento da leishmaniose. Diferentes métodos de eleição de drogas que apresentem ação contra *Leishmania* são utilizados, destacando-se: reposição de fármacos (conhecido como “pigback”), desenvolvimento de fármaco por modo empírico, modificação molecular e planejamento racional, tal como o QSAR (*Qualitativy Structure-Activitiy Relashionship*) onde um composto é desenhado levando-se em conta a estrutura molecular do alvo de interesse (Tavares *et. al.*, 2006; Rando *et. al.*, 2002).

Para a pesquisa de novas alternativas medicamentosas é necessário ter como base o conhecimento da estrutura e dos processos metabólicos do agente etiológico, tal como a *L. L. infantum*. A família Trypanosomatidae (família ao qual o gênero *Leishmania* pertence) apresenta características distintas para o estudo de novos alvos terapêuticos. Estes estudos comparativos entre o hospedeiro mamífero e o metabolismo dos tripanossomas têm demonstrado a existência de alvos enzimáticos específicos, alvos de estudo para a ação de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*. Dentre esses alvos, pode-se citar a cruzipaína, a tripanotiona redutase, a fumerato redutase, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a esqueleto epoxidase e a *trans*-sialidase parasitária (Krauth-Siegel *et al*, 2005; Krauth-Siegel & Inhoff, 2003; Coura e Castro, 2002). A tripanotiona redutase, dentre estes alvos se apresenta em evidência, devido ao seu mecanismo celular que é responsável pela detoxificação de radicais livres (vitais ao

parasita), o que o torna como alvo potencial para a ação de novos fármacos (Krauth-Siegel *et al*, 2005; Krauth-Siegel & Inhoff, 2003; Coura e Castro, 2002; Urbina, 2001; Blumenstiel *et al*, 1999; Viodé *et al*, 1998; Krauth-Siegel *et al*, 1995; Jockers-Scheribl *et al*, 1989; Henderson *et al*, 1988). Os compostos 5-nitroheterocíclicos, devido à característica de formação do radical nitro ânion, interagem com o sistema tripanotona redutase e seu substrato, os quais são considerados responsáveis pela atividade biológica. Em nosso estudo, a escolha da série BSF se mostrou excelente candidato para estudo de futuros candidatos a fármacos anti-*Leishmania*, baseando-se nas propriedades físico-químicas de efeitos eletrônicos (δ de Hammett) e hidrofobicidade (π de Hansch) analisadas no diagrama de Craig, que demonstrou uma boa relação atividade/estrutura. A partir desses achados, os substituintes -H, -Cl, -NO₂, -CH₃ e -Butil foram os escolhidos para este estudo. Esses mesmos compostos com os substituintes definidos, já tinham apresentado atividade sobre epimastigotas de *T.cruzi* e por serem do mesmo gênero das *Leishmanias*, avaliamos-os em promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (Palace-Berl, 2012).

No presente estudo, os cinco compostos da série BSF apresentaram alguma atividade anti-*Leishmania*, com diferentes EC₅₀. Este fato se deve, provavelmente, porque determinados substituintes, como no caso do -Cl e -NO₂ que apresentaram menor EC₅₀, apresentem melhor relação atividade/estrutura. Em formas promastigotas, os compostos BSF-NO₂ (EC₅₀: 0,58μM), BSF-H (EC₅₀: 0,76μM) e BSF-Cl (EC₅₀: 0,58μM) foram mais ativos, determinado pela metodologia do MTT. Estes resultados de atividade se devem ao fato de haver, provavelmente, atividade dos compostos sobre a tripanotona redutase do parasito, induzindo a morte do mesmo. A ação de nitroheterocíclicos sobre tripanotina redutase de Trypanossomas já foi demonstrado por Viodé (*et al*, 1999). Quando comparamos o EC₅₀ dos nossos compostos com a

anfotericina B (EC_{50} : 0,022 μ M), nota-se que este último apresenta EC_{50} menor, isto é, sendo mais efetivo, quando comparado à série de compostos aqui utilizados. Este ponto é crucial, pois a anfotericina B tem-se mostrado como um dos fármacos de maior atividade leishmanicida descrito (Sesana *et al*, 2011; Lucero *et al*, 2015; Yesilova *et al*, 2015), porém outros fármacos com menor atividade leishmanicida são bastante utilizados no tratamento das leishmanioses, como no caso da miltefosina (Kaur *et al*, 2015; Sundar *et al*, 2015; Vakil *et al*, 2015). Estes achados não inviabilizam uma possível utilização dos derivados nitroheterocíclicos da série BSF, como uma alternativa no tratamento das leishmanioses, principalmente se em estudos *in vivo*, futuros, estes compostos apresentarem menor efeito adverso e puderem ser utilizados por via oral, o que é uma opção inviável de aplicação da anfotericina B. Quando avaliamos a toxicidade celular dos nossos compostos em células THP-1 e comparamos com a anfotericina B, observamos que, principalmante, os compostos BSF-H e BSF-NO₂ apresentaram índice de seletividade bem superior ao da anfotericina B, sendo que estes compostos foram 13 e 18 vezes mais ativos contra parasitos, do que contra a célula. Estes resultados de citotoxicidade favoráveis aos compostos, nos leva a pensar que, uma vez estes compostos apresentarem atividade sobre formas amastigotas intracelulares semelhantes a anfotericina B, porém com menor toxicidade nas células hospedeiras (macrófago THP-1) reforça o ponto de que temos um conjunto de compostos promissores no tratamento da leishmaniose, que poderão apresentar menores efeitos adversos do que o fármaco referência.

Com a demonstração da ação contra formas promastigotas e com o índice de seletividade já demonstrados, partimos para avaliar qual a possível via de ação dos compostos sobre as formas promastigotas. Sabidamente, fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose induzem a morte do parasito por apoptose (Vincent *et al*,

2013) e desta forma avaliamos se nossos compostos induziriam a morte do parasito por apoptose, e para tanto, avaliamos a expressão da fosfatidilserina, que é um marcador de morte celular por apoptose. Em nossos ensaios, os compostos nitroheterocíclicos induziram a externalização da fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. L. infantum* após 48 horas de tratamento, e o resultado mostrou que o composto BSF-H, na concentração de 100 μ M, apresentou 71,2% de células marcadas com anexina V e iodeto de propídeo, em comparação com a anfotericina B, que apresentou 62,3% de células marcadas em 100 μ M. Esta dupla marcação indica a fase tardia da apoptose (Kulkarni, *et al*, 2009). Este resultado sugere que a permeabilidade da membrana plasmática está alterada quando formas promastigotas de *L. L. infantum* são incubadas com os compostos nitroheterocíclicos, permitindo a internalização e ligação do iodeto de propídeo para corar ácidos nucleicos.

O mecanismo da toxicidade da anfotericina B, assim como o seu mecanismo de ação, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular da célula mamífera do hospedeiro e do parasito, alterando a permeabilidade seletiva à cátions e levando à morte celular (Cohen, 1998). A anfotericina B interfere na síntese do ergosterol, que é um importante componente da membrana (Dogra & Saxena, 1996). Nos nossos experimentos, a anfotericina B também induziu a morte de promastigotas por apoptose, baseando-se na externalização da fosfatidilserina na membrana da célula, semelhante ao que observamos com a série de compostos derivados nitroheterocíclicos. Apesar de não sabermos e não determinados o mecanismo de ação dos compostos sobre a *Leishmania*, certamente os compostos induzem a morte do parasito por apoptose semelhante ao que observamos com anfotericina B (Saha, 2006). O mecanismo de ação pelo qual os compostos agem sobre o parasito não está bem elucidado, porém é sabido que o grupo nitro presente na série BSF possui ação parasitária, quando se liga aos anéis

furânicos, tiofênicos ou imidazólicos no carbono, agindo por bio-redução do grupo nitro (Arguello *et al*, 2006). A forma como estes compostos agem no parasito não está determinada. A partir dos dados que obtivemos, e sabendo que a tripanotona redutase é um mecanismo importante de defesa do parasito contra efeitos tóxicos das espécies reativas derivadas de nitrogênio e oxigênio, a qual tem seu metabolismo inibido pelos compostos derivados nitroheterocíclicos, supomos que os parasitos ficam mais susceptíveis à ação das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Comparando *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. major*, e *L. braziliensis*, os autores observaram que *L. amazonensis* era menos sensível a ação do SNAP (S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina) do que as outras espécies e ainda observaram que *L. amazonensis* apresentava níveis mais elevados de glutathione (Romão *et al*, 2006). Esses dados confirmam o papel da glutathione na sobrevivência do parasito. Após observarmos a ação dos compostos sobre formas promastigotas e encontramos um índice de seletividade elevado dos compostos (13 e 18 vezes mais seletivo) para o parasito, partimos para avaliar a toxicidade dos mesmos sobre amastigotas intracelulares e sobre células infectadas.

Como modelo experimental, *in vitro*, utilizamos células THP-1 e definimos que a melhor condição de infecção das células seria a utilização da concentração de 10 parasitos para cada célula. Os nossos resultados mostram que o índice de infecção das células diminuiu quando estas foram incubadas com os compostos, principalmente com BSF-Cl e BSF-NO₂. Esta redução da porcentagem de células infectadas e de números de parasitos intracelulares foi semelhante ao que observamos com anfotericina B. Sendo assim, os nossos compostos, que apresentaram ação contra promastigotas, também apresentam ação contra amastigotas intracelulares, ratificando a ideia de que os mesmos são potenciais candidatos a fármacos contra *Leishmania*. Um ponto interessante foi quando avaliamos a toxicidade dos compostos nas células THP-1 infectadas com *L. L.*

infantum e observamos que as mesmas eram mais resistentes a ação dos compostos, isto é a toxicidade foi menor quando comparamos com células não infectadas. Este resultado pode ser decorrente de que os compostos apresentam maior seletividade contra os parasitos. O mecanismo pelo qual os compostos eram ativos contra formas amastigotas intracelulares não está claro, podendo ser por ação direta sobre o parasito inibindo a tripanotiona redutase, o que deixaria o parasito susceptível a ação dos radicais catiônicos, ou ainda por ação indireta, induzindo a maior produção de oxido nítrico pela célula hospedeira. Com o objetivo de determinar este ponto, avaliamos a produção de NO e observamos maior produção de NO pelas células quando incubadas com os compostos. Este ponto reforça a hipótese de que o aumento da produção de NO, associada à inibição de tripanotiona redutase do parasito, torna-o mais susceptível a ação de radicais catiônicos e com consequente maior morte. Ao avaliarmos a produção de NO por células THP-1 sem infecção, não observamos produção de NO. Esses nossos achados sugerem que provavelmente as células em repouso não produzam NO por não haver uma situação de stress que induziria a produção de NO, com o objetivo de eliminar um provável agente externo à célula. Uma hipótese é que os compostos do grupo BSF poderiam funcionar como um doador de NO, em uma situação de stress celular, como ocorreu com as células infectadas com *L. L. infantum* em nosso experimento.

Com os resultados obtidos neste projeto, havendo atividade dos compostos sobre formas promastigotas, induzindo a morte por apoptose a ação contra amastigotas intracelulares e induzindo aumento da produção de NO pelas células infectadas, hipotetizamos que os compostos da série BSF derivados nitroheterociclicos sintéticos poderiam agir por dois caminhos: inibição do mecanismo de defesa do amastigota, por

inibição da tripanotona redutase e ainda potencializando a produção de óxido nítrico pelas células infectadas levando a morte do parasito intracelular.

Por fim, nossos resultados indicam que os compostos da série BSF se mostram candidatos promissores para estudos da atividade anti-*Leishmania*, e que dentre os cinco compostos estudados, os compostos BSF-Cl e BSF-NO₂ se mostraram candidatos potenciais para estudos futuros in vivo.

7 - CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- No estudo dos cinco compostos da série BSF, os compostos mostraram potencial atividade anti-*Leishmania*, e dentre a série BSF, os compostos BSF-Cl e BSF-NO₂ mostraram atividade anti-*Leishmania* promissores.
- A anfotericina B se mostrou mais ativa em formas promastigotas de *L. L. Infantum*, porém mais citotóxica em relação aos demais compostos.
- Na avaliação da citotoxicidade celular, os compostos se mostraram menos agressivos à célula hospedeira, porém, em células íntegras, não mostrou produção de NO. Da série estudada, os compostos BSF-Cl, BSF-H e BSF-NO₂ se mostraram com baixa toxicidade em relação aos demais compostos e em relação à anfotericina B.
- Na infecção, foi observado baixa proliferação intracelular nos macrófagos infectados e incubados com a série BSF, e o composto BSF-Cl se mostrou mais ativo em relação aos demais compostos e à anfotericina B.
- Os compostos apresentaram alta produção de NO, quando comparados com a anfotericina B e controles. Sugere-se que os compostos atuem diretamente no amastigota intracelular e indiretamente na célula, potencializando a produção de NO. Dos compostos estudados, o composto BSF-NO₂ e BSF-Cl apresentaram maior produção de NO.
- Os compostos BSF-Cl e BSF-NO₂ são potenciais compostos candidatos para o estudo de atividade anti-*Leishmania*.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABC - ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. Doenças Negligenciadas. Rio de Janeiro: Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudo estratégicos. 2010, p. 56.
- Aguirre G, Bioani M, Cerecetto H, di Maio R, Gonzáles M, Porcal W, Denicola A, Piro OE, castellano EE, Sant'Anna CMR, Barrero EJ. New potent 5-substitute benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: quantitative structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem*. 2005 Dec 1;13(23):6336-46.
- Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chem*. 2005; 49: 3274–3280.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *PLoSOne*. 2012; 7(5): e35671.
- Amato VS, Padilha ARS, Nicodemo AC, Duarte MIS, Valentini M, Uip DE, Boulos M, Amato VN. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. *Int. J. Infect. Dis*. 2000; 4(3): 153-57.
- Argüello MLPM, Silva GM, Stradiotto NR. Electroreduction of benznidazole in dimethylsulfoxide. *J Electrochem Soc*. 2001; 148(2): D1-D3.
- Argüello J, *et al*. "Nitro radical anion formation from nitrofuryl substituted 1, 4-dihydropyridine derivatives in mixed and non-aqueous media." *Bioelectrochemistry* 69.1 (2006): 104-112.
- Ashford RW, Bates PA. *Leishmaniasis in the world*. In: FEG Cox, JP Kreier and D Wakeli (eds). Microbiology and Microbial Infection. Oxford University Press, New York, pp. 215, 1998.
- Ayesh BM, Abed AA, Faris DM. *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. *BMC Res Notes*. 2014 Sep 7;7:612.
- Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis*. 1986 Dec; 154(6): 1003-11.
- Barton CH, Pahl M, Vaziri ND. Renal magnesium wasting associated with Amphotericin B therapy. *Am. J. Med*. 1984 Sep;77(3):471-4.
- Bates PA. Transmission of *leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106.

BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista – Tratamento da LTA. 2006; Fev 3(26).

Berman JD. *Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years.* *Clin. Infec. Dis.* 1997 Apr;24(4):684-703.

Berman JD, Badaró R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidsin R, Kuzoe F, Pang J, Weerasurya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ.* 1998; 76(1):25-32.

Blumenstiel K, Schöneck R, Yardley V, Croft SL, Kraft-Siegel RL. Nitrofurantoin drugs as common substrate substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dihydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem Pharmacol.* 1999 Dec 1;58(11):1791-9.

Carvalho AS, Silva EF, Santa-Rita RM, Castro SL, Fraga CAM. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiazole-2-arylhydrazones derivatives, designed as non-mutagenic meglumine analogues. *Bioorg Med Chem.* 2004 Dec 20;14(24):5967-70.

Chamas CI. *Saúde, Inovação e Propriedade Intelectual.* Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Junho, 2009

Cohen BE. *Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels.* *Int J Pharm.* 1998; 162:95-106.

Craig PN. Interdependence between physical parameters and selection of substituent group for correlation studies. *J Med Chem.* 1971 Aug;14(8):680-4.

Craven PC, Gremillion DH. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 May;27(5):868-71.

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

Cronin MTD, Schultz TW. Pitfalls in QSAR. *J Mol Struct (Theo Chem).* 2003; 622:39-51.

Cronin, Mark TD. "Quantitative structure–activity relationships (QSARs)—applications and methodology." *Recent Advances in QSAR Studies.* Springer Netherlands, 2010. 3-11.

Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(1):3-24.

Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Feb 14;182(3):1155-9.

- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi GJr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000 Apr;16(4):142-4.
- Davidson RN, di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, Scotti S, Cascio A, Castagnola E, Marsto A, Gramiccia M, diCaprio D, Wilkinson RJ, Bryceson AD. Short course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis*. 1996 Jun;22(6):938-43
- Deane LM, Grimaldi GJr. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang and Bray (eds) Leishmaniasis. *Elsevier Science Publisher*. Pp. 247, 1985.
- Demichelli C, Frézard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Apr 15;1570(3):192-8.
- Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep;2(9):692.
- Dietze R, Milan EP, Berman JD, Groge M, Falqueto A, Feitosa TF, Luz KG, Suassuna FA, Marinho LA, Ksionski G. Treatment of Brazilian kala-zar with a short course of amphotericin B cholesterol dispersion). *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):981-6.
- Dodd MC, Stillman WB. The *in vivo* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Bethesda 1944; 82(1):11-18.
- Dogra J, Saxena VN. Itraconazole and leishmaniasis: a randomized doubleblind trial in cutaneous disease. *Int J Parasitol*. 1996; 26(12):1413-1315.
- Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1988 Oct;18(10):1587-92.
- DNDi - Drugs for Neglect Diseases Initiative. Relatório Anual: América Latina. 2012.
- dos Santos MG, Muxel SM, Zampieri RA, Pomorski TG, Floeter-Winter LM. Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. *PLoS One*. 2013;8(1):e55604. doi: 10.1371/journal.pone.0055604.
- Dumas C, Oullette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulos B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J*. 1997 May 15;16(10):2590-8.
- Edwards DI. Nitroimidazoles drugs – action and resistance mechanisms II. Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1993 Feb;31(2):201-10.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:695-729.

Ferreira CS, Martins PS, Demichelli C, Brochu C, Outelle M, Frézard F. *Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cystenyl-glycine, cysteine and glutathione*. *Biometals*. 2003 Sep; 16(4):441-6.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Braz J Pharm Sci*. 2006; 42(2):167-94.

Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Mar;45(3):913-6.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992 Oct;22(10):2501-6.

Gerbaud E, Tamion F, Girault C, Clabault K, Leprete S, Leroy J, Bonmarchand G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional Amphotericin B to liposomal Amphotericin B (AmBisome). *J Antimicrob Chemother*. 2003 Feb;51(2):473-5.

Gold N, Stout HA, Pagano JF, Donovan R. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. I. *In vitro* studies. *Antibiot Annu*. 1955-1956;3:579-86.

Gontijo CMF, Melo MN. *Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects*. *Rev Bras Epidemiol*. 2004; 7(3):338-49.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. *Int J Parasitol*. 2003 Sep 15;33(10):1027-34

Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Apr;37(4):615-23

Grimaldi G Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 41(6):687-725.

Grimaldi G Jr., Tesh RB. *Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research*. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Jul; 6(3):230-50.

Grover M, Singh B, Bakshi M, Singh S. Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research – Part 1. *Pharm Sci Tech Today*. 2000;3(1):28-35.

Hansch, C., Leo, A., and D. J. Livingstone. "Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 56.1 (1996): 78.

Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosenberg I, Pereira M, Sela M, Cerami A. "Subservice" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc Nat Acad Sci. USA* 1988; 85:5374-78.

Herlich P, Schweigel M. *Nitrofurans, a group of synthetic antibiotics with a new mode of action: discrimination of specific messenger RNA classes.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976 Oct;73(10):3386-90.

Jha PK. Study of gonococcal infection groups of selected female population. *Indian J Dermatol.* 1983 Oct;28(4):165-6.

Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India.* 1991 Apr;39(4):314-6.

Jain, Surendra K., et al. "A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line." *Journal of visualized experiments: JoVE* 70 (2012).

Jockers-Scherübel MC, Schimer RH, Krauth-Siegel RL. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur J Biochem.* 1989; 180:267-72.

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

Katzung BG. *Farmacologia Básica e Clínica*, cap. 52, 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 757, 2001.

Kaur H, Seifert K, Hawkes GE, Coumbarides GS, Alvar J, Croft SL. Chemical and Bioassay Techniques to Authenticate Quality of the Anti-Leishmanial Drug Miltefosine. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Apr 20. pii: 14-0586.

Korolkovas A, Burkhalter JH. *Química Farmacêutica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 65, 542, 544, 1988

Kovacic, P., Ames, J. R., Rector, D. L., Jawdosiuk, M., Ryan, M. D., Reduction Potentials of Anthelmintic Drugs: Possible Relationship to Activity, *Free Rad. Biol. & Med.*, vol. 6, p. 131-139, 1989.

Krauth-Siegel RL, Schöneck R. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J.* 1995; 9:1138-46.

Krauth-Siegel RL, Inhoff O. Parasite specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasit Res.* 2003; 90(2):577-585.

Krauth-Siegel RL, Bauer H, Schiner HR. *Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and Malária – Causing plasmodia. Angew Chem Int.* 2005; 44:690-715.

Kubiny H. QSAR: Hansch analysis and related approaches. 1 ed, VHC, Weinheim, Germany, p.1-75. 1993.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.* 2009 Jun 5;284(23):15496-504.

Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. *In vitro* susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob Agents Chem.* 2009; 53:835–838.

Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012 Aug; 3:251.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo,* 2009;51(5):247-53.

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, Sacks D. Evidence that the high incident of treatment failures in Indian kala-azar is due to emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):564-7.

Lucero E, Collin SM, Gomes S, Akter F, Asad A, Kumar Das A, Ritmeijer K. Effectiveness and Safety of Short Course Liposomal Amphotericin B (AmBisome) as First Line Treatment for Visceral Leishmaniasis in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Apr 2;9(4):e0003699

Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania Braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today.* 1981;1(5):129-133.

Mbongo N, Loiseau PM, Bollion MA, Robert-Gero M. Mechanism of anphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(2):352-357.

Mesquita JT, Tempone AG, Reimao JQ. Combination therapy with nitazoxanide and Amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Trop.* 2013; 130:112-116.

Mora-Duarte J, Behs R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinaca R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):2020-9.

Morais TR, da Costa-Silva TA, Tempone AG, Borborema SE, Scotii MT, de Souza RM, Araújo AC, de Oliveira A, de Morais SA, Sartorelli P, Lago JH. *Antiparasitic*

activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure/Activity Relationships. *Molecules*. 2014 May 5;19(5):5761-76.

Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MS - Manual de Leishmaniose Visceral Grave – Normas e Condutas. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF. p. 20-25. 2004.

MS/Brasil - Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção *Leishmania*-HIV, 2004.

Mukhopadhyay R, Dey S, Gage D, Lighbody J, Ouellette M, rosen BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Sep 17;93(19):10383-7.

Mueller M, Ritmeijer K, Balasegaram M, Koummuki Y, Santana MR, Davidson R. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kala-azar. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 2007; 10: 19–24.

NED/ASCOM/FUNASA. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Único: 62, 2000.

Nucci M, Loureiro M, Silveira F, Casall AR, Bouzas LF, Velasco E, Spector N, Pulcheri W. Comparison of the toxicity of anphotericin B in 5% dextrose with that of anphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jun;43(6):1445-8

Nylén S, Sack D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trend Immunol*. 2007; 28:378-84.

Oliveira RB, Zani CL, Ferreira RS, Leite RS,Alves TMA. Ação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima Tripanotiona redutase. *Quím Nov*. 2008; 31(2):261-67.

Palace-Berl F, Jorge SD, Pasqualoto KF, Ferreira AK, Maria DA, Zorzi RR, de Sá Bortolozzo L, Lindoso JA, Tavares LC. 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. *Bioorg Med Chem*. 2013 Sep 1;21(17):5395-406.

Pedrique B, Strub-Wourgaft N, Some C, Oliaro P, Troullier P, Ford N, Pécoul B, Bradol JH. *The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment*. *Lancet Glob Health*. 2013 Dec;1(6):e371-9.

Peters NC,Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008 Aug 15;321(5891):970-4

Raether W, Hänel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res.* 2003 Jun;90 Supp 1:S19-39.

Ramos H, Saint-Pierre-Chazalet M, Bolard J, Cohen BE. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania Mexicana* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 May;38(5):1079-84.

Rando DC, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQF, do Amaral AT, Ferreira EI, Tavares LC. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid {(5-nitro-thiopen-2-yl)-methyne}-hydrazide series. *Bioorg Med Chem.* 2002 Mar;10(3):557-60

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal DC, Andrade HF Jr., Tempone AG. *Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art.* *Quim Nov.* 2003 Aug;26(4):550-5.

Reece SE, Pollitt LC, Colegrave N, Gardner A. The meaning of death: evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 2011 Dec;7(12):e1002320.

Ribeiro AI, Drummond JB, Volpini AC, Andrade AC, Passos VM. Electrocardiographic changes during low-dose, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Mar;32(3):297-301.

Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, Andrade PH, Martins VT, Costa LE, Arruda AL, Faraco AA, Coelho EA, Castilho RO. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp Parasitol.* 2014 Aug;143:60-8

Robinson RF, Nahata MC. A comparative review of conventional and lipid formulations of Amphotericin B. *J Clin Pharm Ther.* 1999 Aug;24(4):249-57.

Romão PR, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. *Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of Leishmania spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity.* *Braz J Med Biol Res.* 2006 Mar;39(3):355-63.

Romão PRT. *Leishmaniasis: immune response and antioxidants mechanisms of evasion.* *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde, América do Norte*, 3, dez. 2008. Disponível em: <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/view/2/1>. Acesso em: 12 Mai. 2015

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984 Mar 30;223(4643):1417-9.

Sacks DL, Hienym S, Shier A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stage of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol.* 1985 Jul;135(1):564-9.

Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res.* 2006 Mar;123(3):233-44.

Schöffski P, Freund M, Wunder R, Petersen D, Köhne CH, Hecker H, Schubert U, Ganser A. *Safety and toxicity of Amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomized study.* *BMJ.* 1998 Aug 8;317(7155):379-84

Sereno D, Holzmüller P, Lemestre JL. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistance amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 2000 Jan 5;74(1):25-31.

SES - Secretaria Estadual de Saúde: Centro de Vigilância Epidemiológica. A *Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Situação Atual.* Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa6_lva.htm. Acessado em 31 de janeiro de 2014.

Sesana AM, Monti-Rocha R, Vinhas SA, Morais CG, Dietze R, Lemos EM. *In vitro* activity of amphotericin B conidia against *Leishmania chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Mar;106(2):251-3.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Aug;101(5):577-9.

Silva AAS, Morais SM, Falcão MJC, Vieira IG, Ribeiro LM, Viana SM, Teixeira MJ, Barreto FS, Carvalho CA, Cardoso RP, Andrade-Junior HF. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*. *Phytomedicine.* 2014 Sep 25;21(11):1419-23

Stenger S, Donhauser N, Thüning H, Rölinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1501-14.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. *Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases.* *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1301-10.

Sundar S, Agrawal NK, Sinha PR, Horwith GS, Murray HW. Short-course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Ann Intern Med.* 1997 Jul 15;127(2):133-7

Sundar S, Singh A, Chakravarty J, Rai M. Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Scientific World Journal.* 2015;2015:414378. Epub 2015 Jan 1.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986 Nov 6;93(2):157-65.

Tavares LC, Cristé JJ, Santos MGB, Penna TCV. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II. *Boll Chim Farm.* 1999 Sep;138(8):432-6

Tavares LC. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quim Nov.* São Paulo. 2004; 27(4):631-39.

Tavares LC, Ferreira EI. Relações quantitativas estrutura-atividade. Cap. 8. Inc: Práticas de Química Farmacêutica y Medicinal; Eds Prado MAF, Barreiro EJ. 2ª Ed. Ed. Cyted – Programa Íbero Americano de Ciência y Tecnología para el desarrollo, Pamplona, pg 37-68. 2006.

Thakur CP, kumar M, Pandey AK. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am J Trop med Hyg.* 1991; 45(4):435-41.

TDR Strategies. TDR Strategies Direction: Leishmaniasis. WHO. Acess: www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf. Acessado em 23 de janeiro de 2015.

Tempone AG, Borborema SE, de Andrade HF Jr, de Amorein Gualda NC, Yogi A, Carvalho CS, Bachiega D, Lupo FN, Bonotto SV, Fischer DC. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine.* 2005 May;12(5):382-90

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* 2011 Apr;77(6):572-85.

Tocher JH. Reductive action of nitroheterocyclic Compounds. *Gen Pharmacol.* 1997 Apr;28(4):485-7..

Trouiller P, Oliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* 2002 Jun 22;359(9324):2188-94

Turco SJ, Dexcoteaux A. The lipophosphoglycan os *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol Today.* 1993 Dec;9(12):468-71.

Urbina Ja. *Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments.* *Cur Opinions Inf Dis.* 2001; 14(6):733-41.

Vakil NH, Fujinami N, Shah PJ. *Pharmacotherapy for Leishmaniasis in the United States: Focus on Miltefosine.* *Pharmacotherapy.* 2015 May 4. doi: 10.1002/phar.1585

Vandepitte J, Wachtel JL, Stiller ET. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot Ann.* 1956; (1955-56):587-91.

Viodé C, Bettache N, Cenas N, Krauth-Siegel RL, Chauvière G, Bakalara N, Périé J. Ezimatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* 1999 Mar 1;57(5):549-57.

Vincent IM, Weidt S, Rivas L, Burgess K, Smith TK, Ouellette M. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2013 Dec 5;4(1):20-7.

Volkhard A, Sjöström M, Eriksson L, Hall LH, Han W van de, Costantino G, Clementi S, Cruciani G, Valigi R. Experimental design in synthesis planning and structure-property correlations. *In Chem Methods Mol Design*. (1995): 49-112.

Wei XQ. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 Jun 1;375(6530):408-11.

Walsh TJ, Hiemenz JW, Seibel NL, Perfet JR, Horwith G, Lee L, Silber JL, di Nubite MJ, Reboli A, Bow E, Lister J, Anaisse EJ. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis*. 1998 Jun;26(6):1383-96.

Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D, Pappas P, Seibel N, Greenberg RN, Dummer S, Schuster M, Holcenberg JS. *Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med*. 1999 Mar 11;340(10):764-71.

Werneck GL. *Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil*. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 26(4):644-645. Abril, 2010.

Wilson E, Thorson L, Speert DP. Enhancement of macrophage superoxide anion production by Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 May;35(5):796-800.

WHO. World Health Organization. Adhoc Committee (of the WHO) on health research relating to future intervention options. Investing in health research and development. Geneva, 1996.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Technical report series 949. 2010.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004 Sep; 279(38):39925-32.

Yeşilova Y, Turan E, Altın Sürücü H, Aksoy M, Özbilgin A. *Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B; a case of unresponsive to pentavalent antimony therapy*. *Turkiye Parazitol Derg*. 2015 Mar;39(1):63-5.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LIA, Oliveira MAP de, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SRP. *In vitro* sensitivity of *Leishmania*

(Viannia) braziliensis and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health*. 2010; 15(1):68-76.

9 - ANEXOS