UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ÉRIKA GRACIELLE PINTO

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS E COMPOSTOS
SINTÉTICOS, LIVRES OU INCLUÍDOS EM NANOLIPOSSOMOS: UMA
ABORDAGEM *IN VITRO* E EXPERIMENTAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo
Tempone Cardoso

São Paulo

2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Érika Gracielle

Estudo do potencial terapêutico de fármacos e compostos sintéticos, livres ou incluídos em nanolipossomos : uma abordagem in vitro e experimental na leishmaniose visceral / Érika Gracielle Pinto. – São Paulo, 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. LEISHMANIA. 3. FÁRMACOS. 4. LIPOSSOMOS. 5. TERAPÊUTICA.

USP/IMTSP/BIB-01/2016.

A meus pais: Rui e Sônia e ao meu irmão: Luiz Afonso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Profº Drº **André Gustavo Tempone**, obrigado pela orientação, pela confiança e principalmente por acreditar no meu potencial. Agradeço também as conversas não acadêmicas (pessoais) e todos os conselhos dados durante estes anos de trabalho.

Ao **Programa de Pós Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** e a **Universidade de São Paulo**, obrigada pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Ao **Instituto Adolfo Lutz**, obrigada pela disponibilização da infraestrutura.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, obrigada pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP número 2011/23703-1) bem como pela concessão da Bolsa BEPE (Processo FAPESP número 2014/10843-8).

A banca de qualificação: Profª Drª **Carlota Rangel Yagui**, Profª Drª **Clara Lúcia Barbiéri** e Profª Drª **Thelma Okay**. Obrigada pelas valiosas contribuições durante a qualificação.

Aos professores colaboradores Profº Drº **Leandro Barbosa** (IF-USP) e Profº Drº **Renato Mortara** (BC-Unifesp) obrigada pelo empenho durante a colaboração.

Aos técnicos do laboratório de Toxinologia Aplicada: **Matília** e **Vicente**, obrigada por todo o suporte prestado dia a dia no laboratório.

As amigas do Laboratório de Toxinologia Aplicada: **Daiane, Daniela, Juliana, Lígia, Marta, Sônia, Tatiana** e **Thaís**. Obrigada pelo convívio com pessoas tão especiais e únicas como vocês, obrigada pela ajuda diária no laboratório, obrigada pelos momentos de descontração e obrigada pelas palavras amigas. Sentirei a falta de vocês. Em especial obrigada às amigas **Daniela, Jaqueline** e **Lígia** por me acompanharem aos finais de semana de tratamento animal, sem reclamarem e com aquele carinho especial para ajudar a cuidar dos hamsters.

Aos funcionários da seção de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, vulgo nossos vizinhos, obrigado pelos momentos de descontração bem como toda solidariedade prestada ao longo destes anos. Obrigada **Ricardo** por sempre esperar os meus intermináveis “cinco minutinhos” para devolver as chaves.

As meninas que dividem o apartamento comigo: **Jaqueline Polizeli** e **Denise Kimura**, muito obrigada por todas as conversas, todos os jantares, toda a rotina. Obrigado por estarem comigo nessa.

Aos meus queridos amigos que São Paulo e o Instituto Butantan me brindaram: **Adriana, Adriano, Beatriz, Bianca, Bruna, Juninho, Louise, Luciano, Mauro, Peter, Podé, Rapozão** e **Tati**. Obrigada por todos os cafés, pelas intermináveis conversas científicas, por todas as conversas não científicas, por todas as festas e por todas as cervejinhas. Obrigado por estarem sempre presentes, nossa vila é mais que uma família.

A toda minha família que sempre torceu pelo meu sucesso, em especial aos meus avós: **Maria, Antonieta, Leonor** e **Raynaldo**. Obrigado pelo amor e pelo suporte.

Ao meu irmão, **Luiz Afonso**, obrigada por se mostrar tão amigo, sempre pronto a ouvir e disposto a ajudar de todas as formas possíveis (inclusive as financeiras). Obrigada por acreditar em mim e por ser o melhor irmão! Você esta comigo nessa!

Aos meus pais, **Rui** e **Sônia**. Não teria palavras para expressar o quanto sou grata por serem meus pais. Vocês me depositaram confiança, me deram apoio e acreditaram em meu sucesso profissional. Sem vocês eu nada seria. Obrigada por tudo, sempre!

I would like to thank the DMPK team from DDU – University of Dundee for the opportunity, the learning, the help and the socialization day-by-day. Especially, I would like to thank my supervisor Dr. **Kevin Read**, as well as the researchers: **Maria Osuna-Cabello, Yoko Shishikura, Paul Scullion, Lasté Stojanovski, Fred Simeons** and **Liam Ferguson**. It was a great pleasure working with you. Thanks for

motivating me with the hard work, for the coffee times and the unforeseen that appeared during my time in Dundee. I will never forget. Thank you for all.

Agradeço a Deus e todas as forças espirituais que sempre sopraram para o melhor caminho.

Gostaria de agradecer em especial a todos os animais que foram sacrificados durante a realização desta tese. Sem eles, nada disso teria sido possível.

E a todos aqueles que passaram de alguma forma ou por algum período pela minha vida. Obrigado por me ajudarem a ser quem eu hoje sou!

*“Não é que vivo em eterna mutação, com novas adaptações a meu renovado viver
e nunca chego ao fim de cada um dos modos de existir. Vivo de esboços não
acabados e vacilantes. Mas equilibro-me como posso, entre mim e eu, entre mim e
os homens, entre mim e o Deus.”*

Clarice Lispector

RESUMO

Pinto EG. Estudo do potencial terapêutico de fármacos e compostos sintéticos, livres ou incluídos em lipossomos: uma abordagem *in vitro* e experimental na leishmaniose visceral (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Incluída dentre as doenças tropicais negligenciadas (DTNs), a leishmaniose se apresenta como um complexo de doenças de variados graus de gravidade, ocasionando desde uma lesão cutânea a uma progressiva infecção visceral fatal. O desenvolvimento de novas terapias é imprescindível, devido ao limitado e complexo arsenal terapêutico. Sendo assim, o presente projeto realizou o estudo *in vitro* e experimental em modelo de hamster infectado com *L. (Leishmania) infantum* de novas terapias para a leishmaniose visceral, utilizando três abordagens: i) reposicionamento de fármacos em uso na clínica para o tratamento de outras patologias; ii) sistemas de liberação controlada e sustentada de fármacos como os lipossomos e iii) avaliação de análogos sintéticos de naftoquinonas, bem como, análogos sintéticos de quelantes de ferro. O fármaco nitazoxanida (NTZ) foi amplamente estudado, apresentando atividade anti-*Leishmania* contra amastigotas intracelulares e um índice de seletividade (IS) de 2,5. Quando avaliado em modelo experimental, foi incapaz de reduzir a densidade parasitária no baço e fígado na forma livre, porém a encapsulação em lipossomos (NTZ-LP) conferiu maior direcionamento, resultando em uma eficácia de 50 e 82% no baço e fígado, respectivamente. A captação, *in vitro*, da NTZ-LP também foi avaliada em macrófagos saudáveis e infectados demonstrando uma ampla distribuição no citoplasma de ambos os grupos. Os parâmetros físico-químicos avaliados da NTZ-LP demonstraram uma formulação unilamelar, negativa com diâmetro inferior a 200nm. Estudos farmacocinéticos em modelo murino da NTZ e NTZ-LP demonstraram uma meia vida plasmática ($T_{1/2}$) similar para ambas às formulações (6,5 minutos para NTZ e 8,7 minutos para NTZ-LP), porém tanto a exposição (AUC) e concentração plasmática máxima (C_{max}) resultaram em valores quatro vezes maiores para os lipossomos, justificando a eficácia da formulação no estudo pré-clínico. Foi realizada ainda a triagem de 10 fármacos antihistamínicos, porém somente a cinarizina apresentou atividade no amastigota intracelular. O estudo experimental demonstrou que o fármaco foi incapaz de reduzir a densidade parasitária tanto no baço como no fígado dos animais, porém quando encapsulado em lipossomos foi observada uma eficácia de 54% apenas no fígado. Outros dois fármacos estudados apresentaram atividade anti-*Leishmania*, a amiodarona (anti-arritmico) e a sertralina (anti-depressivo). Apesar de a amiodarona ter apresentado potente atividade contra os amastigotas, com Concentração Efetiva 50% (CE_{50}) de 0,5 μ M e um elevado IS de 56, não demonstrou atividade tanto no baço como no fígado no modelo experimental. Sertralina foi o fármaco mais promissor do trabalho, apresentando uma CE_{50} de 1,8 μ M e IS de 10, alcançando níveis de tratamento de 58% no baço e 87% no fígado dos animais. Novos compostos sintéticos também foram estudados. Dentre os 36 compostos análogos sintéticos de naftoquinonas, 14 demonstraram atividade contra as formas amastigotas intracelulares, destacando cinco compostos com IS >5. Ainda, os compostos sintéticos, quelantes de ferro, não foram capazes de eliminar o amastigota intracelular. O projeto teve como objetivo primordial a obtenção de um novo candidato a fármaco, livre ou encapsulado em lipossomos, que pudesse contribuir com novas perspectivas para estudos de novas terapias para a leishmaniose visceral.

Descritores: Leishmaniose visceral. *Leishmania*. Fármacos. Lipossomos.
Terapêutica.

ABSTRACT

Pinto EG. Studies towards the therapeutic potential of drugs and synthetic compounds free or loaded into liposomes: an *in vitro* and experimental approach against visceral leishmaniasis (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Included among the neglected tropical diseases (NTDs), leishmaniasis present itself as a complex of varying degrees of serious diseases, resulting from a skin lesion to a progressive fatal visceral infection. The development of new therapies is essential, due to the limited and complex therapeutic arsenal. Thus, this project conducted the *in vitro* and *in vivo* studies using infected hamsters with *L. (L.) infantum* for new therapies against visceral leishmaniasis, using the three following approaches: i) drug repurposing; ii) controlled and sustained systems for drug delivery, such as liposomes, and iii) synthetic analogs of naphthoquinones, as well as, analogs of synthetic iron chelators. The nitazoxanide drug (NTZ) has been studied extensively, showing anti-*Leishmania* activity against intracellular amastigotes and selectivity index (SI) of 2.5. When it was evaluated in an experimental model, was unable to reduce the parasite burden in the spleen and liver in free form. However, when was encapsulated in liposomes (NTZ-LP), it has conferred higher direction, resulting in an efficiency of 50 to 82% in the spleen and liver, respectively. The *in vitro* uptake of NTZ-LP was evaluated in healthy and infected macrophages demonstrating a broad distribution in the cytoplasm of both groups. The NTZ-LP physical-chemical parameters were evaluated and showed a unilamellar formulation, negative and with diameter lower than 200nm. Pharmacokinetics studies in the murine model with NTZ and NTZ-LP showed a half-life ($T_{1/2}$) similar for both formulations (6.5 minutes to NTZ and 8.7 minutes to NTZ-LP). However, the exposure (AUC) and maximum plasma concentration (C_{max}), resulted, for the liposomes values, four times higher, which justify the efficacy of liposomal formulation in preclinical study. Additionally, 10 antihistamines drugs were evaluated, but only cinnarizine showed activity in the intracellular amastigotes. The experimental study showed that the drug was unable to reduce the parasite burden in both, spleen and liver infected animals. Nevertheless, when it was encapsulated in liposomes, a 54% efficacy, only, in the liver was observed. Other two drugs were studied relating *Leishmania* activity: amiodarone (antiarrhythmic) and sertraline (antidepressant). Although amiodarone have shown potent activity against amastigotes with Effective Concentration 50% (EC_{50}) of 0.5 μ M and a high SI of 56, no activity was seen in spleen and liver in the experimental model. On the other hand, sertraline was the most promising drug, showing an IC_{50} of 1.8 μ M and SI of 10, increasing the treatment levels of 58% in the spleen and 87% in the liver of the animals. Novel synthetic compounds were also studied. Among 36 synthetic analogues of naphthoquinones, 14 demonstrated activity against intracellular amastigotes, highlighting five compounds with $SI > 5$. Moreover, synthetic analogues of iron chelators were not able to eliminate intracellular amastigotes. The project had as its primary objective the attainment of a new drug candidate, free or encapsulated into liposomes, and it could contribute with new perspectives for studies towards novel therapies against visceral leishmaniasis.

Descriptors: Visceral leishmaniasis. *Leishmania*. Drugs. Liposomes. Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Manifestações clínicas das leishmanioses. a: leishmaniose cutânea; b: leishmaniose mucocutânea; c: leishmaniose visceral; d: leishmaniose dérmica pós-calazar ⁸	23
Figura 2 - Taxonomia da <i>Leishmania</i> ⁵	24
Figura 3 - Distribuição da leishmaniose visceral no mundo ⁸	25
Figura 4 - Formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> . Fonte: a: promastigotas (http://www.uzonlab.com/index_2.htm) e b: amastigotas (arquivo pessoal).....	26
Figura 5 - Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> (modificado) ¹⁶	27
Figura 6 - Distribuição espacial dos casos de LV no Brasil – 1983 à 1988, 1989 à 1994, 1995 à 2000 e 2001 à 2006 ¹¹	28
Figura 7 - Número de casos, óbitos e letalidade da LV no estado de São Paulo, durante o período de 1999 a 2012 ¹¹	29
Figura 8 - Classificação dos lipossomos por tamanho e número de lamelas.	36
Figura 9 - Características estruturais dos lipossomos ⁵¹	37
Figura 10 - Etapas para introdução de um fármaco no mercado ⁶⁵	44
Figura 11 - Novo modelo adotado para introdução de um fármaco no mercado para doenças negligenciadas ²	44
Figura 12 - Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do fármaco nitazoxanida em hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> (A: baço; B: fígado). NTZ foi administrada oralmente a 100 mg/kg/dia e a densidade parasitária determinada qPCR (*p<0,05).	69
Figura 13- Curva padrão da nitazoxanida, obtida em espectrofotômetro a 304 nm em NanoDrop-100.	70
Figura 14 - Captação da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais sadios e infectados com <i>L. (L.) infantum</i> , monitorados em espectrofluorímetro a cada 15 minutos (total de 360 minutos) utilizando filtros de excitação e emissão de 549 e 565 nm, respectivamente.....	72
Figura 15 - Macrófagos peritoneais sadios e infectados, corados por giemsa e observados por microscopia de luz. A: sadios; B: infectados com <i>L. (L.) infantum</i> ..	72
Figura 16 - Internalização da NTZ-LP-DIL por macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> , utilizando microscopia confocal. Os núcleos foram marcados na cor azul	

com DAPI, e a cor vermelha corresponde aos lipossomos (NTZ-LP-DIL). Setas brancas = proximidade dos lipossomos com os amastigotas.....73

Figura 17 - Curva de SAXS do sistema lipídico. Pontos pretos: presença do fármaco NTZ; linha vermelha: melhor ajuste obtido. No *inset* as curvas de espalhamento dos sistemas. Em preto e vermelho, ausência e presença do fármaco, respectivamente.74

Figura 18 - Avaliação da atividade *in vivo* da NTZ-LP em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). NTZ-LP foi administrada intraperitonealmente a 2 mg/kg e a densidade parasitária determinada qPCR (*p<0,05).....76

Figura 19 - Estudo farmacocinético da tizoxanida, metabolito ativo da NTZ, após administração intraperitoneal em dose única de NTZ e NTZ-LP a 2 mg/kg em fêmeas de BALB/c.77

Figura 20 - Estruturas químicas dos antagonistas de receptor H1 de histamina. 1. cetirizina; 2. cetotifeno; 3. cinarizina; 4. clorfeniramina; 5. fexofenadina; 6. flunarizina; 7. hidroxizina; 8. loratadina; 9. quetiapina; 10. risperidona. Fonte: PubmedCompound.....91

Figura 21 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco CNZ livre em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). A CNZ livre foi administrada a 50 mg/kg (i.p.), 100 mg/kg (v.o.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (*p<0,05).....92

Figura 22 - Curva padrão da cinarizina, obtida em espectrofotômetro a 251 nm em NanoDrop-100.93

Figura 23 - Avaliação da atividade *in vivo* da CNZ-LP em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). A CNZ-LP foi administrada a 3 mg/kg (i.p.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (*p<0,05).....93

Figura 24 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco amiodarona em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). AMD foi administrada a 50 mg/kg/dia (i.p.); 100 mg/kg/dia (v.o.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (*p<0,05).102

Figura 25 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco sertralina em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). SER foi administrada a 25 mg/kg/dia (i.p.); 50 mg/kg/dia (v.o.) e a densidade parasitária determinada qPCR (*p<0,05).....110

Figura 26 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco sertralina em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). SER foi administrada a 30; 60 mg/kg/dia (oral) e a densidade parasitária determinada qPCR (*p<0,05).....111

Figura 27 - Estruturas químicas dos compostos análogos sintéticos de naftoquinonas. Isa: naftoquinonas.	125
Figura 28 - Naftoquinona utilizada como protótipo na síntese dos 36 derivados de 2-hidroxi-3-fenilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinonas.	126
Figura 29 - Estruturas químicas dos compostos: cloroquina (a) e deferiprona (b).	132
Figura 30 - Estruturas químicas dos compostos sintéticos derivados do acoplamento da deferiprona com a cloroquina. a (X = Cl); b (X = H).	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade anti- <i>Leishmania infantum</i> e citotoxicidade da nitazoxanida. Valores de CE ₅₀ contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (macrófagos peritoneais) e o respectivo IS.	67
Tabela 2 - Atividade anti- <i>Leishmania donovani</i> e citotoxicidade da nitazoxanida e tizoxanida. Valores de CE ₅₀ contra as formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) donovani</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (THP-1) e os respectivos IS. Valores expressos em µM.	68
Tabela 3 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade da NTZ-LP. Valores de CE ₅₀ contra as formas amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (macrófagos peritoneais) e o respectivo IS. Valores expressos em µM.71	
Tabela 4 - Parâmetros de ajuste obtidos através da análise das curvas de SAXS..75	
Tabela 5 - Dados farmacocinéticos da NTZ livre e encapsulada em sistema lipossomal.....	77
Tabela 6 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade dos antagonistas de receptor H1 de histamina. Valores de CE ₅₀ contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e os respectivos IS. Valores expressos em µM.	89
Tabela 7 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade da amiodarona. Valores de CE ₅₀ contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e o respectivo IS. Valores expressos em µM.	101
Tabela 8 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade da sertralina. Valores de CE ₅₀ contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e o respectivo IS. Valores expressos em µM.	109
Tabela 9 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade dos análogos sintéticos de naftoquinonas. Valores de CE ₅₀ contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e os respectivos IS. Valores expressos em µM.	122
Tabela 10 - Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade da cloroquina, deferiprona e dos derivados sintéticos deste acoplamento. Valores de CE ₅₀ contra formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> , CC ₅₀ contra células de mamíferos (HL-60). Valores expressos em µM.	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET: administração, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

AMD: amiodarona

CC₅₀: concentração citotóxica 50%

CE₅₀: concentração efetiva 50%

C_{max}: concentração plasmática máxima

CNZ: cinarizina

CNZ-LP: cinarizina lipossomal

DFO: desferroxamina

DL₅₀: dose letal 50%

DLS: dispersão de luz dinâmica

DTN: Doenças Tropicais Negligenciadas

FDA: Food and Drug Administration

i.p.: via intraperitoneal

i.v.: via intravenosa

IC95%: intervalo de confiança 95%

IS: índice de seletividade

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutâneo Difusa

LCM: Leishmaniose Cutâneo Mucosa

LV: Leishmaniose Visceral

MS: Ministério da Saúde

na: não ativo

nd: não determinado

NTZ: nitazoxanida

NTZ-LP: nitazoxanida lipossomal

TZX: tizoxanida

NTZ-LP-DIL: nitazoxanida lipossomal fluorescente

PKPD: Farmacocinética e Farmacodinâmica

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAXS: espalhamento de raios X sob-baixo ângulo

SB³⁺: antimonial trivalente

SER: sertralina

SFM: Sistema Fagocítico Mononuclear

T. brucei: *Trypanossoma brucei*

T_{1/2}: Tempo de meia-vida plasmática

T_{max}: tempo máximo para atingir a C_{max}

UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas

v.o.: via oral

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Contextualização da doença	22
1.2 Contextualização dos fármacos disponíveis para terapêutica das leishmanioses	30
1.3 Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (P&D) para Leishmaniose.....	42
1.4 Estratégias para a triagem de fármacos	45
JUSTIFICATIVA.....	50
2 OBJETIVOS	51
2.1 Gerais	51
2.2 Específicos.....	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Reagentes e fármacos	53
3.2 Parasitas	53
3.3 Células de mamíferos	54
3.4 Animais de experimentação	54
3.5 Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	55
3.6 Determinação <i>in vitro</i> da Concentração Citotóxica 50% (CC ₅₀) frente a células de mamíferos e determinação do Índice de Seletividade (IS).....	56
3.7 Desenvolvimento de uma formulação lipossomal de nitazoxanida (NTZ-LP) e cinarizina (CNZ-LP).....	56
3.8 Avaliação espectrofluorimétrica <i>in vitro</i> da captação da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais saudáveis e infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	57
3.9 Avaliação <i>in vitro</i> da internalização da NTZ-LP-DIL por macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> através de microscopia confocal	58
3.10 Avaliação do diâmetro e carga dos lipossomos	59
3.11 Avaliação do número de lamelas dos lipossomos	59

3.12 Avaliação da efetividade dos fármacos em modelos experimentais <i>in vivo</i>	59
3.13 Construção da curva padrão de DNA	60
3.14 Transcrição de RNA para cDNA	60
3.14.1 qPCR	61
3.15 Estudos farmacocinéticos (<i>in vivo</i>)	62
3.16 Análises estatísticas	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
CAPÍTULO 1	65
4.1 TRIAGEM DE FÁRMACOS REPOSICIONADOS	65
4.1.1 Reposicionamento de Fármacos: Fluxograma de trabalho da NTZ	66
4.1.1.1 Determinação da CE ₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e CC ₅₀ em macrófagos peritoneais	67
4.1.1.2 Avaliação da efetividade da nitazoxanida em modelos experimentais	69
4.1.1.3 Estudo da NTZ lipossomal	69
4.1.1.4 Captação <i>in vitro</i> da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais sadios e infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	71
4.1.1.5 Avaliação do diâmetro, carga e número de lamelas dos lipossomos frente à NTZ-LP	74
4.1.1.6 Avaliação da efetividade da NTZ-LP em modelos experimentais	75
4.1.1.7 Estudos farmacocinéticos	76
4.1.1.2.1 DISCUSSÃO	78
4.1.2 Reposicionamento de Fármacos: Antagonistas de Receptor H1 de Histamina	88
4.1.2.1 Determinação da CE ₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e CC ₅₀ em células NCTC da farmacoteca de reposicionamento: antagonistas de receptor H1 de histamina	88
4.1.2.2 Avaliação da efetividade da cinarizina livre e lipossomal em modelos experimentais <i>in vivo</i>	91
4.1.2.2.1 DISCUSSÃO	94

4.1.3 Reposicionamento de Fármacos: Diversas classes terapêuticas	99
4.1.3.1 Reposicionamento de Fármacos: Amiodarona	100
4.1.3.2 Determinação da CE ₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de L. (L.) infantum e CC ₅₀ em células NCTC.....	100
4.1.3.3 Avaliação da efetividade da amiodarona em modelos experimentais	101
4.1.3.2.1 DISCUSSÃO.....	103
4.1.4.1 Reposicionamento de Fármacos: Sertralina	108
4.1.4.2 Determinação da CE ₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de L. (L.) infantum e CC ₅₀ em células NCTC.....	108
4.1.4.3 Avaliação da efetividade da sertralina em modelos experimentais in vivo	109
4.1.4.2.1 DISCUSSÃO.....	112
CAPÍTULO 2.....	120
4.2 TRIAGEM DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS	120
4.2.1 Triagem de Novos Compostos Sintéticos Análogos de Naftoquinonas .	121
4.2.1.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de L. (L.) infantum e concentração citotóxica 50% (CC ₅₀) em células NCTC dos compostos análogos sintéticos de naftoquinonas	121
4.2.2.1 DISCUSSÃO.....	126
Os resultados deste estudo foram publicados no periódico PLoS One (Anexo 2).	
4.2.2 Triagem de Novos Compostos Sintéticos quelantes de ferro	130
4.2.2.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de L. (L.) infantum e concentração citotóxica 50% (CC ₅₀) em células HL-60 dos compostos sintéticos do acoplamento do quelante de ferro com a cloroquina	131
4.2.2.2.1 DISCUSSÃO.....	133
5 CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS	137
ANEXOS	158

Anexo1 - Paper Acta Tropica	159
Anexo 2 - Paper PLoS One	165
Anexo 3 - Paper Bioorganic Medical Chemistry.....	173

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização da doença

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) associada a países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, com infecções que se manifestam notoriamente em climas tropicais ou subtropicais e, conseqüentemente, atingem populações menos favorecidas¹. São justamente denominadas negligenciadas, dentre outros fatores, por não atraírem o interesse do setor farmacêutico, o qual não as considera um mercado potencial para o elevado investimento necessário para o desenvolvimento de novos fármacos²⁻⁴.

Abrangendo, atualmente, um total de 98 países, 3 territórios e 5 continentes apresentando transmissão endêmica e totalizando mais de 58.000 novos casos de leishmaniose visceral e 220.000 novos casos de leishmaniose cutânea por ano. Há, ainda, uma estimativa de incidência global de aproximadamente 0.2-0.4 casos para a forma visceral e 0.7-1.2 para a forma cutânea, fazendo da leishmaniose uma das seis endemias mais importantes segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)^{5,6}.

Considerando as diferentes manifestações clínicas, bem como os diferentes graus de severidade, as leishmanioses estão classificadas em duas principais doenças: a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV)⁷. Dentro da LC encontram-se, ainda, mais 2 subclassificações: a leishmaniose cutâneo mucosa (LCM) e a leishmaniose cutâneo difusa (LCD)⁸ (Figura 1).

Figura 1 - Manifestações clínicas das leishmanioses. a: leishmaniose cutânea; b: leishmaniose mucocutânea; c: leishmaniose visceral; d: leishmaniose dérmica pós-calazar⁸.

Basicamente, a LC é causada por parasitas das espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* (velho mundo) e *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* (novo mundo) (Figura 2) que provocam, majoritariamente, lesões ulcerosas. A forma cutânea mucosa é causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* ocasionando lesões destrutivas. A dérmica pós calazar é causada por *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica* e apresenta formas cutâneas em indivíduos que já foram tratados por LV. A visceral forma mais grave da doença, é causada pelo complexo *L. donovani* que consiste basicamente *L. infantum/L. chagasi* e *L. donovani* (Figura 2), no qual o parasita apresenta tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado,

medula óssea e linfonodos, sendo que mais de 90% dos casos evoluem a óbito em indivíduos não tratados⁵.

Figura 2 - Taxonomia da *Leishmania*⁵.

Ainda dentro do complexo *L. donovani* nota-se maior prevalência da infecção por *L. (L.) infantum* no norte da África, Europa, América do Sul e América Central, enquanto que a maior porcentagem de infecção por *L. (L.) donovani* se destaca no leste da África, partes do Oriente Médio e Índia (Figura 3)⁸⁻¹⁰.

Figura 3 - Distribuição da leishmaniose visceral no mundo⁸.

Segundo o Ministério da Saúde brasileiro (MS), a leishmaniose vem apresentando uma mudança no perfil de transmissão. Inicialmente a transmissão era em decorrência do contato com áreas florestais, porém nas últimas décadas verificou-se a modificação do perfil epidemiológico, com ocorrência em áreas rurais, periurbanas e urbanas podendo, ainda, ser classificada em três diferentes perfis epidemiológicos: silvestre (transmissão em áreas de vegetação primária); ocupacional (transmissão em decorrência da exploração desordenada de florestas para construções de estradas/extração de madeira) e periurbana (transmissão através da adaptação do vetor ao peridomicílio)¹¹.

Com um período de incubação variando de 10 dias a 1 ano, a transmissão da LV ocorre através da picada de fêmeas de insetos dípteros, família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo). Cerca de 30 espécies estão associadas à transmissão da LV no mundo, porém *Lutzomyia longipalpis* é o mais prevalente e considerado principal vetor nas Américas^{10,12,13}.

Pertencente à família *Tripanosomatidae*, gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida*, os protozoários apresentam dimorfismo em seu ciclo de vida: o promastigota, forma flagelar, encontrado no tubo digestivo do inseto vetor e o amastigota, intracelular obrigatório, encontrado nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (Figura 4)^{14,15}.

Figura 4 - Formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Fonte: a: promastigotas (http://www.uzonnalab.com/index_2.htm) e b: amastigotas (arquivo pessoal).

Basicamente, o ciclo da *Leishmania* se inicia quando a fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero através da inoculação dos promastigotas na pele. Os promastigotas são internalizados por células dendríticas e macrófagos da derme onde se transformam em amastigotas, resultando na perda dos flagelos. A multiplicação e sobrevivência dos amastigotas dentro dos fagolisossomos ocorre através da interação parasita-hospedeiro. Por fim, os parasitas se disseminam através do sistema linfático e sistema vascular, infectando

novos monócitos e macrófagos do sistema retículo-endotelial, resultando na infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia e, em alguns casos, linfadenopatia (Figura 5)⁸.

Figura 5 - Ciclo de vida do parasita *Leishmania* (modificado)¹⁶.

Para a perpetuação do ciclo, o parasita necessita de um reservatório. Neste contexto, duas categorias podem ser enfatizadas: a antroponótica, na qual o hospedeiro é o próprio homem, e a zoonótica, a qual utiliza como hospedeiro o cão (no ambiente doméstico) e canídeos/raposas/marsupiais (no ambiente silvestre)^{5,17,18}. Nota-se, ainda, que a área de transmissão antroponótica está mais associada com a infecção por *L. donovani*, enquanto que a zoonótica está mais relacionada com *L. Infantum*⁸.

Com uma média de 90% dos casos concentrado em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Brasil e Etiópia^{5,6}, há uma estimativa de 500.000

novos casos de LV e mais de 50.000 mortes por ano, número este superado apenas pela malária, dentre as doenças parasitárias^{8,19}.

No Brasil, entre o período de 1990 a 2007 foram notificados 561.673 casos de leishmanioses, sendo 508.193 (90,5%) da forma tegumentar e 53.480 (9,5%) da forma visceral. Até meados de 1990, a região nordeste correspondia por quase a totalidade dos casos de LV (90%), porém essa situação veio sofrendo grande mudança impactual em termos de expansão. Em 2005, somente 56% dos casos foram registrados na região nordeste, demonstrando forte expansão para as regiões centro-oeste, sudeste e norte (Figura 6)²⁰.

Figura 6 - Distribuição espacial dos casos de LV no Brasil – 1983 à 1988, 1989 à 1994, 1995 à 2000 e 2001 à 2006¹¹.

A doença já atinge 20 estados brasileiros, com média anual de 3.095 casos entre o período de 1996 a 2005 e incidência de 2,1 casos/100.000 habitantes²⁰. Destaca-se ainda que desde a introdução da LV no estado de São Paulo, foram notificados 2.146 casos com 187 óbitos entre o período de 1999 a 2012 (Figura 7)²¹.

Figura 7 - Número de casos, óbitos e letalidade da LV no estado de São Paulo, durante o período de 1999 a 2012¹¹.

1.2 Contextualização dos fármacos disponíveis para terapêutica das leishmanioses

Antimoniais Pentavalentes

Sintetizados, primeiramente, na forma trivalente (Sb^{3+}), os antimoniais são utilizados na clínica das leishmanioses há mais de 10 décadas. Posteriormente foram substituídos pelos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, os quais são utilizados no tratamento das leishmanioses há mais de 70 anos^{5,7,22}. Em seguida, foi evidenciado que os antimoniais pentavalentes eram pró-fármacos, ou seja, necessitam da redução à forma trivalente para a ação desejada, entretanto o sítio da redução (macrófagos ou amastigotas) e o mecanismo de ação (enzimático ou não-enzimático) continuam obscuros⁷. O fato de apresentarem concentrações plasmáticas problemáticas, como meia vida plasmática de apenas 2 horas para o antimoniato, e uma longa meia vida plasmática de 76 horas para o estibogluconato, tornam o regime terapêutico com os antimoniais ainda mais complexo^{7,23}.

Sérios problemas estão relacionados ao uso dos antimoniais. Primeiramente, nota-se a alta taxa de cardiotoxicidade e diversos outros efeitos colaterais²⁴, aliados a um custo de aproximadamente 120-150 dólares/tratamento e um complexo regime de administração (aplicação diária com 20 mg/kg de Sb^{5+} , durante 28-30 dias)^{5,19}. O tratamento envolve, ainda, uma complicada administração intramuscular ou intravenosa em um processo extremamente lento, na tentativa de evitar efeitos colaterais, dentre eles, trombose⁵. Ainda assim, pacientes abaixo de 2 anos ou acima de 45 anos de idade com sinais de doença avançada ou desnutrição, sofrem acentuado risco de morte quando expostos ao

tratamento, devido à elevada toxicidade, lenta ação, complicações da doença ou à combinação destes fatores⁸. Falta de resposta também está relatada ao uso dos antimoniais. Segundo Sundar²⁵, mais de 60% dos pacientes no norte de Bihar não responderam ao tratamento com os antimoniais. Explicações tais como subdose terapêutica, tratamento incompleto bem como o uso de antimonial genérico foram hipotetizadas^{19,25}. Mesmo com todos os problemas relacionados ao seu uso, os antimoniais são, até os dias atuais, considerados fármacos de primeira escolha para o tratamento da LV.

Anfotericina B

Introduzida para o tratamento da LV em áreas com ausência de resposta aos antimoniais^{7,26}, a anfotericina B é um antibiótico poliênico que foi originalmente isolado do *Streptomyces nodosus*⁷. Assim como os antimoniais, seu regime de administração é bastante complicado (1 mg/kg por infusão lenta [~ 4 horas] em 15 dias alternados) com reações à perfusão como tromboflebite totalmente esperadas; além disso, inúmeros são os efeitos colaterais, dentre eles hipocalcemia e anafilaxia^{8,27}. Seu elevado custo dificulta ainda mais o tratamento, cerca de 7-8 dólares por 50 mg⁵.

Pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática, introduzida na clínica da leishmaniose. Foi também utilizada no tratamento de pacientes com LV que não respondem a outros fármacos, porém questões a respeito de sua eficácia têm sido levantadas²⁶. Segundo Sundar²⁵, a pentamidina foi capaz de tratar somente 70% dos pacientes refratários com LV utilizando o dobro da dose, além de estar fortemente associada a indução de diabetes, pelo que sua utilização no tratamento

da LV na Índia foi interrompida^{24,25}. A administração da pentamidina se dá, preferencialmente, por infusão intravenosa (4 mg/kg) uma vez a cada 3-4 semanas em um total de até 4 meses⁵. Seu elevado preço ~100 dólares/paciente e sua moderada eficácia torna a pentamidina cada vez menos usual^{22,28}.

Miltefosina

A miltefosina foi o primeiro fármaco oral introduzido na terapia da leishmaniose e, em 2002, registrado para o tratamento de LV na Índia^{26,27,29,30}. Seu principal efeito adverso é a toxicidade gastrointestinal, ainda que teratogenicidade tenha sido verificada em modelo animal³¹. Seu regime de administração é longo, 28 dias, com doses que variam de 2,5 mg/kg até 150 mg/dia dependendo da idade e peso dos pacientes⁵. A principal vantagem da miltefosina é a administração oral e os preços mais acessíveis em comparação aos outros fármacos, 119 dólares/paciente e 64-75 dólares/paciente em países que possuem acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)^{5,8}. A miltefosina possui meia vida plasmática longa (150 horas), o que pode ocasionar desenvolvimento de resistência pelos parasitas^{25,30,32}. Dorlo e colaboradores³² verificaram um perfil de eliminação do fármaco extremamente lento em pacientes infectados com *L. major*. Após 28 dias de tratamento diário com 50 mg de miltefosina, a eliminação foi iniciada no sétimo dia com final de 30 dias, ainda assim, o fármaco foi detectado na circulação após seis meses do término do tratamento, o que poderia gerar parasitas resistentes bem como teratogenicidade³². Este fato foi confirmado por Sundar e colaboradores³³ após dez anos da introdução da miltefosina. Estes verificaram resistência substancial durante um período de seis meses de tratamento em pacientes com LV na Índia³³.

Sitamaquina

A sitamaquina é uma 8-aminoquinolina descoberta pelo Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR, USA)^{4,34} e desenvolvida pela Glaxo Smith Kline para o tratamento oral da LV^{24,35}. A triagem clínica (fase I e II) foi completada com diferentes graus de sucesso. Estudos realizados no Brasil por Dietze e colaboradores³⁶ demonstraram que pacientes infectados com *L. infantum*, tratados com 2 mg/kg de sitamaquina durante 28 dias apresentaram somente 67% de resposta ao tratamento. Ainda assim Jha e colaboradores³⁷ demonstraram cerca de 80% de tratamento na mesma concentração, porém com espécies do velho mundo. Estudos realizados no Quênia demonstraram que pacientes infectados com *L. donovani*, tratados com 2 mg/kg durante 28 dias tiveram maior taxa de sucesso, 92% de tratamento³⁸, ainda assim, sérios eventos adversos foram observados em todos os estudos, destacando-se a problemática nos rins³⁶⁻³⁸. Devido aos problemas relacionados à toxicidade juntamente com a baixa eficácia, o desenvolvimento deste fármaco foi interrompido na Índia⁴.

Paromomicina

A paromomicina, também conhecida como aminosidina, foi originalmente identificada como um agente leishmanicida em 1960 e reposicionada para o tratamento de LC e LV, estando em triagem clínica (fase III)²⁹. Registrado na Índia em 2006 foi o último fármaco aprovado para o tratamento de LV^{7,8}. Excelente eficácia e segurança do fármaco foram evidenciadas na Índia, principalmente pelo fato de que os efeitos tóxicos não foram muito pronunciados⁸. Outro fato relevante foi o alto grau de eficácia, o qual demonstrou resultados similares à anfotericina B³⁹. Por mais que sua administração seja longa (21 dias) e intramuscular (11 mg/kg/dia)⁵, outra grande vantagem do fármaco é o baixo custo, 10-15 dólares por

tratamento⁸. Seu potencial como mono e terapia combinatória com o estibogluconato estão sendo avaliados na África, assim como, formulações tópicas de paromomicina também foram desenvolvidas para o tratamento de LC^{8,26}. Ainda assim, sua eficácia possui variações entre diferentes cepas e até mesmo a mesma cepa em diferentes países⁵.

Fármacos e compostos em estudo

Devido ao ínfimo número de fármacos disponíveis na clínica das leishmanioses, alguns compostos se encontram em fases de estudos. Como exemplo, pode-se destacar o fexinidazol, um composto nitroimidazólico, desenvolvido em 1970 como antimicrobiano de amplo espectro⁴⁰. No começo dos anos 80, foi visualizada sua atividade contra a Doença do Sono⁴¹. A atividade em modelo experimental de LV foi descrita por Wyllie e colaboradores⁴² eles verificaram que após 5 dias de tratamento a 200 mg/kg/dia os camundongos infectados com *L. donovani* apresentaram 98% de redução da carga parasitária. É sabido que o fexinidazol age como um pró-fármaco, ou seja, requer a redução enzimática em dois principais metabólitos, o sulfóxido e a sulfona. Os 3 compostos (fexinidazol, sulfóxido e sulfona) apresentaram atividade *in vitro* tanto para as formas promastigotas quanto para as formas amastigotas axênicas de *L. donovani*, porém somente os metabólitos sulfóxido e sulfona, demonstraram atividade em macrófagos infectados com os amastigotas de *L. donovani*⁴². Atualmente, fexinidazol se encontra em fase clínica II para LV, o qual ainda visa comparar a eficácia em humanos tanto na administração de 1800 mg/dia durante 4 dias consecutivos quanto 1200 mg/dia durante 6 dias consecutivos^{43a}.

Outro composto nitroimidazólico que vêm sendo bastante explorado é o PA-824. Atualmente em fase clínica II para LV, apresentou atividade em modelo

experimental de BALB/c infectado com *L. donovani* onde, após 5 dias de tratamento a 100 mg/kg (duas vezes ao dia), demonstrou ser mais eficaz que a miltefosina, com taxas de tratamento no fígado na faixa de 99.9% e 68.7%, respectivamente⁴³.

Derivados quinolínicos são exemplos de sucesso em estudos de LV, como por exemplo, e já citado acima, a sitamaquina, uma 8-aminoquinolina. Outro exemplo que pode ser citado são os compostos análogos de 4-aminoquinaidinas (PP-9 e PP-10), ambos demonstraram promissores valores *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania*, se mostrando no modelo experimental mais efetivo que a miltefosina⁴⁴. Como outro caso de sucesso pode-se citar os alcalóides quinolínicos substituídos na posição 2, originalmente isolada da *Galipea longiflora*, os quais demonstraram inicialmente atividade contra LC^{45a}, posteriormente sua atividade anti-*L. donovani* foi descrita, demonstrando valores de tratamento próximos a miltefosina (76% e 89%, respectivamente)⁴⁵.

Tamofixeno, um fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama, vem sendo reposicionado em modelo experimental tanto para LC como para LV. A atividade anti-*L. infantum* foi descrita por Miguel e colaboradores⁴⁶ com taxas de tratamento acima de 90% tanto para o baço como para o fígado, porém sérios problemas foram relatados frente a sua toxicidade⁴⁶. A doxorrubicina, um composto anti-câncer também foi avaliado no modelo experimental de LV, demonstrando inibição da carga parasitária em até 95% na dose de 625 µg/kg, durante 4 dias consecutivos⁴⁷.

Lipossomos

A ideia inicial de direcionamento de fármacos através de carreadores surgiu em 1906, com o conceito da bala mágica de Paul Ehrlich (*Ehrlich's Magic Bullet*), porém sua aplicação ocorreu somente em 1964, conforme descrito por Alec Bangham⁴⁸. O sucesso no uso da formulação lipossomal para leishmaniose data de 1978, quando Alving e colaboradores demonstraram eficácia cerca de 700 vezes maior dos antimoniais encapsulados quando comparado aos antimoniais livre. Este sucesso foi atribuído à constituição dos lipossomos o qual são direcionados aos macrófagos, bem como aos órgãos-alvo: fígado, baço e medula óssea (local onde reside o amastigota)⁴⁹, destacando assim o sucesso da formulação lipossomal para leishmaniose.

Lipossomos são vesículas lipídicas de variados tamanhos, que se formam espontaneamente em meio aquoso podendo, ainda, ser classificados em três categorias dependendo do tamanho e número de lamelas⁵⁰ (Figura 8):

- i) SUVs: vesículas unilamelares pequenas (25 nm);
- ii) LUVs: vesículas unilamelares grandes (1000 nm);
- iii) MLVs: vesículas multilamelares (100 a 1000 nm);

Figura 8 - Classificação dos lipossomos por tamanho e número de lamelas.

A grande vantagem de estudar uma formulação lipossomal é a alta similaridade desta com a membrana celular⁴⁹, não apresentando efeitos tóxicos proeminentes, sendo possível então encapsular o fármaco com um maior direcionamento a célula alvo e como consequência uma redução da toxicidade. Adicionalmente, em um sistema lipossomal existe a facilidade de conseguir encapsular tanto fármacos hidrossolúveis, o qual serão encapsulados no compartimento interno bem como fármacos lipossolúveis o qual serão encapsulados na membrana dos lipossomos (Figura 9)⁵¹.

Figura 9 - Características estruturais dos lipossomos⁵¹.

Há uma série de características a estudar quando se deseja projetar uma formulação lipossomal. O número de lamelas é um fato bastante importante, uma vez que este pode auxiliar na quantidade de fármaco encapsulado, ou seja, quando se trabalha com um fármaco lipossolúvel, quanto maior o número de lamelas, maior a quantidade de fármaco encapsulado. Adicionalmente, é possível também encapsular dois compostos com polaridades diferentes dentro de um mesmo sistema lipossomal, ou seja, encapsular um fármaco lipossolúvel o qual ficará na membrana e outro hidrossolúvel, o qual ficará na zona hidrofílica.

O tamanho é fato marcante, uma vez que lipossomos maiores seriam fagocitados rapidamente devido ao alto reconhecimento pelo SFM, sendo assim, para conseguir uma maior circulação dos lipossomos seria interessante um lipossomo de menor diâmetro, pois este poderia circular por mais tempo antes de ser fagocitado. Adicionalmente, estudos demonstraram que lipossomos com tamanho maior que 1000 nm, quando administrados endovenosamente, podem causar a obstrução de alguns capilares, bem como lipossomos com diâmetro menor que 400 nm, possuem um melhor direcionamento à medula óssea⁵¹⁻⁵³.

A carga também é bastante discutida, uma vez que lipossomos negativos demonstraram um direcionamento duas vezes maior ao baço⁵⁴, bem como, estudo realizados por Batista e colaboradores⁵³ demonstraram que lipossomos carregados positivamente apresentam menor atividade e maior toxicidade.

A saturação dos lipídeos também deve ser levada em consideração durante o preparo da formulação, devido às diferenças entre lipídeos saturados ou insaturados em vista de uma maior estabilidade.

Diversas metodologias são aplicadas para a preparação dos lipossomos (hidratação do filme lipídico, injeção de etanol, evaporação em fase reversa, desidratação-reidratação, entre outros); assim como a temperatura de transição de fases dos lipídeos com o qual se trabalha⁵⁰. Basicamente, os lipossomos convencionais são constituídos de fosfolipídeos e colesterol, podendo apresentar carga (positiva ou negativa) ou ser zwitteriônico. Dentre os lipídeos utilizados na preparação de uma formulação lipossomal, cinco podem ser destacados como os mais usuais: fosfatidilcolina-lecitina (zwitteriônica); fosfatidiletanolamina (zwitteriônica); fosfatidilglicerol (negativa); fosfatidilserina (negativa); fosfatidilinositol (negativa). A carga atribuída à formulação, entre outras características, tem a função de evitar a agregação das vesículas, aumentando assim sua estabilidade⁵³.

A porcentagem de colesterol irá colaborar na preparação dos lipossomos, ou seja, o colesterol tem a função de deixar a membrana mais fluida, impedindo o escape do composto encapsulado. A proporção do colesterol deve ser bem articulada, pois uma maior quantidade de colesterol poderia deixar o lipossomo rígido demais resultando na não liberação do fármaco encapsulado ou pouco colesterol poderia resultar em escape do fármaco encapsulado antes mesmo de serem fagocitados.

Sendo assim, destaca-se que os lipossomos produzidos neste trabalho foram constituídos de lipídeos saturados (visando uma maior estabilidade) com fosfatidilcolina, fosfatidilserina e colesterol o qual atribuiu carga negativa ao sistema lipossomal) e SUVs (visando uma captação tardia quando comparada aos LUVs).

Formulações de anfotericina B para LV

Estudos utilizando formulações lipídicas de anfotericina B estão disponíveis na clínica para o tratamento das leishmanioses. Atualmente, existem três diferentes tipos de formulações utilizando o fármaco anfotericina:

- i) anfotericina B lipossomal (Ambisome®);
- ii) anfotericina B complexo lípidico (Abelcet®);
- iii) anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil®).

Todas possuem eficácia comparável à anfotericina B, porém a toxicidade frente às formulações lipídicas são extremamente menores²⁸.

Anfotericina B lipossomal (Ambisome®). Constituída por fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e colesterol, em sistema lamelar único, é a formulação lipossomal mais estudada e a qual apresenta melhor eficácia quando comparada à outras formulações⁵⁵. Originalmente desenvolvida para o tratamento de micoses sistêmicas, em 1997 foi reposicionada como o primeiro fármaco lipossomal aprovado para o tratamento de LV^{56,57}. Nas Américas, seu regime de administração

se dá por via intravenosa 3-5 mg/kg/dia durante 3 à 6 dias, com uma dose total máxima de 20 mg/kg/tratamento²² com efeitos adversos quase nulos⁵⁶. Apresenta uma meia-vida plasmática de aproximadamente 7 horas⁷, porém, problemas com sua estabilidade são relatados, como temperaturas acima de 25°C e inferiores a 0°C poderem alterar as características dos lipossomos, impactando na eficácia e toxicidade⁵⁸.

Muito se fala dos altos custos de uma formulação lipossomal, porém um estudo recente avaliou a eficácia em dose única de anfotericina B lipossomal a 10 mg/kg quando comparado com 15 infusões em dias alternados de anfotericina B a 1 mg/kg. Os resultados demonstraram que anfotericina B lipossomal foi menos expansiva, mais segura e com a mesma eficácia quando comparada à anfotericina B livre⁵⁹. Até recentemente, seu uso em países em desenvolvimento era impraticável devido ao elevado custo (2,800 dólares/tratamento), porém preços preferenciais foram acordados entre WHO e países endêmicos, possibilitando o tratamento com o Ambisome[®] a um preço muito mais acessível (200 dólares/tratamento)^{8,60}. Sendo considerado como o melhor fármaco disponível na clínica para o tratamento de LV, Ambisome[®] é o fármaco de primeira escolha na Europa e Estados Unidos⁸.

Anfotericina B dispersão coloidal (Amphocil[®]) e anfotericina B complexo lípidico (Abelcet[®]). Apesar de ambas formulações serem menos usuais que o Ambisome[®], a anfotericina B dispersão coloidal consiste em uma relação 1:1 de anfotericina B + sulfato de colesteril⁵⁵ e anfotericina B complexo lípidico consiste em anfotericina B + L- α -dimiristoilfosfatidilcolina e L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol⁵⁵. Ambas foram avaliadas frente à pacientes infectados com *L. donovani* na Índia. Segundo Sundar e colaboradores⁶¹, Amphocil[®] quando administrada a 7,5 mg/kg ao longo de 6 dias demonstrou promissor valor de tratamento (97%) enquanto que

Abelcet® demonstrou ser menos efetiva quando administrada a 5 mg/kg por 5 dias consecutivos, resultando em 92% de tratamento^{62a}. Ainda assim, os custos elevados das formulações lipídicas continuam limitando seu uso.

1.3 Pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (P&D) para Leishmaniose

O processo de descoberta de fármacos é longo, requer altos investimentos financeiros e, na maioria das vezes, o objetivo (obtenção do fármaco) não é alcançado. A descoberta de compostos líderes, que cheguem com sucesso até as etapas finais na descoberta de um fármaco, é um passo fundamental para a introdução do produto. Segundo Nwaka e Hudson² mudanças significativas vêm ocorrendo no processo de *Drug Discovery*. Até recentemente, maiores investimentos eram disponibilizados nas etapas de *development* dando menos ênfase nos processos de *discovery*. Atualmente, este perfil vem sendo mudado, onde maiores investimentos estão sendo agregados nas etapas iniciais, tendo em vista sua importância para o sucesso da busca^{2,62}.

Segundo Don e Ioset⁶³ vários critérios devem ser implementados no processo de descoberta de fármacos. A grande problemática atual é o *gap* entre um composto *hit* para um composto *lead*. Este deve ser minimizado e, para isso, alguns critérios devem ser adotados, bem como uma mudança gradual no panorama atual. Basicamente, um composto precisa atender algumas exigências para ser considerado *hit*. Dentre elas:

- concentração efetiva 50% em amastigota intracelular <10 µg/mL;
- seletividade 10 vezes maior para o parasita do que para a célula hospedeira;
- regras de Lipinsky, aplicável, mas não definível;
- ADMET *in silico*;
- determinação de possíveis alertas estruturais;
- síntese viável (<8 etapas).

Depois de atendidas as exigências para *hit*, ele poderá prosseguir nas etapas seguintes exigidas para *lead*. Dentre elas:

- concentração efetiva 50% em amastigotas intracelular $<1 \mu\text{g/mL}$;
- seletividade 50 vezes maior para o parasita do que para a célula hospedeira;
- redução de 70% ou mais na parasitemia do fígado em modelo animal após administração intraperitoneal;
- regra de Lipinsky, aplicável, mas não definível;
- estabilidade metabólica;
- ADMET *in vitro*;
- ADMET *in vivo*;
- não tóxico no modelo animal na dose efetiva;
- atividade *in vitro* e *in vivo* equivalente ou melhor do que o fármaco padrão;
- atividade em diferentes cepas;
- atividade em cepas resistentes;
- determinação de possíveis alertas estruturais;
- preliminar estudo de REA (relação estrutura-atividade) com no mínimo dez compostos.

Até pouco tempo, os estudos de farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD) eram realizados nas etapas de *lead optimization* (Figura 10); porém, devido ao insucesso desta na obtenção do produto final, a literatura vêm sugerindo a introdução dos estudos de PK/PD nas fases iniciais do processo, na tentativa de minimizar essas falhas (Figura 11)^{2,62}. Recentemente, um trabalho publicado por Tuntland e colaboradores⁶², sugeriu fortemente a introdução dos estudos de PK/PD nos estágios iniciais do processo de descoberta de fármacos. Inúmeras são as vantagens com a introdução de PK/PD nas etapas iniciais, tais como, minimizar o uso de animais; encurtar o tempo no desenvolvimento do fármaco; estimar o índice terapêutico além de predizer doses nos processos iniciais dos testes, descartando assim, compostos não promissores já nas etapas iniciais, prosseguindo os estudos

somente com compostos os quais possuam realmente efetividade. Como por exemplo, um composto que é administrado uma vez ao dia durante um período de cinco dias, porém possui uma meia vida plasmática de 2 horas, ou seja, este composto, possivelmente não seria capaz de manter concentrações plasmáticas necessárias para uma atividade biológica devido ao seu regime de administração. Com a introdução de PK/PD, previsões de concentração e tempo poderão ser determinadas, evitando encontrar essas respostas somente ao final da pesquisa, inviabilizando o composto após muito investimento^{62,64}.

Figura 10 - Etapas para introdução de um fármaco no mercado⁶⁵.

Figura 11 - Novo modelo adotado para introdução de um fármaco no mercado para doenças negligenciadas².

1.4 Estratégias para a triagem de fármacos

Ensaio racional e empírico

Dentre as estratégias utilizadas para a descoberta de fármacos, duas nomenclaturas recentemente empregadas condensam as metodologias disponíveis para a triagem de fármacos: a triagem racional e a triagem empírica. Classificada como triagem empírica, esta se resume na seleção de compostos de forma aleatória, sem necessariamente uma base racional. Recentemente um trabalho publicado na *Science* contra o vírus ebola, exaltou que a triagem empírica é uma das abordagens mais rápidas para a introdução de um novo medicamento no mercado, especialmente se acoplado com a técnica de reposicionamento a qual tende minimizar o tempo (em anos) na pesquisa^{65,66}.

Adicionalmente, uma ordem hierárquica (em graus de risco) é classificada para a escolha de uma determinada metodologia. Como baixo risco, classifica-se a técnica popularmente conhecida como “*me too*”; esta se resume na tentativa de melhorar um fármaco a partir de uma classe existente. Como médio risco classifica-se a técnica popularmente conhecida como “reposicionamento de fármacos”, esta consiste na busca de novos usos para fármacos já aprovados na clínica. Como alto risco, a técnica se baseia em utilizar uma nova classe de compostos contra um novo alvo, destaca-se ainda que no âmbito das leishmanioses nenhum caso de sucesso foi relatado frente a esta metodologia⁶⁷.

Dentre as metodologias usuais empregadas na descoberta de fármacos, ressalta-se que as técnicas utilizadas no presente estudo foram focadas no:

- i) reposicionamento de fármacos;
- ii) síntese de novos compostos através de hibridação molecular e modificações estruturais por meio de síntese orgânica;

iii) sistemas carreadores de fármacos, como os lipossomos.

Ainda que não abordadas nesta tese, outras duas metodologias são empregadas neste âmbito:

iv) isolamento de compostos de origem natural;

v) associação de fármacos.

Tendo em vista que todo atual arsenal terapêutico utilizado no tratamento da LV foram derivados das estratégias de reposicionamento de fármacos, é evidente que esta técnica provê enormes ganhos. Os antimoniais pentavalentes Solustibosan® (sintetizado em 1937) e Pentostam® (1945) foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento de outra doença e reposicionados para LV^{22,68}. A anfotericina B, um antibiótico conhecido por Fungizon® foi identificado por sua atividade antifúngica, porém sua atividade leishmanicida é relatada desde 1959⁶⁹. A pentamidina, uma diamidina aromática (Lomidina®), sintetizada como um composto hipoglicêmico, empregada ainda no tratamento de pneumonia teve atividade anti-*Leishmania* relatada desde a década de 40^{22,70}. A miltefosina, uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida pra o tratamento de câncer e reposicionada para o tratamento de LV em março de 2002²⁹. Além da paromomicina, um antibiótico isolado desde a década de 50, com eficácia comprovada frente à LC em 1966, porém somente em 1990 foi avaliada a efetividade do fármaco frente à espécies viscerais^{71,72}.

Ainda assim, não só na clínica da leishmaniose, mas também frente a inúmeras doenças a técnica de reposicionamento de fármacos é muito bem empregada. Alguns casos de sucesso que valem ser postulados são os casos da zidovudina e do sildenafil. A zidovudina foi originalmente descoberta para o tratamento de câncer e reposicionada com sucesso no tratamento da AIDS⁶⁵. O sildenafil um inibidor de fosfodiesterase-5 (PDE-5), originalmente designado para

relaxar artérias coronarianas, ganhou forte atenção quando em triagem clínica os voluntários relataram casos de ereções após administração do fármaco. Pesquisadores da *Pfizer* não faziam ideia que tinham um *blockbuster* nas mãos, porém após lerem um relato na literatura de que a PDE-5 era uma enzima chave na bioquímica como mediadora de ereção, reposicionaram rapidamente o fármaco, o qual atingiu taxas de 80% de sucesso, sendo assim criado o primeiro fármaco para disfunção erétil, o Viagra^{®65}.

Apesar de grandes os sucessos da técnica de reposicionamento, a triagem de fármacos com atividade conhecida, porém com pequenas modificações estruturais também têm ajudado muito na busca por novos protótipos para doenças negligenciadas. Um exemplo de sucesso na clínica de DTN se deve ao artesunato, utilizado no tratamento da malária, um derivato sintético da artemisinina o qual elevou a efetividade após pequena modificação estrutural⁷³.

Assim como a técnica de carreadores de fármacos como os lipossomos, amplamente utilizados em estética, também possuem inúmeros casos de sucesso, dentre eles, na própria clínica da leishmaniose se destaca o Ambisome[®]. Basicamente, ambisome é a junção da anfotericina B em um sistema lipídico. A anfotericina B é um fármaco de escolha no tratamento das leishmanioses, porém extremamente tóxico, sua formulação lipossomal foi capaz de manter a atividade anti-*Leishmania*, porém reduzir a toxicidade devido ao direcionamento do fármaco à órgãos-alvo (baço e fígado)⁷⁴.

Ensaio fenotípicos e baseados em alvos

Ainda dentro das etapas necessárias para a descoberta de novos fármacos, duas abordagens se destacam no processo de triagem: os ensaios fenotípicos e os ensaios baseados em alvos (*target-based*).

A ideia de ensaios baseados em alvos é utilizada pela indústria farmacêutica na triagem de bibliotecas de compostos frente a uma proteína, seguido de posterior otimização dos compostos líderes frente à enzima específica, acompanhando a atividade celular, seletividade, bem como os estudos farmacocinéticos⁷⁵. Tendo em vista doenças parasitárias, o conhecimento para posterior inibição de alguma enzima específica, provocaria a morte do parasita, porém os mecanismos que ocorrem neste processo não são totalmente claros, mas sugerem o bloqueio de algumas vias vitais para a sobrevivência do parasita. Em alguns casos, a inibição de uma enzima pode desencadear um processo pleiotrópico, ou seja, ocorre a inibição de várias outras vias, o que resultaria em um mecanismo de morte acelerado ao parasita⁷⁵.

Em cinetoplastídeos, um exemplo de sucesso desta estratégia é o caso da inibição da enzima tripanotona (enzima necessária para a síntese de tiol, o qual previne o estresse oxidativo). Wyllie e colaboradores⁷⁶ demonstraram que em animais infectados com *T. brucei*, após a inibição desta enzima, resultou a morte do parasita, fato este que evidencia a contribuição da tripanotona para a validação de um alvo farmacológico em cinetoplastídeos⁷⁶. Em contrapartida, uma problemática desta técnica é que não existem muitos alvos moleculares validados frente às doenças, principalmente no caso de doenças negligenciadas. Outra dificuldade comumente associada a esta técnica são fármacos que possuem múltiplos alvos, os conhecidos fármacos promíscuos⁷⁷. Basicamente a promiscuidade de fármacos se resume em um fármaco se ligar a múltiplos alvos, ou se ligar a um alvo, porém desencadear diversas reações as quais resultam, quase sempre, em efeitos secundários indesejáveis, entre eles, erro na função biológica⁷⁸.

Diante desta problemática, a triagem fenotípica, ou seja, a triagem no parasita inteiro demonstra vantagem sobre a técnica baseada em alvos. Além de

ser mais objetiva, possibilitou a ampliação do número de bibliotecas testadas, ainda mais com o auxílio do *high-throughput screening*. A principal vantagem da triagem fenotípica é visualizar o mecanismo de morte no parasita como um todo, já abordando captação celular bem como seletividade, o que permite, ainda, a eliminação de compostos potencialmente tóxicos já nas fases iniciais dos testes^{63,75}. Um caso de sucesso no uso desta técnica na área de DTN foi a recente descoberta do fármaco fexinidazol, o qual já se encontra em triagem clínica para Doença do Sono⁷⁹. Adicionalmente um trabalho relativamente recente publicado por Swinney e Anthony⁸⁰ corroborou a eficiência da técnica fenotípica. Eles verificaram que dentre 259 novas entidades aprovadas pelo FDA no período entre 1999 a 2008, o sucesso da triagem fenotípica excedeu a triagem baseada em alvos; eles postularam, ainda, que talvez o insucesso na descoberta de fármacos nos dias atuais possa ser em decorrência da amplitude que a triagem baseada em alvos ganhou na era da genômica⁸⁰.

Tendo em vistas estes achados, destaca-se que a técnica abordada neste trabalho foi a triagem fenotípica. Acredita-se, ainda, que a associação da triagem fenotípica com possíveis mecanismos moleculares de ação do fármaco juntamente com a identificação de alvos moleculares possa ser a chave do sucesso para a descoberta de um novo fármaco.

JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a LV atinge países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e o orçamento para tratar os casos existentes muitas vezes pode ultrapassar o orçamento total designado à saúde pública¹⁹. O elevado número de casos dentro de uma mesma família, as quais vivem em áreas de risco, os locais longínquos onde recebem o tratamento, a necessidade de internação, as dificuldades quanto à administração, os severos efeitos adversos bem como a longa duração dos tratamentos, acabam resultando em perda de salários/empregos, o que muitas vezes ocasiona o abandono do tratamento, facilitando assim o aparecimento de cepas resistentes. Os antimoniais, fármacos de primeira escolha, foram descobertos há mais de 70 anos, fato este que comprova a negligência na busca de novos candidatos a fármacos frente à LV. Por mais que este perfil venha mudando nos últimos anos, é evidente a importância da parceria público privada para a busca por novos candidatos a fármacos que se apresentem com tratamentos mais curtos, de menor toxicidade e, que sejam mais seguros e eficazes.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

O objetivo primordial deste projeto foi a avaliação *in vitro* e *in vivo* de novas terapias para a leishmaniose visceral (*L. (L.) infantum*), utilizando-se três estratégias principais:

- i) reposicionamento de fármacos em uso na clínica médica para o tratamento de outras patologias;
- ii) sistemas de liberação controlada e sustentada de fármacos como os lipossomos;
- iii) avaliação de análogos sintéticos de naftoquinonas, bem como, análogos sintéticos de quelantes de ferro.

2.2 Específicos

- 1- Avaliar, *in vitro*, a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) frente às formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* da quimioteca de reposicionamento bem como dos análogos sintéticos.
- 2- Avaliar, *in vitro*, a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) da quimioteca de reposicionamento bem como dos análogos sintéticos frente a células de mamíferos, visando ainda à determinação dos respectivos índices de seletividade (IS).
- 3- Desenvolver lipossomos de nitazoxanida (NTZ-LP) e realizar a caracterização dos parâmetros físico-químicos.
- 4- Determinar, *in vitro*, a efetividade (CE₅₀) e a citotoxicidade (CC₅₀) da NTZ-LP em *L. (L.) infantum* e células de mamíferos.

- 5- Avaliar, *in vitro*, a cinética de captação da NTZ-LP fluorescente (NTZ-LP-DIL) por macrófagos peritoneais sadios e infectados com *L. (L.) infantum*.
- 6- Estudar, *in vitro*, a internalização e o direcionamento da NTZ-LP-DIL em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*.
- 7- Estudar, *in vivo*, a efetividade da nitazoxanida livre (NTZ) e encapsulada em lipossomos (NTZ-LP), utilizando o modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*.
- 8- Avaliar a efetividade dos fármacos mais seletivos *in vitro* em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e fármacos

Clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil sulfato de sódio (SDS), glicerol e metanol foram obtidos da Merck. DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato) e DIL (C18) (1,10-dioctadecil-3,3,30,30-tetrametilindocarbocianina perclorato) foram obtidos da Molecular Probes. Antimônio pentavalente (Glucantime®) da Sanofi-Aventis e anfotericina B da Cristália. Soro fetal bovino da Invitrogen. Placas Nunc® da Thermo Scientific. Kit PCR da Ambion (Life Technologies). Alamar Blue (resazurina), brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), colesterol, hemina, lipopolissacarídeo (LPS), meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), meio M-199, miltefosina e nitazoxanida bem como os demais reagentes não citados foram adquiridos da Sigma. Fosfolipídeos hidrogenados foram doados pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Demais fármacos utilizados no trabalho, foram doados pelo Prof. Humberto da FCF-USP/SP.

3.2 Parasitas

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0.25% de hemina a 24°C sem adição de antibióticos. Amastigotas de *L. (L.) infantum* foram obtidas por meio da centrifugação diferencial de baço de hamster previamente infectado (60-70 pós-infecção) e o número de parasitas determinado pelo método de Stauber⁸¹. Amastigotas axênicas de *L. (L.) donovani* foram cultivadas através de

protocolos diferenciados em meio M-199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa a 37°C.

3.3 Células de mamíferos

Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (fêmeas) por meio de lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Células NCTC (clone 929) foram cultivadas em meio M-199, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Células de leucemia mielóide humana (HL-60) foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementadas com 16.7% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Células de leucemia monocítica humana (THP-1) foram cultivadas em meio RPMI, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

3.4 Animais de experimentação

Hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL-SP) e no biotério de experimentação animal do *Drug Discovery Unit* (DDU-UK). Os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsteres dourados foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa. Camundongos BALB/c (fêmeas) foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais bem como para os ensaios de farmacocinética. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa

(CEP) do Instituto Adolfo Lutz bem como pelo CEP do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (CEP-IMT/190).

3.5 Determinação *in vitro* da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*

Promastigotas: Com o objetivo de determinar as respectivas CE₅₀, tanto os fármacos como os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) ou metanol (MeOH) a 0,5%, dependendo da solubilidade dos mesmos, posteriormente diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e incubados com os parasitas. Após um período de 48 horas, a viabilidade dos promastigotas foi determinada por meio do ensaio colorimétrico com MTT⁸². Como controle do ensaio, foram utilizados os fármacos anfotericina B e miltefosina.

Amastigotas: Macrófagos (1x10⁵/poço) foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente e adicionados em placas de 16 poços (NUNC[®]), permanecendo em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) infantum* foram extraídas do baço de um animal doador, previamente infectado, separadas por centrifugação diferencial, adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago) e incubadas com os diferentes compostos e/ou fármacos a 37°C por um período de 120 horas. Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 400 macrófagos/poço, avaliando o número de macrófagos infectados⁷⁴. Como controle do ensaio foi utilizado o fármaco Glucantime[®] e miltefosina. Amastigotas axênicas: células THP-1 foram infectadas com amastigotas axênicas durante 24 horas; após a infecção, os compostos foram adicionados, incubados por um período de 48

horas e a viabilidade determinada por microscopia⁸³. Como controle do ensaio foi utilizado o fármaco miltefosina.

3.6 Determinação *in vitro* da Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) frente a células de mamíferos e determinação do Índice de Seletividade (IS)

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas células NCTC e/ou HL-60, estas foram semeadas 6×10^4 e 1×10^5 células/poço, respectivamente. Os fármacos/compostos foram dissolvidos em DMSO ou MeOH e diluídos serialmente em meio M-199 ou RPMI-1640. As placas foram então incubadas por um período de 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e a viabilidade celular determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT⁸² e Alamar Blue⁸⁴. O índice de seletividade (IS) dos compostos foi determinado por meio da seguinte expressão:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ células de mamíferos}}{CE_{50} \text{ (amastigotas) contra os parasitas}}$$

3.7 Desenvolvimento de uma formulação lipossomal de nitazoxanida (NTZ-LP) e cinarizina (CNZ-LP)

Os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação de lipídeos seguido por congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido e posterior sonicação⁸⁵. Para a preparação dos lipossomos, fosfatidilcolina saturada de ovo, fosfatidilserina e colesterol foram utilizados na proporção de 7:2:1 molar⁸⁶. Para isso, o fármaco candidato foi diluído em metanol (solução A). Como solução B, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e colesterol foram diluídos em clorofórmio. Posteriormente, as soluções A e B foram unidas, sonicadas por aproximadamente 10 minutos e evaporadas através de evaporador rotativo com temperatura de 55°C a 40 rpm durante 60 minutos até evaporação total. Solução de glicerol a 2,25% foi

preparada, pré-aquecida juntamente com as esferas de vidro e adicionada à película de lipídeos. O processo de hidratação dos lipossomos foi realizado durante 60 minutos em evaporador rotativo com temperatura de 55°C a 80 rpm. A fim de reduzir o tamanho das vesículas, sonificador sob aquecimento foi utilizado novamente. O processo de congelamento-descongelamento consistiu em três ciclos consecutivos de congelamento em nitrogênio líquido, seguido por descongelamento em temperatura ambiente. Após o preparo do mesmo, o material foi centrifugado (4000 x g por 15 minutos) a fim de separar os lipossomos do fármaco não encapsulado e a concentração determinada por espectrofotometria (NanoDrop-100). Para a preparação dos lipossomos fluorescentes, 2% de DIL C18 (em relação à fosfatidilcolina) foi adicionado à mistura de lipídeos antes da secagem⁸⁷.

3.8 Avaliação espectrofluorimétrica *in vitro* da captação da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais sadios e infectados com *L. (L.) infantum*

Macrófagos (1×10^5 por poço) foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente e adicionados a placas de 96 poços (fundo transparente), permanecendo em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. A fim de comparar a captação da NTZ-LP-DIL por macrófagos sadios e infectados, amastigotas de *L. (L.) infantum* foram extraídas de baço, separadas por centrifugação diferencial e adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago). Ainda assim, na placa que continha os macrófagos sadios (não infectados) apenas meio de cultura foi adicionado. Após 24 horas de incubação, as duas placas foram incubadas com NTZ-LP na presença do marcador fluorescente DIL C18 (NTZ-LP-DIL) e monitoradas a cada 15 minutos, em um total de 360 minutos em espectrofluorímetro de placas FilterMAx com excitação e emissão de 549 e 565 nm, respectivamente.

3.9 Avaliação *in vitro* da internalização da NTZ-LP-DIL por macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* através de microscopia confocal

Macrófagos (1×10^5 por poço) foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito anteriormente e adicionados a placas de 16 poços (NUNC®), permanecendo em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) infantum* foram extraídas de baço, separadas por centrifugação diferencial e adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago). NTZ-LP foi preparada na presença do marcador fluorescente DIL C18 (NTZ-LP-DIL) e incubada por um período de 3 horas, em estufa de 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído a 4%, coradas com DAPI (1 mM) e processados para microscopia confocal. As amostras foram observadas em um microscópio confocal BioRad 1024-UV (Bio-Rad Hercules, CA), utilizando uma objetiva de NA 100x 1.4, em óleo de imersão com contraste de fase. O programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para analisar as distribuições de intensidade de fluorescência, para ajustar o contraste ou o brilho das imagens adquiridas bem como para combinar as imagens. Seções ópticas sequenciais (z-series) foram realizadas utilizando-se o programa Voxx (<http://www.nephrology.iupui.edu/imaging/voxx/>) ou o módulo de renderização de superfície de Huygens Essential (www.svi.nl). Como controle do ensaio, uma lâmina foi corada com giemsa e observada em microscópio óptico afim de confirmar a parasitemia⁸⁶.

3.10 Avaliação do diâmetro e carga dos lipossomos

Para avaliar o diâmetro médio e a carga dos lipossomos, estes foram preparados conforme descritos anteriormente com adição ou não do fármaco. O diâmetro e carga foram determinados por meio da técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) em um aparelho Malvern Zeta Sizer Nano ZS, com laser HeNe (633 nm).

3.11 Avaliação do número de lamelas dos lipossomos

Para as medidas de espalhamento de raios X sob-baixo ângulo (SAXS), os lipossomos foram preparados conforme descrito anteriormente e analisados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, utilizando uma distância amostra-detector de ~1.000 milímetros. Nessas condições, a amplitude do vetor de espalhamento, q (definido por: $q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$, sendo 2θ o ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda do feixe de raio-X incidente) varia de $q_{\min} = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ a $q_{\max} = 0.33 \text{ \AA}^{-1}$. As curvas de espalhamento foram corrigidas pelo espalhamento da água e pela sua atenuação.

3.12 Avaliação da efetividade dos fármacos em modelos experimentais *in vivo*

Para avaliar a efetividade dos tratamentos *in vivo*, hamsteres dourados, machos, recém-desmamados foram previamente infectados com *L. (L.) infantum*. Para isso, amastigotas purificadas do baço foram inoculados 1×10^8 amastigotas/hamster pela via intraperitoneal, utilizando um $n=5$ para cada grupo. Os respectivos fármacos foram administrados oral e/ou intraperitoneal por um período de 8/10 dias consecutivos, com início do tratamento após 40 dias da infecção. Complementarmente, nos grupos tratados com o fármaco livre, foi

realizado um “grupo controle de veículo”, onde o mesmo recebeu o veículo utilizado para diluir o fármaco (etanol, cremofor e PBS na proporção de 10:15:75). Já o “grupo controle de lipossomo” tratado com a formulação lipossomal, recebeu (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e colesterol na proporção de 7:2:1 em solução de glicerol). O percentual de inibição foi calculado pela relação entre os grupos estudados (tratados e controles). Ao final de cada tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para remoção de cerca de 200 mg do baço e do fígado a fim de determinar a densidade parasitária nos órgãos.

3.13 Construção da curva padrão de DNA

Para construção da curva padrão de DNA de *L. (L.) infantum*, promastigotas foram cultivadas conforme descrito anteriormente, lavadas em PBS (pH 7,2), centrifugadas a 1.000 x g por 10 minutos e contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada dos parasitas que variou entre 10¹ a 10⁷. O DNA foi extraído utilizando kit específico, conforme instruções do fabricante.

3.14 Transcrição de RNA para cDNA

Os fragmentos de baço e fígado foram utilizados para extração e purificação do RNA através de kit específico em colunas de afinidade, conforme instruções do fabricante (Ambion - Life Technologies). A densidade parasitária dos órgãos foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR). Sendo assim, após o término do tratamento *in vivo*, os órgãos foram congelados e mantidos a -80°C até o momento da extração. Macerados ainda congelados e lisados com tampão específico do kit, onde após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído através de colunas de afinidade. Posteriormente, as amostras de RNA foram reversamente transcritas

para cDNA. Ao volume de 11 µL do RNA extraído foi adicionado 1 µL da solução contendo as quatro “dntp’s” (10mM) e 1µl de “random primers”. Em seguida, as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C. Após este período, foram retiradas e colocadas em banho de gelo por 20 segundos. Posteriormente, foi adicionado 2 µL DTT e 4 µL tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3; KCl, 375mM; MgCl₂ 15mM) e colocados novamente ao termociclador por 20 segundos a 37°C. Após os 20 segundos, foi adicionado 1 µL da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), a qual é responsável pela complementação do RNA em cDNA (fita dupla).

O grau de pureza das amostras foi analisado em Nanodrop 100 pela medida da absorbância 260/280. Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR, estas foram congeladas a -20° C para posterior uso em qPCR⁸⁸.

3.14.1 qPCR

Para a qPCR foi utilizado o primer LinJ31 e sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5’ foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxi-fluoresceína). Na extremidade 3’ foi ligado um *quencher* NFQ (*non-fluorescent quencher*). O desenho das sequências foi: LINJ31F: 5'- CCG CGT GCC TGT CG -3'; LINJ31R 5'- CCC ACA CAA GCG GGA ACT -3' e a sonda TaqMan 5'- CCTCCTTGGACTTTGC -3'. As reações foram realizadas em sistema ABI 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems), em um volume final de 20 µL por reação. Ao volume de 3 µL de cDNA foi adicionado um reagente contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG), 1 µL da solução que inclui os marcadores *forward* e *reverse* na concentração de 18 µM e a sonda TaqMan, marcada com FAM, usando NFQ como *quencher* na concentração de 5

µM. Para as amplificações da curva padrão foram utilizados dois controles negativos. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos; para melhor atividade da AmpliErase UNG, foi adicionado uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa constituiu de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto^{88,89}.

3.15 Estudos farmacocinéticos (*in vivo*)

Para avaliar os parâmetros farmacocinéticos *in vivo*, ambas as formulações de nitazoxanida [nitazoxanida livre (NTZ) e nitazoxanida lipossomal (NTZ-LP)] foram administradas intraperitonealmente em fêmeas de camundongos BALB/c (n=3/estudo) e monitoradas em um período total de oito horas. Para isso, amostras de sangue (10 µL) foram retiradas de cada animal logo após a administração intraperitoneal, utilizando os tempos de 1, 3, 5, 10, 20, 40 minutos e 1, 2, 4, 6, 8 horas. Após a preparação das amostras, as concentrações de NTZ e NTZ-LP foram determinadas no sangue através de UPLC-MS/MS. Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos a partir da curva de concentração no sangue e tempo, utilizando o programa PK solutions v 2.0 (Summit Research Services, EUA).

3.16 Análises estatísticas

As CE₅₀s e CC₅₀s dos compostos analisados foram determinadas por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando o software Graph Pad Prism 5.0, analisando os intervalos de confiança 95% e os coeficientes lineares. Diferenças entre amostras foram comparadas com os fármacos padrões (Glucantime®, anfotericina B e/ou miltefosina) e estatisticamente avaliadas por meio dos valores de p (p<0.05 Student T test ou Anova). Os experimentos *in vitro* foram realizados

em triplicata, em dois ou três ensaios distintos. Os experimentos *in vivo* foram realizados com $n=5$ em dois ensaios distintos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram separados por capítulos para facilitar a compreensão.

CAPÍTULO 1

4.1 TRIAGEM DE FÁRMACOS REPOSICIONADOS

4.1.1 Reposicionamento de Fármacos: Fluxograma de trabalho da NTZ

4.1.1.1 Determinação da CE₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de *L.*

(*L.*) *infantum* e CC₅₀ em macrófagos peritoneais

Foi realizado o ensaio com o fármaco nitazoxanida (NTZ) contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, onde após 48 horas de incubação, o fármaco apresentou um valor de CE₅₀ de 194 µM. Com o objetivo de determinar os respectivos índices de seletividade para posterior ensaio no amastigota intracelular, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando macrófagos peritoneais, o qual demonstrou um valor de CC₅₀ de 68 µM. Posteriormente, foi realizado o estudo contra as formas amastigotas demonstrando um valor de CE₅₀ de 28 µM, exibindo ainda um índice de seletividade de aproximadamente 2,5 em relação à forma intracelular. Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos padrões e os valores se encontram na tabela 1.

Tabela 1 - Atividade anti-*Leishmania infantum* e citotoxicidade da nitazoxanida. Valores de CE₅₀ contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, CC₅₀ contra células de mamíferos (macrófagos peritoneais) e o respectivo IS.

Fármaco	Classe	Estrutura química	Promastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Amastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM) (IC95%)	IS
Nitazoxanida	anti-helmíntico		194 (165,5 - 227,2)	27,8 (26,3 - 29,4)	68,1 (58,3 - 79,7)	2,45*
anfotericina B	Fármaco padrão		0,16 (0,13 - 0,19)	0,07	56,6 (44,4 - 72,2)	809*

Glucantime	Fármaco padrão		na	25,0	>200	>8,0*
Miltefosina	Fármaco padrão		16,8 (15,4 - 17,5)	17,8 (11,6 - 24,6)	122,0 (94,8 - 157,0)	6,85*

CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; *seletividade no amastigota intracelular. A concentração do antimônio foi expressa em µg/mL devido a ausência na literatura da estrutura do antimonato de N-metil-glucamina.

Paralelamente, foi realizado, na Universidade de Dundee (Escócia), o ensaio com o fármaco NTZ e seu metabólito tizoxanida (TZX) contra as formas amastigotas de *L. (L.) donovani*, demonstrando valores de CE₅₀ de 10 e 7,9 µM, respectivamente. Utilizando monócitos THP-1, a citotoxicidade foi avaliada tanto para o fármaco quanto para seu metabólito, demonstrando valores de CE₅₀ maiores que 50 µM e um índice de seletividade maior que 5. Miltefosina foi utilizada como fármaco padrão e os valores se encontram na tabela 2.

Tabela 2 - Atividade anti-*Leishmania donovani* e citotoxicidade da nitazoxanida e tizoxanida. Valores de CE₅₀ contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) donovani*, CC₅₀ contra células de mamíferos (THP-1) e os respectivos IS. Valores expressos em µM.

Fármaco	Compostos	Estrutura da molécula	Amastigotas CE ₅₀ (µM)	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM)	IS
NTZ	Fármaco		10	>50	>5*
TZX	Metabólito		7,9	>50	>6*

CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50%; *seletividade no amastigota intracelular. Miltefosina: CE₅₀ amastigotas: 1 µM; CC₅₀ THP-1: 46,7 µM.

4.1.1.2 Avaliação da efetividade da nitazoxanida em modelos experimentais

Tendo em vista a atividade da nitazoxanida (NTZ) no amastigota intracelular, foi realizado o ensaio em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*, onde, após 40 dias de infecção, os animais foram tratados oralmente por 10 dias consecutivos a 100 mg/kg/dia, em dose única. Após 51 dias da infecção inicial, os animais foram eutanasiados, removidos fragmentos de baço e fígado e a densidade parasitária determinada por qPCR. Os resultados demonstraram que a NTZ não foi capaz de reduzir a densidade parasitária tanto no baço como no fígado durante o tratamento (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco nitazoxanida em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). NTZ foi administrada oralmente a 100 mg/kg/dia e a densidade parasitária determinada qPCR (* $p < 0,05$).

4.1.1.3 Estudo da NTZ lipossomal

Devido à falta de atividade da nitazoxanida na forma livre no modelo experimental, foi dado prosseguimento ao estudo com o fármaco encapsulado em sistema lipossomal. Sendo assim, os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação de lipídeos seguido por congelamento/descongelamento e, após a obtenção da formulação, a concentração foi determinada por espectrofotometria em

NanoDrop a 304 nm. A concentração (média entre três lotes) da formulação lipossomal, foi estimada em 828,8 µg/mL ($\pm$ 0.003). Uma curva padrão foi obtida com o fármaco livre a fim de determinar a concentração encapsulada (Figura 13).

Figura 13- Curva padrão da nitazoxanida, obtida em espectrofotômetro a 304 nm em NanoDrop-100.

Sendo assim, com o objetivo de determinar os respectivos índices de seletividade *in vitro* da NTZ-LP para posterior ensaio no amastigota intracelular, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando macrófagos peritoneais, o qual demonstrou um valor de CC_{50} de 10 µM. Posteriormente, foi realizado o estudo contra as formas amastigotas apresentando um valor de CE_{50} de 4,9 µM, exibindo ainda um índice de seletividade de aproximadamente 2. Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos padrões e a tabela 3 sumariza os resultados encontrados frente à NTZ-LP.

Tabela 3 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade da NTZ-LP. Valores de CE₅₀ contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, CC₅₀ contra células de mamíferos (macrófagos peritoneais) e o respectivo IS. Valores expressos em µM.

Fármacos	Amastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM) (IC95%)	IS
NTZ-LP	15,9 (15,6 - 16,6)	32,9 (17,31 - 49,8)	2*

CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; *seletividade no amastigota intracelular.

4.1.1.4 Captação in vitro da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais sadios e infectados com *L. (L.) infantum*

Considerando a atividade antiparasitária do fármaco lipossomal no amastigota intracelular, foi verificada sua captação por macrófagos sadios e infectados com *L. (L.) infantum* na presença da sonda fluorescente DIL (NTZ-LP-DIL). A figura 14 demonstra que a captação da NTZ-LP-DIL nos 15 minutos iniciais, ainda que não estatisticamente significativa, foi aproximadamente 1,5 vezes maior nos macrófagos infectados, quando comparado aos macrófagos sadios, seguida de uma queda similar para ambos os grupos nos primeiros 60 minutos incubação. Ainda assim, no período compreendido entre os 120 minutos iniciais, um perfil de captação semelhante foi visualizado para ambos os grupos, mantendo-se uma diferença de 50% entre os grupos. Esta diferença não foi mais observada após este período, uma vez que em 180 minutos, as curvas apresentaram perfil semelhante de captação. Adicionalmente, foi observado que apenas o grupo sadio resultou em um ligeiro aumento da captação do fármaco lipossomal. A figura 15 apresenta os macrófagos sadios (Figura 15 A) e macrófagos infectados (Figura 15 B) utilizados no estudo, corados por Giemsa®. A taxa de infecção foi de >95%.

Figura 14 - Captação da NTZ-LP-DIL por macrófagos peritoneais saudáveis e infectados com *L. (L.) infantum*, monitorados em espectrofluorímetro a cada 15 minutos (total de 360 minutos) utilizando filtros de excitação e emissão de 549 e 565 nm, respectivamente.

Figura 15 - Macrófagos peritoneais saudáveis e infectados, corados por giemsa e observados por microscopia de luz. A: saudáveis; B: infectados com *L. (L.) infantum*.

Adicionalmente, utilizando microscopia confocal, foi observada a internalização do fármaco lipossomal nos macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* após 180 minutos de incubação. Os lipossomos encapsulados com o fármaco NTZ foram marcados com o fluoróforo DIL-C18 e podem ser visualizados em vermelho, sendo que os núcleos dos macrófagos e das amastigotas, incluindo o cinetoplasto, são

observados na cor azul (DAPI) (Figura 16). Os resultados evidenciaram uma ampla captação do fármaco lipossomal após incubação, demonstrando uma distribuição homogênea no citoplasma dos macrófagos, bem como uma proximidade com os amastigotas no vacúolo parasitóforo (Figura 16, setas brancas).

Figura 16 - Internalização da NTZ-LP-DIL por macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, utilizando microscopia confocal. Os núcleos foram marcados na cor azul com DAPI, e a cor vermelha corresponde aos lipossomos (NTZ-LP-DIL). Setas brancas = proximidade dos lipossomos com os amastigotas.

4.1.1.5 Avaliação do diâmetro, carga e número de lamelas dos lipossomos frente à NTZ-LP

Para estudar os parâmetros físico-químicos da formulação lipossomal foram realizadas medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) tanto na presença como na ausência da NTZ. A figura 17 demonstra as curvas de SAXS em sistema unilamelar, ou seja, com ausência de picos estreitos e intensos, o que indicaria sistemas multilamelares. Adicionalmente, quando os lipossomos foram avaliados na presença do fármaco NTZ, foi possível notar que estes, não exerceram nenhuma influência específica sobre as curvas de SAXS, deixando claro que, nas condições estudadas, o fármaco NTZ não influenciou a estrutura da bicamada lipídica. Os parâmetros de ajustes para a curvas de SAXS estão sumarizados na tabela 4.

Figura 17 - Curva de SAXS do sistema lipídico. Pontos pretos: presença do fármaco NTZ; linha vermelha: melhor ajuste obtido. No *inset* as curvas de espalhamento dos sistemas. Em preto e vermelho, ausência e presença do fármaco, respectivamente.

Tabela 4 - Parâmetros de ajuste obtidos através da análise das curvas de SAXS.

	Lipídio 1	Lipídeo 2
w (%)	85.0±5.0	15.0±3.0
R _{pol} (Å)	10.6±0.5	5.7±0.3
R _{par} (Å)	13.0±0.6	20.5±0.3
R _{CH₃} (Å)	3.1±0.2	1.8±0.2
ρ _{pol} (e/Å ³)	0.42±0.01	0.43±0.01
ρ _{par} (e/Å ³)	0.32±0.01	0.30±0.01
ρ _{CH₃} (e/Å ³)	0.22±0.01	0.22±0.01

W: peso do modelo, R_{pol} e ρ_{pol}, assim como R_{par} e ρ_{par} e R_{CH₃} e ρ_{CH₃}: espessuras e densidades eletrônicas de cada uma das regiões da bicamada.

Para aferir o diâmetro dos lipossomos, a técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) foi realizada na presença e ausência do fármaco nitazoxanida. Os resultados demonstraram um valor de 169 nm para a NTZ-LP e um valor de 183 nm para a formulação lipossomal (sem fármaco) conferindo um valor menor que 200 nm.

A carga dos lipossomos também foi avaliada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) na presença e ausência do fármaco, resultando em um valor negativo -31 (±4) mV para a NTZ-LP e -56 (±2) mV para a formulação lipossomal (sem fármaco).

4.1.1.6 Avaliação da efetividade da NTZ-LP em modelos experimentais

Após investigação *in vitro* da NTZ-LP, foi realizado o ensaio em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*. Após 40 dias da infecção inicial, os animais foram tratados pela via intraperitoneal por 10 dias consecutivos a 2 mg/kg/dia com a NTZ-LP. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados, removidos fragmentos de baço e fígado e a densidade parasitária determinada por qPCR (Figura 18). Diferentemente do fármaco livre, a NTZ-LP foi capaz de reduzir a

densidade parasitária em 50% no baço e em 82% no fígado, quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Este dado representa um ensaio representativo dentre dois experimentos distintos.

Figura 18 - Avaliação da atividade *in vivo* da NTZ-LP em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). NTZ-LP foi administrada intraperitonealmente a 2 mg/kg e a densidade parasitária determinada qPCR (* $p < 0,05$).

4.1.1.7 Estudos farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados tanto para o fármaco livre (NTZ) como para o fármaco lipossomal (NTZ-LP) na Universidade de Dundee, utilizando o modelo de BALB/c e espectrometria de massas (Tabela 5). Devido às características de rápida metabolização da NTZ, a detecção do fármaco foi realizada com base no seu metabólito ativo, a tizoxanida (TZX). O estudo demonstrou que a NTZ apresentou um valor de concentração plasmática máxima (C_{max}) de 286 ng/mL, enquanto que a NTZ-LP resultou em um valor de 806 ng/mL. A área sob da curva (AUC) conferiu diferentes valores para as formulações: 3.419,6 ng-min/mL para NTZ e 13.992,6 ng-min/mL para NTZ-LP. Porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto ao tempo de meia vida plasmática

($T_{1/2}$) para ambas as formulações, sendo 6,5 minutos para a NTZ e 8,7 minutos para a NTZ-LP (Figura 19).

Tabela 5 - Dados farmacocinéticos da NTZ livre e encapsulada em sistema lipossomal.

	AUC (0-t) ng-min/mL	C _{max} (ng/mL)	T _{1/2} (min)
NTZ	3.419,6	286	6,5
NTZ-LP	13.992,6	806	8,7

AUC: área sob a curva; C_{max}: Concentração plasmática máxima; T_{1/2}: tempo de meia-vida plasmática.

Figura 19 - Estudo farmacocinético da tizoxanida, metabolito ativo da NTZ, após administração intraperitoneal em dose única de NTZ e NTZ-LP a 2 mg/kg em fêmeas de BALB/c.

4.1.1.2.1 DISCUSSÃO

Originalmente descoberta por Jean Francois Rossignol em 1970, a NTZ teve seu uso inicial como um agente anti-helmíntico veterinário, porém demonstrou efetividade contra parasitas intestinais bem como helmintos em infecções humanas^{90,91}. Aprovada em 2002 pelo FDA para o tratamento de criptosporidioses (*Cryptosporidium* spp.) e giardíase (*Giardia intestinalis*) como suspensão oral ou comprimidos, ficou comercialmente conhecida como Alinia® ou Annita^{90,92}. Destaca-se, ainda, a vasta comercialização da NTZ na América Latina e Índia para o tratamento de um amplo espectro de infecções parasitárias intestinais⁹².

A NTZ é um fármaco pertencente ao grupo das tiazolidas, sendo composto por um anel nitrotiazol e ácido salicílico, ligados entre si por uma amida. Este grupo tem demonstrado promissora atividade contra uma variedade de doenças. Belardo e colaboradores⁹³ demonstraram a atividade da NTZ contra o vírus da influenza A (H1N1, H3N2, H5N9, H7N1)⁹²⁻⁹⁴. A NTZ também demonstrou atividade anti-cancer⁹¹, atividade anti-coronavírus⁹⁴, atividade anti-HIV⁹⁵ bem como atividade anti-nematóides⁹⁶.

A atividade contra cinetoplastídeos têm sido amplamente investigada⁹⁷⁻¹⁰⁰. Chan-Bacab e colaboradores⁹⁷, demonstraram a atividade contra promastigotas de *L. (L.) mexicana* e epimastigotas de *T. cruzi* com valores de CE₅₀ na faixa de 2 e 5 µM, respectivamente. Navarrete-Vazquez e colaboradores⁹⁹ demonstraram atividade contra os mesmos parasitas, porém os valores de CE₅₀ foram na faixa de 6 e 18 µM, respectivamente. A atividade *in vitro* anti-*Leishmania* da NTZ foi descrita tanto para *L. donovani*⁹⁸, como para *L. infantum*¹⁰⁰. Os dados apresentados neste trabalho referente a atividade anti-promastigotas, demonstraram que a *L. infantum* foi cerca de 97 vezes mais resistente à NTZ quando comparada com *L. mexicana*.

Dados estes que poderiam ser explicados pelas diferenças entre as espécies estudadas, tendo em vista que estas desenvolvem doenças distintas no hospedeiro.

Por meio dos estudos de atividade antiparasitária no modelo de promastigota (extracelular) assim como de amastigota (intracelular), foi possível observar um incremento da potência em oito vezes quando o fármaco foi avaliado na forma intracelular. Este dado poderia estar correlacionado com uma possível imunomodulação da NTZ no macrófago, potencializando a atividade anti-*Leishmania*, uma vez que dados da literatura demonstraram que a NTZ diminuiu significativamente os níveis da citocina IL-6 em macrófagos tratados com o fármaco¹⁰¹. Considerando que o aumento dos níveis de IL-6 são considerados um fator que contribui diretamente para o desenvolvimento e exacerbação da doença¹⁰², esta diminuição poderia ser um dos fatores relacionados a potencialização do fármaco quando desafiado na forma intracelular do parasita.

A potência da NTZ em amastigota intracelular de *L. infantum* demonstrou ser aproximadamente 1,5 vezes menor quando comparada ao fármaco padrão miltefosina; quando avaliada em *L. donovani*, este valor sobe para 10 vezes menos potente. Considerando que a miltefosina é cerca de 16 vezes mais ativa para *L. donovani* quando comparada aos dados de *L. infantum*, o fármaco NTZ também seguiu o mesmo padrão, porém sendo cerca de 3 vezes mais potente para *L. donovani* do que para *L. infantum*. A literatura demonstra que um mesmo fármaco pode apresentar valores de CE₅₀ bastante distintos quando avaliados em espécies diferentes. Reimão e colaboradores⁸⁷ demonstraram que a buparvaquona foi cerca de 30 vezes mais potente para *L. donovani* do que para *L. infantum* no modelo de amastigota intracelular.

A literatura descreve, ainda, que a NTZ é considerada um pro-fármaco, exercendo sua atividade após metabolização¹⁰³. Em um recente trabalho,

utilizando diferentes modelos animais, foi observado que após metabolização, a NTZ resultou em seis metabólitos, sendo estes a tizoxanida, tizonaxida hidroxilada, tizoxanida glucuronida, tizoxanida glucose, sulfato de tizoxanida e a hidroxil tizoxanida¹⁰⁴. O presente estudo avaliou também a atividade da tizoxanida (TZX) em *Leishmania (L.) donovani* e demonstrou, pela primeira vez na literatura, que tanto a NTZ quanto seu metabólito apresentaram atividade e potência similares no modelo de amastigota intracelular.

Tendo em vista que Don e Ioset⁶³ tenham sugerido algumas características específicas de fármacos que possam ser considerados *hits* (candidatos) promissores, os autores sugerem cautela ao se avaliar o prosseguimento dos estudos em *Drug Discovery*. Até hoje, não existe um valor considerado adequado ou até mesmo ideal de índice de seletividade para posterior avaliação animal, no entanto, neste trabalho, foram adotados IS que fossem relevantes e possivelmente próximos aos valores dos fármacos utilizados na clínica para o tratamento das leishmanioses. Apesar da NTZ não ter demonstrado valores promissores *in vitro* (IS 2,5), o fármaco demonstrou atividade prévia em modelo murino de *L. (L.) donovani*, não sendo tóxico nas doses utilizadas⁹⁸. Conforme observado no presente trabalho, a miltefosina também vem demonstrando valores de IS bastante limitados (IS 7), porém, é aplicada como tratamento clínico na Índia e vem sendo amplamente avaliada tanto para leishmaniose tegumentar quanto para leishmaniose visceral em estudos clínicos¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Sendo assim, valores *in vitro* de IS podem ser considerados como um importante direcionamento para a escolha de novos candidatos a ensaios experimentais, porém não podem ser considerados um fator limitante único para a exclusão do candidato a fármaco.

Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez na literatura a atividade *in vivo* anti-*Leishmania (L.) infantum* (espécie visceral do novo mundo) da NTZ, ponto

este que vem sendo muito destacado pela OMS, a qual sugere uma busca por fármacos com atividade em diferentes espécies do parasita, como também em cepas resistentes aos fármacos utilizados na clínica. Sendo assim, a NTZ demonstrou ser efetiva tanto para *L. (L.) infantum* quanto para *L. (L.) donovani*.

Devido à atividade *in vitro* no amastigota intracelular, foi investigado o possível potencial *in vivo* do fármaco em modelo experimental. Os resultados demonstraram que a NTZ não foi capaz de reduzir a densidade parasitária tanto no baço como no fígado na dose de 100 mg/kg/dia durante 10 dias de tratamento oral. Diferentemente dos achados de Zhang e colaboradores⁹⁸ em modelo murino (BALB/c) infectado com *L. donovani*, onde após 10 dias de tratamento oral com o medicamento (comprimido) a 400 mg/kg/dia tiveram uma redução da densidade parasitária de aproximadamente de 90%, tanto no baço como no fígado. Vale destacar que o modelo proposto no presente trabalho, a dose administrada foi 4 vezes menor do que a dose administrada por Zhang e colaboradores⁹⁸, porém levando em consideração a dose utilizada na clínica da NTZ, bem como a DL₅₀ oral em roedores ser de até 10 g/kg¹⁰³, foi optado por não aumentar as doses na tentativa de manter um patamar de segurança no estudo experimental.

Devido à falta de atividade do fármaco na forma livre, foi dado prosseguimento a um novo estudo, porém utilizando o sistema lipossomal. Tendo em vista o grande número de fármacos que não apresentam atividade antiparasitária no modelo animal por não atingirem o alvo, sistemas de liberação controlada e sustentada de fármacos, como os lipossomos, podem apresentar grande vantagem. O benefício de uma formulação lipossomal está relacionada ao direcionamento do fármaco ao órgão-alvo e, conseqüentemente, redução da quantidade do fármaco livre no organismo, diminuindo assim sua toxicidade^{109,110}.

Estudos da década de 70 já demonstram que o antimônio lipossomal foi cerca de

700 vezes mais efetivo do que o fármaco livre⁴⁹. Assim como a anfotericina B lipossomal (Ambisome®), fármaco disponível na clínica para o tratamento da leishmaniose, demonstra melhor eficácia e segurança que qualquer outro fármaco aprovado. Neste âmbito, foram preparados lipossomos carregados negativamente com fosfatidilserina, devido à rápida fagocitose por macrófagos bem como o maior direcionamento aos órgãos-alvo da doença em estudo (baço e fígado).

Tendo em vista a importância da caracterização físico-química frente a nova formulação lipossomal de NTZ, neste trabalho foram apresentados lipossomos com diâmetro inferior a 200 nm e carga negativa em membrana unilamelar. Apesar do fármaco ter causado interferência na carga da membrana, este não foi capaz de alterar a mesma, que se manteve negativa mesmo após a encapsulação da NTZ. Alterações físico-químicas de vesículas lipossomais são descritas na literatura quando se encapsula fármacos lipossolúveis, porém no presente estudo não foi observado significativa alteração do tamanho das vesículas quando comparados aos lipossomos sem o fármaco, demonstrando pouca interferência do fármaco na formulação. O número de lamelas também é um fator considerável dentro de um sistema lipossomal, uma vez que este pode auxiliar na quantidade de fármaco encapsulado, ou seja, quando se trabalha com um fármaco lipossolúvel, quanto maior o número de lamelas, em teoria, uma maior quantidade de fármaco poderia ser encapsulada.

Adicionalmente, quando se projeta um sistema lipossomal, deve-se atentar para dois importantes fatores: i) a porcentagem de encapsulação do fármaco; e ii) a estabilidade da formulação. Nesta tese não foram abordados estudos físico-químicos quanto à estabilidade da formulação; porém, nossos estudos *in vitro* de atividade anti-amastigota, demonstraram que a formulação não sofreu alterações

após sete dias de preparo quando armazenada em solução na temperatura de 4°C (dados não mostrados).

A interação dos lipossomos com as células-alvo é uma das principais características a se estudar quando se deseja projetar um sistema de liberação controlada de fármacos¹¹¹. A carga negativa vem sendo considerada como um importante atributo para explicar a eficiência da formulação frente a macrófagos¹¹². O direcionamento de lipossomos contendo fosfatidilserina a células do sistema fagocítico mononuclear, têm se mostrado bastante promissor^{112,113}, uma vez que os receptores *scavenger* classe B (SR-B e CD36) vêm se mostrando como os principais receptores responsáveis pela rápida eliminação destes do compartimento sanguíneo^{112,114,115}. Além disso, foi demonstrado que macrófagos infectados com *Leishmania infantum* apresentam uma maior expressão de receptores *scavenger* CD36, sendo este um importante atributo para a escolha deste tipo de formulação com carga negativa¹¹². Há de se salientar, ainda, que o tamanho dos lipossomos possui forte influência na captação por macrófagos, ou seja, lipossomos maiores (> 1000 µm) seriam captados mais rapidamente pelos macrófagos. Sendo assim, a presente formulação teve como base o preparo de lipossomos SUVs, na tentativa de estabelecer um sistema de direcionamento tanto seletivo como sustentado uma vez que lipossomos com diâmetro menor de 200 nm possuem um menor risco de obstrução de capilares quando comparado aos LUVs e MLVs, além do maior direcionamento à medula óssea⁵¹⁻⁵³.

Posteriormente, foi dado prosseguimento ao trabalho através da avaliação da atividade biológica da formulação de NTZ lipossomal, comparando com a NTZ livre. Quando comparado os valores de CE₅₀ *in vitro* na forma intracelular do fármaco (NTZ) e da formulação lipossomal (NTZ-LP), foi possível verificar que o fármaco quando lipossomal, aumentou cerca de 2 vezes sua atividade nos

amastigotas intracelulares, sem alteração da toxicidade. Aumento de potência *in vitro* de fármacos quando encapsulados em lipossomos são descritos na literatura. Tempone e colaboradores¹¹² demonstraram que o antimônio pentavalente quando encapsulado no mesmo tipo de formulação foi mais efetivo contra amastigotas de *L. infantum* quando comparado ao antimônio livre¹¹².

Objetivando comparar a cinética de captação da nitazoxanida lipossomal *in vitro* por macrófagos sadios e infectados com *L. (L.) infantum*, a sonda fluorescente DIL C18 foi utilizada como marcador dos lipossomos captados. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os descritos por Borborema e colaboradores¹¹⁶ onde visualizaram maior captação de antimônio por macrófagos infectados com *Leishmania major* quando encapsulados em lipossomos carregados negativamente. Os autores justificam, ainda, que esta maior captação poderia estar envolvida na diferença de atividade metabólica dos macrófagos quando estes estão infectados com os parasitas¹¹⁶. Considerando, ainda, que lipossomos contendo carga negativa são captados preferencialmente por receptores scavenger de macrófagos, este aumento de captação poderia ser explicado pela maior expressão de receptores scavenger em macrófagos infectados¹¹². Adicionalmente, após 180 minutos de captação dos lipossomos, o grupo não infectado demonstrou ter uma captação ligeiramente maior, fato este que poderia ser explicado pelo espaço citoplasmático do macrófago, onde o grupo infectado com os amastigotas poderia estar apresentando um espaço limitado desfavorecendo uma maior captação quando comparado ao grupo não infectado. Posteriormente, com o objetivo de confirmar se a distribuição da NTZ-LP estaria apenas associada à superfície ou internalizada nos macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, uma análise através da microscopia confocal foi realizada. As imagens demonstraram uma internalização maciça dos lipossomos após 180 minutos e distribuição homogênea

pelo citoplasma. Tempone e colaboradores⁸⁶, utilizando o modelo de biodistribuição animal, demonstraram a co-localização *Leishmania*/lipossomo de uma mesma formulação lipossomal, porém contendo o fármaco furazolidona, tanto em fígado quanto em baço.

Com base nos resultados obtidos pelo grupo com diferentes fármacos encapsulados^{86,87,112,117}, a atividade da nitazoxanida poderia ser melhorada quando encapsulada em lipossomos contendo fosfatidilserina, diminuindo-se drasticamente a dose.

Sendo assim, a NTZ foi encapsulada pela primeira vez em sistema lipossomal e desafiada em testes pré-clínicos. Diferentemente da forma livre, a NTZ-LP foi capaz de reduzir a densidade parasitária em 50% no baço e em 82% no fígado. Apesar de tentativas de melhoria da eficiência de encapsulação da NTZ terem sido realizadas, as concentrações máximas se limitaram a menos de 1 mg/mL. Outras técnicas de preparo de lipossomos, além da hidratação do filme seguido da técnica de congelamento-descongelamento, poderiam ser futuramente utilizadas visando maiores concentrações do fármaco e consequentemente, possibilitando maiores doses administradas nos animais.

A metabolização de fármacos é fator essencial a ser considerado quando se investiga a atividade em um sistema biológico. O fármaco NTZ é rapidamente hidrolizado em seu metabólito tizoxanida (desacetil-nitazoxanida - TZX), porém, apesar de ser considerado um inibidor promíscuo para o complexo enzimático citocromo P450 (CYP), dentre as principais enzimas (CYP 2C9, CYP 2D6, CYP 1A2, CYP 3A4, CYP 2C9), a NTZ não é considerada substrato, inibindo as CYP 3A4 e CYP 2C9¹⁰³. O presente trabalho realizou estudos da atividade anti-*Leishmania* do metabólito tizoxanida, o qual também demonstrou que tanto o fármaco quanto o metabólito apresentaram potência similar no modelo *in vitro* de

Leishmania donovani. Os dados deste trabalho corroboram os dados da literatura; Chan-Bacab e colaboradores⁹⁷ demonstraram que a NTZ e a TZX apresentaram valores similares de CE₅₀ de 1,8 e 1,6 µM para *L. mexicana*, respectivamente, bem como valores de CE₅₀ de 5,7 µM e 4,6 µM contra *T. cruzi*. Ainda assim, Navarrete-Vazquez e colaboradores⁹⁹, demonstraram valores de CE₅₀ de 6,18 e 6,19 µM para *L. mexicana* e 18 e 17 µM para *T. cruzi* para NTZ e TZX, respectivamente.

Estudos de farmacocinética vêm sendo considerados de extrema importância nas fases iniciais de *Drug Discovery*, aumentando as chances de êxito já nos ensaios pré-clínicos, devido a possibilidade de adequação do regime de administração do fármaco no modelo animal⁶². Poucos estudos foram publicados sobre a farmacocinética da NTZ e da TZX na literatura, sendo assim, no presente trabalho, foi investigada a farmacocinética da NTZ livre e lipossomal em modelo de camundongo BALB/c, utilizando o metabólito TZX. Broekhuysen e colaboradores¹¹⁸, demonstraram que a nitazoxanida é metabolizada rapidamente em tizoxanida no plasma, assim como na presença de microssomos (*in vitro*), demonstrando uma meia vida plasmática de 6 minutos. Stockis e colaboradores¹¹⁹ também descreveram que o único composto detectável no plasma após administração oral de NTZ a 500 mg em humanos saudáveis foi a tizoxanida. Em função disto, o presente trabalho utilizou o metabólito ativo em *Leishmania* TZX para avaliar os estudos de farmacocinética em espectrometria de massas. Os resultados demonstraram que o tempo de meia vida plasmática (T_{1/2}) da TZX foi de apenas 7 minutos, resultados similares foram achados por Broekhuysen e colaboradores¹¹⁸ em humanos. Porém, Zhao e colaboradores¹²⁰, demonstraram uma T_{1/2} de 210 minutos (3,5 h) em modelo animal de cabra. Os estudos da NTZ lipossomal (NTZ-LP) demonstraram uma T_{1/2} similar ao fármaco livre, porém, tanto a área abaixo da curva (AUC) quanto a concentração máxima plasmática (C_{max}) resultaram em valores 4 vezes maiores em

relação ao fármaco livre. Esses dados indicam que a formulação lipossomal modificou significativamente o comportamento do fármaco no organismo, aumentando a concentração e exposição da TZX. Este fato poderia explicar o tratamento experimental observado no modelo de hamster quando administrada em baixas doses de NTZ a 2 mg/kg. Estes dados demonstram a necessidade de um eficiente sistema de liberação controlada para a NTZ no modelo experimental de LV.

Até 2014, a grande maioria dos estudos em modelo experimentais (pré-clínicos) realizavam estudos farmacocinéticos em fases tardias, resultando em baixa otimização do estudo. Após junho de 2014, o grupo da farmacêutica *Novartis*, observando a baixa produtividade em termos de saída de novos candidatos a fármacos da fase experimental, sugeriu a implementação tanto do PK quanto do PD nas fases iniciais da pesquisa. Este fato introduziu recentemente um novo conceito sobre as etapas de *Drug Discovery*, ideia esta que foi corroborada no presente estudo. Caso os estudos de farmacocinética tivessem sido realizados anteriormente à fase de testes experimentais, um melhor regime de administração poderia ter sido empregado, com aumento na frequência das doses diárias numa tentativa de manutenção dos níveis plasmáticos por períodos mais prolongados, na tentativa de melhorar a eficácia do fármaco⁶².

Apesar do *TCP* proposto pelo DNDi considerar que apenas fármacos que eliminem >95% da infecção possam ser considerados promissores, a antecipação dos estudos de PK poderiam aumentar as chances de êxito do fármaco por meio da escolha de um regime apropriado.

4.1.2 Reposicionamento de Fármacos: Antagonistas de Receptor H1 de Histamina

4.1.2.1 Determinação da CE₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e CC₅₀ em células NCTC da farmacoteca de reposicionamento: antagonistas de receptor H1 de histamina

Com base em estudos prévios, foi realizada uma triagem composta por 10 fármacos antagonistas de receptor H1 de histamina tanto para as formas promastigotas como para as formas amastigotas de *L. (L.) infantum*. Dentre os compostos analisados, 8 demonstraram atividade contra as formas promastigotas com valores de CE₅₀ entre 13 à 84 µM. Com o objetivo de determinar os respectivos índices de seletividade para posterior investigação no amastigota intracelular, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando células NCTC, onde os valores de CC₅₀ variaram entre 57 à >200 µM. Posteriormente, o estudo contra as formas amastigotas foi realizado com os 10 antagonistas de H1, onde somente um fármaco, cinarizina, apresentou atividade anti-amastigota com valor de CE₅₀ de

21,53 μM (Tabela 6). Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos padrões e os valores se encontram na tabela 6. As estruturas químicas dos compostos se encontram na figura 20.

Tabela 6 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade dos antagonistas de receptor H1 de histamina. Valores de CE_{50} contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, CC_{50} contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e os respectivos IS. Valores expressos em μM .

Fármaco	Promastigotas CE_{50} (μM) (IC 95%)	Amastigotas CE_{50} (μM) (IC95%)	Citotoxicidade CC_{50} (μM) (IC95%)	Índice de Seletividade
Cetirizina	Na	na	>200	nd
cetotifeno	13,5 (10,8 - 16,7)	na	86,9 (61,0- 123,8)	nd
cinarizina	34,1 (30,4 - 38,3)	21,53 (18,6 – 25,0)	87,5 (65,6 - 116,6)	4,06*
clorfeniramina	15,1 (13,7 - 16,5)	na	87,4 (65,4 - 116,8)	nd
fexofenadina	Na	na	>200	nd
flunarizina	27,6 (26,2 - 29,1)	na	77,1 (71,2 - 83,6)	nd
hidroxizina	59,6 (58,4 - 60,8)	na	159,5 (148,7 - 171,1)	nd
loratadina	52,9 (31,5 - 89,1)	na	69,5 (55,7 - 86,8)	nd
quetiapina	84,6 (79,5 - 90,2)	na	>200	nd
risperidona	19,7 (16,5 - 23,6)	na	57,9 (49,6 - 67,5)	nd
anfotericina B	0,16 (0,13 - 0,19)	0,07	56,6 (44,4 - 72,2)	809*
Glucantime®	Na	25,0	>200	>8,00*
miltefosina	16,8 (15,4 - 17,5)	17,8 (11,6 - 24,6)	122,0 (94,8 - 157,0)	6,85*

CE_{50} : concentração efetiva 50%; CC_{50} : concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; na: não ativo; nd: não determinado; *seletividade em amastigota intracelular. A concentração do antimônio foi expressa em $\mu\text{g/mL}$ devido a ausência na literatura da estrutura do antimônio de N-metil-glucamina.

1

2

3

4

5

6

Figura 20 - Estruturas químicas dos antagonistas de receptor H1 de histamina. 1. cetirizina; 2. cetotifeno; 3. cinarizina; 4. clorfeniramina; 5. fexofenadina; 6. flunarizina; 7. hidroxizina; 8. loratadina; 9. quetiapina; 10. risperidona. Fonte: PubmedCompound.

4.1.2.2 Avaliação da efetividade da cinarizina livre e lipossomal em modelos experimentais *in vivo*

Devido à atividade da cinarizina (CNZ) no amastigota intracelular, foi realizado o estudo experimental *in vivo*. Sendo assim, hamsteres previamente infectados com 1×10^8 amastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratados por 8 dias consecutivos, utilizando duas vias: i) via intraperitoneal (i.p.) a 50 mg/kg/dia; ii) via oral (v.o.) a 100 mg/kg/dia. Após 49 dias da infecção inicial, foram removidos fragmentos de baço e fígado e a carga parasitária determinada por PCR em tempo

real (qPCR), onde após a extração do RNA, foram processadas em cDNA e o número de parasitas determinado através da curva padrão com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*⁸⁷.

Os resultados demonstraram que a CNZ não foi capaz de reduzir a carga parasitária após o tratamento pelas duas vias de administração estudadas nas diferentes concentrações testadas, tanto no baço como no fígado (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco CNZ livre em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). A CNZ livre foi administrada a 50 mg/kg (i.p.), 100 mg/kg (v.o.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (* $p < 0,05$).

Devido à falta de atividade da CNZ na forma livre, foi realizado o estudo com o fármaco encapsulado em sistema de liberação controlada e sustentada, como os lipossomos. Desta forma, os lipossomos foram preparados pelo método de hidratação de lipídeos seguido por uma etapa de congelamento-descongelamento, onde após a obtenção da formulação, a concentração do fármaco foi determinada por espectrofotometria em NanoDrop a 251 nm. A concentração média da formulação lipossomal de CNZ nos diferentes lotes preparados (n=5) foi de 628,97 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm\text{SD } 0,031$). Uma curva padrão foi obtida com o fármaco livre a fim de determinar a concentração encapsulada (Figura 22).

Figura 22 - Curva padrão da cinarizina, obtida em espectrofotômetro a 251 nm em NanoDrop-100.

Posteriormente, hamsters previamente infectados conforme descrito acima, foram tratados pela via intraperitoneal com CNZ lipossomal (CNZ-LP) a 3 mg/kg/dia por 8 dias consecutivos. Neste experimento, foi observado uma redução na densidade parasitária em 54% no fígado (Figura 23 B), porém, nenhuma redução da infecção foi detectada no baço (Figura 23 A).

Figura 23 - Avaliação da atividade *in vivo* da CNZ-LP em hamsters infectados com *L. infantum* (A: baço; B: fígado). A CNZ-LP foi administrada a 3 mg/kg (i.p.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (*p<0,05).

4.1.2.2.1 DISCUSSÃO

A busca por novos fármacos pode exigir longos períodos de estudos, grandes recursos financeiros e um elevado risco de investimento. Diante da problemática terapia da leishmaniose visceral, a triagem de fármacos desenvolvidos para outro propósito, ou seja, fármacos disponíveis na clínica médica para tratar outras doenças vêm se apresentando como uma das abordagens mais rápidas e eficazes para a introdução de novas terapias, conhecida como reposicionamento de fármacos. O reposicionamento de fármacos se destaca, ainda, como uma estratégia de menor custo e médio prazo^{66,67} com vastos exemplos na própria terapia da leishmaniose, como o caso do antimônio, da pentamidina, da anfotericina B, bem como os azóis (cetoconazol, itraconazol, etc) utilizados inicialmente para tratar infecções fúngicas¹²¹, além da miltefosina, desenvolvida para o tratamento de câncer²⁷.

Anti-histamínicos antagonistas de receptores H1 são fármacos que se ligam seletivamente a receptores H1 de histamina, sem ativá-los, bloqueando assim, sua ação endógena. Têm ação nos brônquios, vasos capilares e alguns outros músculos lisos¹²². A histamina é um composto orgânico envolvido em respostas imunológicas locais bem como na regulação da função fisiológica no intestino agindo como um neurotransmissor¹²³.

Neste trabalho foi demonstrada, pela primeira vez, a atividade *in vitro* de uma classe de anti-histamínicos contra *L. (L.) infantum*. Dentre os fármacos analisados, oito demonstraram atividade contra as formas extracelular, porém somente o fármaco cinarizina demonstrou seletividade frente ao amastigota intracelular, com uma eficácia semelhante à miltefosina. Embora macrófagos expressem receptores H1 de histamina¹²⁴ o que poderia contribuir para a entrada

do fármaco no meio intracelular, a falta de atividade da maioria dos fármacos nos amastigotas poderia ser atribuída à maior resistência do parasita na forma intracelular, possivelmente devido às diferenças do metabolismo quando comparado à forma extracelular bem como todas as barreiras pela qual o fármaco necessita passar até atingir os amastigotas dentro dos macrófagos.

Considerando os oito antagonistas de H1 (ativos nas formas promastigotas), um perfil químico semelhante pôde ser observado entre quatro fármacos (cinarizina, flunarizina, hidroxizina e quetiapina), como a presença do anel piperazínico (Figura 20). O anel piperazínico consiste em uma estrutura de seis átomos, contendo dois átomos de nitrogênio em posições opostas no anel e vem sendo bastante explorado como um protótipo promissor para a síntese de novos compostos anti-*Leishmania*¹²⁵⁻¹³⁰. Um exemplo de fármaco de sucesso na clínica que contém o anel piperazínico, é o caso do cetoconazol, um agente antifúngico, reposicionado para a terapia da leishmaniose cutânea¹³¹. Além disso, a piperazina é à base de muitos compostos antihelmínticos, relatados desde a década de 50¹³². A atividade de outros antagonistas de H1 também foi descrita por Weis e colaboradores¹³³ contra *Mycobacterium tuberculosis*, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 6 µg/mL, bem como Tao e colaboradores¹³⁴ sintetizaram uma série de 1,4-diarilpiperazinas com potencial atividade anti-*Pneumocystis*.

Compostos piperazínicos tem demonstrado grande variedade de atividade antiprotozoária. Keenan e colaboradores¹³⁵ descreveram a atividade contra *Trypanosoma cruzi*, assim como, Donkor e colaboradores¹³⁶ sintetizaram uma série de 1,4-diarilpiperazinas demonstrando atividade anti-*Trypanosoma*¹³⁶, anti-*Plasmodium falciparum*¹³⁷ e anti-*Leishmania donovani*¹²⁵. Este trabalho corrobora o potencial antiprotozoário de compostos piperazínicos e descreve, pela primeira vez, a atividade *in vivo* de um fármaco antihistamínico, a cinarizina. A cinarizina também

é considerada um bloqueador de canal de cálcio (BCC) o qual inibe as contrações de células do músculo liso vascular. Atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* de BCCs também foram descritas por Reimão e colaboradores¹³⁸, onde demonstraram a atividade de oito BCC contra as formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, com valores de CE₅₀ entre 5 a 176 µM.

Considerando o efeito da cinarizina contra o amastigota intracelular, forma relevante da doença, seu possível potencial *in vivo* foi investigado, utilizando o modelo experimental de hamster infectado, onde após 8 dias de tratamento, com duas diferentes concentrações (50 e 100 mg/kg) e duas diferentes vias de administração (intraperitoneal e oral), a densidade parasitária não foi reduzida tanto no baço como no fígado. A falta de eficácia poderia ser atribuída a problemas farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos ou simplesmente não ter atividade em um sistema mais complexo como no caso *in vivo*, pelo fato do fármaco não chegar ao alvo, problema este que poderia ser contornado por meio de sistemas de liberação e direcionamento de fármacos. Estes são constituídos por formulações farmacêuticas com o intuito de aprimorar o índice terapêutico dos fármacos, reduzindo a dose e consequentemente a toxicidade^{86,139}. Tempone e colaboradores⁸⁶ demonstraram alta eficácia do fármaco furazolidona em modelo experimental de *L. (L.) infantum* quando encapsulado em lipossomos negativamente carregados contendo fosfatidilserina. A carga negativa dos lipossomos demonstrou melhor eficácia, o que provavelmente direcionou o fármaco no sítio alvo por meio da interação com os receptores “*scavenger*” de macrófagos, permitindo uma possível fusão com o vacúolo parasitóforo^{86,112}. A eficácia dos lipossomos carregados negativamente também foi demonstrada por Reimão e colaboradores⁸⁷, utilizando o fármaco buparvaquona onde, após encapsulação, foi

verificada potente atividade anti-*Leishmania*, efeito este não observado com o fármaco na forma livre.

No presente estudo, a CNZ foi encapsulada em lipossomos contendo fosfatidilserina, a qual demonstrou eficácia quando comparada ao fármaco livre, reduzindo a densidade parasitária em 54% no fígado. Embora a CNZ-LP tenha demonstrado falta de eficácia no baço, diferentes alternativas poderiam ser utilizadas para melhorar o tratamento *in vivo*, assim como diferentes vias de administração, ampliação nos dias de tratamento, utilização de doses mais elevadas e principalmente estudos farmacocinéticos.

Neste trabalho, foi demonstrado pela primeira vez na literatura a atividade anti-*Leishmania* de antagonistas de receptor H1 de histamina. Considerando a estratégia de reposicionamento como uma ferramenta para a introdução de um novo fármaco contra a LV, a qual demandando menor tempo e custo na pesquisa⁶⁷, seria bastante apropriado a ampliação do número de antagonistas de receptor H1 de histamina a serem testados contra as formas amastigotas intracelulares. Além disso, deveria ser considerando ainda, a ampliação das espécies de *Leishmania* testadas, incluindo também cepas resistentes aos fármacos disponíveis na clínica⁶³.

Ainda assim, outra estratégia que poderia ser abordada, porém, implicando em maiores custos e tempo na obtenção do fármaco⁶⁷ seria a modificação estrutural por meio de síntese orgânica, utilizando como protótipo, a cinarizina. Na literatura encontram-se exemplos na área de protozooses, onde fármacos foram potencializados em seus efeitos a partir de pequenas modificações estruturais. Um exemplo de sucesso inclui o caso do artesunato, um derivato sintético da artemisinina. A artemisinina apresenta um valor *in vitro* de 74 nM contra *Plasmodium falciparum*, enquanto que seu derivado sintético, o artesunato apresenta um valor de 16 nM, cerca de cinco vezes menor⁷³.

Por fim, outra estratégia que poderia ser incluída seria o estudo de combinação terapêutica, onde, por meio da técnica de isobologramas, fármacos utilizados na clínica da LV poderiam ser associados à cinarizina, resultando em possíveis combinações sinérgicas ou supra-aditivas, que contribuíssem com maior ação, redução das doses, efeitos adversos, resistência, proporcionando assim uma maior aderência dos pacientes em relação ao tratamento.

Como consequência do estudo, os resultados foram publicados na revista científica *Acta Tropica* e podem ser encontrados no Anexo 1.

4.1.3 Reposicionamento de Fármacos: Diversas classes terapêuticas

Apoiando a triagem empírica nesta etapa da tese, um trabalho recentemente publicado na *Science* demonstrou a importância do reposicionamento de fármacos na tentativa de acelerar o processo de descoberta, empregando um fármaco antigo frente a uma nova doença, ou seja, um novo uso para uma velha molécula. Johansen e colaboradores⁶⁶ visualizaram que, após triagem de 2.600 fármacos pertencentes a diferentes classes terapêuticas, dentre eles moduladores de receptor de estrogênio, anti-histamínicos, bloqueadores de canal de cálcio e anti-depressivos, somente 80 demonstraram atividade contra o vírus do Ebola. Sendo assim, nesta etapa do trabalho o estudo foi focado em dois fármacos pertencentes a duas diferentes classes terapêuticas: amiodarona (anti-arrítmico) e sertralina (anti-depressivo) que serão apresentados nos capítulos a seguir.

4.1.3.1 Reposicionamento de Fármacos: Amiodarona

4.1.3.2 Determinação da CE_{50} em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e CC_{50} em células NCTC

Foi realizado o ensaio contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* com fármaco amiodarona (AMD), onde após 48 horas de incubação, apresentou um valor de CE_{50} de 10,5 μM . O fármaco foi capaz de reduzir 100% a viabilidade dos promastigotas nas concentrações mais elevadas. Com o objetivo de determinar os respectivos índices de seletividade para posterior investigação nos amastigotas intracelulares, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando células NCTC, onde demonstraram um valor de CC_{50} de 30,9 μM . O estudo contra as formas amastigotas apresentou um valor de CE_{50} de 0,55 μM . A AMD exibiu, ainda, um índice de seletividade de aproximadamente 56 em relação à forma intracelular do parasita. Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos padrões e os valores se encontram na tabela 7.

Tabela 7 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade da amiodarona. Valores de CE_{50} contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (*L. infantum*), CC_{50} contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e o respectivo IS. Valores expressos em μM .

Fármaco	Classe	Estrutura da molécula	Promastigotas CE_{50} (μM) (IC95%)	Amastigotas CE_{50} (μM) (IC95%)	Citotoxicidade CC_{50} (μM) (IC95%)	IS
Amiodarona	anti-arritmico		10,5 (9,5 - 11,7)	0,55 (0,15 - 2,0)	30,9 (12,5 - 76,1)	56,2*
anfotericina B	Fármaco padrão		0,16 (0,13 - 0,19)	0,07	56,6 (44,4 - 72,2)	809*
Glucantime®	Fármaco padrão		na	25,0	>200	>8,0*
Miltefosina	Fármaco padrão		16,8 (15,4 - 17,5)	17,8 (11,6 - 24,6)	122,0 (94,8 - 157,0)	6,85*

CE_{50} : concentração efetiva 50%; CC_{50} : concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; *seletividade no amastigota intracelular. A concentração do antimônio foi expressa em $\mu g/mL$ devido a ausência na literatura da estrutura do antimonio de N-metil-glucamina.

4.1.3.3 Avaliação da efetividade da amiodarona em modelos experimentais

Tendo em vista a efetividade *in vitro* da AMD no amastigota intracelular, posteriormente foi realizado o ensaio em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*, onde após 40 dias de infecção os animais foram tratados por

10 dias consecutivos por duas diferentes vias de administração: intraperitoneal (50 mg/kg/dia) e oral (100 mg/kg/dia). Após 51 dias da infecção inicial, os animais foram eutanasiados, removidos fragmentos de baço e fígado e a densidade parasitária determinada por qPCR.

Os resultados demonstraram que o fármaco AMD não foi capaz de reduzir a densidade parasitária tanto no baço como no fígado durante o tratamento pela via intraperitoneal. Ainda que não significativo ($p < 0,05$), um aumento de 114% da infecção no baço e 38% da infecção no fígado foram observadas em relação ao grupo controle. Tendo em vista o tratamento oral, o fármaco também se mostrou incapaz de reduzir a infecção no baço (5% redução); em contra partida, a AMD foi capaz de reduzir em 20% a densidade parasitária no fígado, ainda que não estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 24). Os dados abaixo se referem a um ensaio representativo de dois experimentos distintos.

Figura 24 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco amiodarona em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). AMD foi administrada a 50 mg/kg/dia (i.p.); 100 mg/kg/dia (v.o.) e a densidade parasitária determinada por qPCR (* $p < 0,05$).

4.1.3.2.1 DISCUSSÃO

Tendo em vista a estratégia de reposicionamento de fármacos, e o grande impacto desta na terapia da leishmaniose^{27,28}, o fármaco amiodarona foi escolhido para os ensaios experimentais devido a promissora e inédita atividade *in vitro* contra *L. (L.) infantum*.

Considerando o modelo de amastigota intracelular, a AMD apresentou um elevado índice de seletividade, demonstrando que sua atividade antiparasitária foi cerca de 56 vezes maior do que sua toxicidade contra as células de mamíferos. Ainda, a AMD foi cerca de oito vezes mais seletiva quando comparada a miltefosina, fármaco utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia. Com base nos valores de CE₅₀ contra as formas amastigotas intracelulares, foi observado que a AMD apresentou ser cerca de 32 e 45 vezes mais potente que a miltefosina e o Glucantime®, respectivamente. Estes achados corroboram os dados descritos por Serrano-Martín e colaboradores¹⁴⁰, onde demonstraram promissora seletividade do fármaco AMD frente a *L. mexicana*, observando também valores de CE₅₀ maiores nos amastigotas (8 nM) quando comparado aos promastigotas (900 nM).

As atividades anti-*Leishmania amazonensis*¹⁴¹, anti-*Leishmania mexicana*¹⁴⁰ e anti-*Leishmania braziliensis*¹⁴² foram anteriormente descritas para AMD, tanto em modelos *in vitro* (promastigotas e amastigotas) como *in vivo*. Considerando que diferentes espécies podem resultar em sensibilidades diferentes frente a um mesmo fármaco¹⁴³, foi observado que a AMD resultou em valores muito próximos quando comparado às espécies causadoras da forma tegumentar e visceral, como por exemplo, a atividade anti-*L. amazonensis*, resultou em um valor de CE₅₀ de 0,46 µM conforme observado por de Macedo-Silva e colaboradores¹⁴¹, fato este

extremamente importante quando se desenvolve um fármaco para um complexo de doenças como as leishmanioses. No entanto, os dados apresentados neste trabalho são inéditos, uma vez que nenhum estudo havia sido realizado até o momento demonstrando o potencial da AMD contra a forma fatal da doença, a visceral.

Sintetizado como vasodilator coronário há mais de 50 anos, a amiodarona é um fármaco amplamente utilizado como potente anti-arrítmico¹⁴⁴. Um exemplo clássico associado ainda a doenças causadas por tripanosomatídeos inclui a prescrição do fármaco em pacientes chagásicos com comprometimento cardíaco. Complementarmente, a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* da AMD também foi comprovada tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, demonstrando um mecanismo de ação relacionado ao dano mitocondrial e inibição da síntese de ergosterol¹⁴⁵. Além disso, dados descritos por Paniz-Mondolfi e colaboradores¹⁴², demonstraram que a AMD induziu “cura parasitológica” em um único caso clínico de *L. (V.) braziliensis*, quando administrada na dose de 1.600 mg/dia nos 4 primeiros dias, seguido de uma dose de 800 mg/dia durante 3 semanas consecutivas. Adicionalmente, a amiodarona também possui ação inibindo os canais de cálcio¹⁴⁶; dados da literatura demonstraram a atividade de bloqueadores de canal de cálcio contra as formas amastigotas de *L. (L.) infantum*¹³⁸.

Considerando o potencial deste fármaco na literatura, assim como sua efetividade no modelo *in vitro*, foi realizado o estudo em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*. Atendendo aos critérios da OMS para novos candidatos orais na LV⁵, o presente estudo abordou tanto a administração oral como a intraperitoneal do fármaco. Os resultados apresentados demonstram claramente que, após 10 dias de tratamento, o fármaco foi incapaz de induzir qualquer tratamento nos órgãos-alvo (baço e fígado), mesmo quando administrados

por duas diferentes vias (oral e intraperitoneal). Dentre os fatores que poderiam ter contribuído para a falta de efetividade pela via oral, sugere-se a baixa e variável absorção do fármaco pelo trato gastrointestinal; dados da literatura descrevem que somente 20 a 55% do fármaco é encontrado na circulação pós-administração oral¹⁴⁷. Neste caso, futuras formulações farmacêuticas poderiam ser desenvolvidas na tentativa de promover uma melhor absorção do fármaco, como por exemplo, a produção de AMD em nanocristal, uma vez que esta técnica vem favorecendo o aumento da efetividade de fármacos, em função de uma melhor biodisponibilidade¹⁴⁸.

Considerando, ainda, que a dose máxima oral utilizada foi de 100 mg/kg/dia, esta pode não ter sido suficiente para atingir níveis plasmáticos adequados para a eliminação do parasita. Porém, levando em consideração os dados descritos na literatura, onde a dose letal 50% após administração intravenosa é de 227 mg/kg em camundongos¹⁴⁹, se doses mais elevadas fossem abordadas poderiam causar toxicidade nos animais, inviabilizando o estudo.

Outro importante fator que pode ter contribuído para a ausência de efetividade no modelo animal pode estar relacionado à metabolização do fármaco. A AMD tem sido descrita por ser extensamente metabolizada pelo fígado, via CYP450, especificamente a CYP2C8, resultando em um metabólito majoritário denominado desetilamiodarona¹⁵⁰. Apesar deste metabólito continuar apresentando atividade anti-arrítmica¹⁵¹, nada se sabe quanto ao seu potencial anti-*Leishmania*, fato este que poderia ser investigado na tentativa de explicar a ausência da atividade contra o parasita no modelo experimental.

A AMD é um fármaco que se enquadra na “Regra dos Cinco de Lipinski” (*Rule-of-five*)¹⁵² e apesar de estar em uso clínico, problemas relacionados ao elevado tempo de meia vida plasmática de aproximadamente 58 dias¹⁴⁷, e

consequente excreção lenta, podem ter resultado diretamente em toxicidade para o organismo^{153,154}. Apesar dos dados farmacocinéticos, a literatura reporta o uso diário da AMD em pacientes, justificando neste trabalho, a escolha do regime de administração no modelo experimental. Considerando o regime adotado tanto para a via oral quanto para a via intraperitoneal, é possível sugerir que o fármaco possa ter contribuído com uma toxicidade para o animal, visto que pela via intraperitoneal foi observado um aumento na densidade parasitária do baço cerca de 2 vezes maior em relação ao grupo controle. Inúmeros são os trabalhos na literatura que descrevem hepatotoxicidade frente ao fármaco AMD¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. É importante ressaltar, ainda, que um estudo de caso relatou a falência hepática após a administração intraperitoneal do fármaco em uma dose de 750 mg¹⁵⁵. De forma adicional, o fármaco possui propriedades extremamente lipofílicas com consequente acumulação no fígado, o que resulta em níveis teciduais 500 vezes mais elevados no fígado do que os encontrados na circulação¹⁵⁸. Plomp e colaboradores¹⁵⁹ também evidenciaram o elevado acúmulo do fármaco e seu metabólito em tecidos adiposos. Ainda assim, a toxicidade expressada nas doses mais elevadas após administração intraperitoneal da AMD pode estar associada ao mecanismo de ação do fármaco, o qual induz um estresse mitocondrial, agravado ainda por seu metabólito desetilamiodarona¹⁶⁰.

Em contra partida, a literatura demonstra a efetividade da AMD em modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar. Serrano-Martín e colaboradores¹⁶¹ demonstraram que após tratamento oral com amiodarona a 50 mg/kg/dia em modelo experimental de *L. mexicana*, o fármaco resultou em uma eficácia superior ao Glucantime®. Porém, os autores reportaram que após o decaimento do fármaco, foi observado a reativação da doença, indicando falha terapêutica¹⁶¹.

Apesar da elevada meia vida plasmática da AMD, estudos de combinação terapêutica vêm sendo realizados com fármacos na clínica da LV. Serrano-Martín e colaboradores¹⁶¹ demonstraram sinergismo *in vivo* do fármaco AMD quando administrado em associação com a miltefosina. A administração de 50 mg/kg/dia de amiodarona + 20 mg/kg/dia de miltefosina resultou em “cura parasitológica” em 90% dos animais, conforme avaliado por microscopia óptica, PCR e cultura celular¹⁶¹.

Tendo em vista a lenta eliminação da AMD no organismo, o que poderia provocar uma resistência dos parasitas perante ao fármaco, e a falta de atividade no modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*, não foi dado continuidade ao estudo. Ainda assim, estes achados podem servir como base para o desenho de novos derivados de AMD que possam resultar em candidatos com uma seletividade *in vitro* próxima ou superior àquela observada no protótipo, podendo ainda, proporcionar maior efetividade no modelo experimental de LV. Adicionalmente, dados na literatura indicam que dronedarona, pode ser um análogo potencial para futuros estudos *in vivo* contra *L. (L.) infantum* pelo fato do composto ser: i) análogo estrutural da amiodarona; ii) possuir uma meia vida plasmática muito inferior (~18 horas); iii) demonstrar valores *in vitro* contra *L. mexicana* mais promissores que amiodarona (promastigotas: 115 nM versus 900 nM / amastigotas: 0,65 nM versus 8 nM)¹⁶². Por fim, estudos com sistemas de liberação controlada e direcionada de fármacos, como os lipossomos contendo fosfatidilserina¹⁶³, poderiam ser uma alternativa bastante promissora para direcionar a AMD em doses mais baixas aos órgãos afetados pelo parasita, como fígado, baço e medula óssea.

4.1.4.1 Reposicionamento de Fármacos: Sertralina

4.1.4.2 Determinação da CE₅₀ em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e CC₅₀ em células NCTC

O ensaio contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foi realizado com o fármaco sertralina (SER), onde após 48 horas de incubação, demonstrou um valor de CE₅₀ de 3,6 µM. Com o objetivo de determinar os respectivos índices de seletividade para posterior análise no amastigota, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando células NCTC, o qual apresentou um valor de CC₅₀ de 18,4 µM. O estudo contra as formas amastigotas intracelulares exibiu um valor de CE₅₀ de 1,8 µM, bem como um índice de seletividade de 10. Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos padrões e os valores se encontram na tabela 8.

Tabela 8 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade da sertralina. Valores de CE₅₀ contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (*L. infantum*), CC₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e o respectivo IS. Valores expressos em µM.

Fármaco	Classe	Estrutura química	Promastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Amastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM) (IC95%)	IS
sertralina	anti-depressivo		3,6 (3,2 - 4,0)	1,8 (1,5 - 2,2)	18,4 (17,8 - 19,0)	10,28*
anfotericina B	Fármaco padrão		0,16 (0,13 - 0,19)	0,07	56,6 (44,4 - 72,2)	809*
Glucantime®	Fármaco padrão		na	25,0	>200	>8,0*
Miltefosina	Fármaco padrão		16,8 (15,4 - 17,5)	17,8 (11,6 - 24,6)	122,0 (94,8 - 157,0)	6,85*

CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; *seletividade no amastigota intracelular. A concentração do antimônio foi expressa em µg/mL devido a ausência na literatura da estrutura do antimoniato de N-metil-glucamina.

4.1.4.3 Avaliação da efetividade da sertralina em modelos experimentais *in vivo*

Devido à atividade *in vitro* da SER na forma relevante da doença, o amastigota intracelular, posteriormente foi realizado o estudo em modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*, onde após 40 dias da infecção os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos por duas diferentes vias de administração: intraperitoneal (25 mg/kg/dia) e oral (50

mg/kg/dia). Após 51 dias da infecção inicial, os animais foram eutanasiados, removidos fragmentos de baço e fígado e a carga parasitária determinada por qPCR.

Os resultados demonstraram que após administração intraperitoneal, a sertralina foi capaz de reduzir 15% da densidade parasitária no baço, porém, nenhuma redução da densidade parasitária foi evidenciada no fígado; ainda assim, a porcentagem de tratamento encontrada no baço não se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em contra partida, quando a SER foi administrada oralmente, o fármaco foi capaz de reduzir 58% a densidade parasitária no baço e 87% no fígado (Figura 25). Os dados apresentados deste grupo representam um único ensaio experimental.

Figura 25 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco sertralina em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). SER foi administrada a 25 mg/kg/dia (i.p.); 50 mg/kg/dia (v.o.) e a densidade parasitária determinada qPCR (* $p < 0,05$).

Embasados nos parâmetros farmacocinéticos na tentativa de aumentar a eficiência do tratamento oral, um novo experimento foi realizado com o fármaco sertralina, utilizando um regime de administração com duas diferentes doses e fracionadas em duas administrações diárias: grupo 1: (30mg/kg/2doses/dia) (total

dia = 60mg/kg); *grupo 2*: (15mg/kg/2doses/dia) (total dia = 30mg/kg). Após o tratamento, o *grupo 2* apresentou uma redução de 64% da densidade parasitária no baço e 84% no fígado. De forma similar, quando a SER foi administrada em uma dose duas vezes maior, 60mg/kg/dia (*grupo 1*), demonstrou uma redução de 64% da densidade parasitária no baço, porém, um aumento dos parasitas em 127% foi evidenciado no fígado, com um valor aproximadamente duas vezes maior que o controle (Figura 26). Os resultados apresentados demonstram um experimento representativo entre dois ensaios experimentais distintos.

Figura 26 - Avaliação da atividade *in vivo* do fármaco sertralina em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* (A: baço; B: fígado). SER foi administrada a 30; 60 mg/kg/dia (oral) e a densidade parasitária determinada qPCR (* $p < 0,05$).

4.1.4.2.1 DISCUSSÃO

Pertencente à classe dos antidepressivos e conhecidos por serem inibidores da recaptação de serotonina (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors* - SSRIs), a sertralina é um fármaco amplamente conhecido no tratamento da depressão, mas também utilizado para o tratamento de transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de pânico, transtorno pré-menstrual, bem como transtorno de ansiedade social¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Basicamente, o fármaco altera a quantidade de serotonina dentro do espaço sináptico, por meio da inibição da bomba de captação de serotonina no neurônio, aumentando sua oferta no espaço sináptico^{167,168}.

A SER atualmente é um medicamento genérico, de preço acessível e amplamente prescrito no mundo. Somente em 2008, o fármaco atingiu quase 20 milhões de prescrições nos EUA, ficando em segundo lugar entre os antidepressivos, e rendendo a *Pfizer* em 2005, cerca de 2,6 milhões de dólares com a venda do medicamento referência (Zoloft).

Tendo em vista o único fármaco oral utilizado na clínica da LV na Índia, a miltefosina, o qual possui elevado risco de teratogenicidade, inviabilizando seu uso em mulheres durante o período de vida fértil^{7,33}, o potencial uso da SER poderia apresentar grandes vantagens, pois o fármaco vem sendo prescrito para mulheres tanto no período gestacional quanto no período de amamentação, além de ser utilizado em crianças e idosos¹⁶⁹, demonstrando assim, excelente segurança quando comparado aos fármacos disponíveis na clínica da LV.

Sendo assim, dando continuidade a estratégia de reposicionamento de fármacos e o sucesso que esta representa na terapêutica das leishmanioses, foi realizado o estudo tanto *in vitro* como *in vivo* contra *Leishmania (L.) infantum* com o fármaco SER. Considerando a atividade anti-amastigota *in vitro*, foi observado que

a SER apresentou um valor de CE_{50} praticamente 10 vezes menor quando comparado a miltefosina, fármaco utilizado na clínica da LV. Ainda, a SER revelou promissora seletividade, demonstrando ser cerca de 10 vezes mais efetiva para os amastigotas intracelulares do que tóxica para as células de mamíferos estudadas. Considerando as características propostas por Don e Ioset⁶³ no qual demonstraram recentemente que fármacos precisam atender a uma série de critérios antes de serem considerados *hits compounds* para posterior avaliação em modelo experimental, dentre eles, atividade e seletividade. Neste contexto, a SER demonstrou estar inserida nestas características, apresentando tanto atividade no modelo intracelular, como um índice de seletividade maior que 10.

A dificuldade em se encontrar fármacos ativos na forma clinicamente relevante da doença, o amastigota, é demonstrada em numerosos trabalhos na literatura. Na maioria das vezes, o fármaco ou composto químico estudado, apresenta elevada toxicidade para as células hospedeiras eliminando, assim, quaisquer chances de uma possível seletividade. Muitos fármacos, ainda que apresentem promissora atividade contra as formas extracelulares do parasita, quando testados no modelo intracelular, são incapazes de serem captados e direcionados ao interior do vacúolo parasitóforo do macrófago, espaço intracelular ácido onde reside o amastigota, ou ainda são degradados no interior da célula¹⁷⁰. O presente trabalho demonstrou a capacidade de um fármaco antidepressivo como a SER de atingir o macrófago seletivamente, ser internalizado, e ainda direcionado ao vacúolo parasitóforo, eliminando o parasita sem prejuízo à célula hospedeira nas concentrações testadas. Ainda, a atividade antiparasitária contra as formas extracelulares nas mesmas faixas de concentração, sugerem que a SER exerça uma atividade anti-*Leishmania* própria, independente de imunomodulação, ou seja,

sem a ativação de macrófagos e liberação de citocinas pela célula hospedeira. Dados em publicação por nosso grupo, corroboram esta hipótese.

Inúmeros trabalhos já foram publicados na literatura na tentativa de reposicionar o fármaco sertralina para uma gama de microorganismos. A atividade contra uma série de bactérias já foi descrita por Munoz-Bellido e colaboradores¹⁶⁸ o qual demonstrou valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) alternando entre 4 a 256 µg/mL, demonstrando ainda maior atividade contra bactérias gram positivas. A atividade da SER frente a cepas resistentes aos fármacos padrões também foi evidenciada, sendo considerado, neste sentido, um candidato promissor¹⁶⁸. Uma potente atividade anti-bacteriana e anti-fúngica foi demonstrada *in vitro* por Ayaz e colaboradores¹⁷¹; além disso, quando tetraciclinas e/ou fluoroquinolonas foram testadas em associação com a sertralina, estas demonstraram sinergismo, sendo capazes de potencializar o efeito biológico e até mesmo, apresentar atividade contra cepas resistentes¹⁷¹⁻¹⁷³. Achados de Drinberg e colaboradores¹⁷⁴ demonstraram a atividade anti-cancer da sertralina, onde o fármaco exibiu elevada atividade contra adenocarcinoma quando administrado em associação com doxorrubicina lipossomal. A ação da SER favoreceu o influxo da doxorrubicina para o interior citoplasmático, bloqueando as bombas de extrusão que beneficiam a resistência de certos tumores. Outros trabalhos demonstraram, ainda, o potencial da sertralina como um fármaco promissor para os estudos de reposicionamento. Johansen e colaboradores⁶⁶ realizaram uma triagem empírica com 2.600 compostos, encontrando assim a atividade anti-*Zaire ebolavirus*, tanto *in vitro* como *in vivo* da sertralina. Em protozoários como o *Plasmodium falciparum*, a sertralina também demonstrou atividade em cepas resistentes à cloroquina, fármaco utilizado no tratamento da malária. Além disso, o estudo reportou que a

associação da cloroquina com a sertralina resultou em uma combinação sinérgica¹⁷⁵.

A efetividade da sertralina contra tripanosomatídeos foi descrita, pela primeira vez, em um trabalho publicado por Palit e Ali¹⁷⁶, em que demonstraram a atividade *in vitro* e *in vivo* do medicamento contra *L. (L.) donovani*, agente etiológico da LV na Ásia. Tendo em vista o sucesso de fármacos psicotrópicos frente à *Leishmania*¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ e corroborando os achados de Palit e Ali¹⁷⁶ para o gênero, neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez a promissora atividade do fármaco SER tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* contra o agente etiológico da LV no Brasil e Europa. No presente estudo, utilizando o modelo experimental de hamster infectado com *L. (L.) infantum*, quando o fármaco SER foi administrado por via oral a 15 mg/kg 2 vezes ao dia, demonstrou melhor eficácia no fígado (84% de tratamento) quando comparado com os resultados encontrados no baço (64%). Utilizando o modelo de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, Palit e Ali¹⁷⁶ demonstraram que após administração oral do medicamento, a porcentagem de tratamento foi de 70% e 72% no baço e fígado, respectivamente. Apesar das diferenças encontradas entre os trabalhos, tais como: i) diferenças entre as cepas (*L. donovani* x *L. infantum*); ii) diferenças entre os modelos animal (camundongo x hamster); iii) diferenças nas formas de análises dos tratamentos (LDU x qPCR) e iv) diferenças na administração do composto (medicamento x fármaco), o presente estudo corrobora os achados de Palit e Ali¹⁷⁶ sobre a eficácia da SER em *Leishmania*, e ainda, contribui com uma nova informação sobre a eficácia em outra espécie visceral, fato importante destacado pelo DNDi quanto a seleção de um novo candidato a fármaco ser ativo em diferentes espécies⁶³.

Embora existam similaridades entre os resultados obtidos, os trabalhos apresentam diferenças significativas quando observado o protocolo de

experimentação. Utilizando um modelo de camundongo BALB/c infectado com *L. donovani*, Palit e Ali¹⁷⁶, utilizaram um regime de administração onde incluíram duas doses semanais de 10 mg/kg/dia durante um período de 4 semanas. O presente trabalho, embasado nos parâmetros farmacocinéticos disponíveis na literatura, propôs um regime de administração racional, na tentativa de proporcionar um melhor estudo experimental.

A literatura demonstra grande variabilidade entre os dados farmacocinéticos existentes¹⁶⁶. Reis e colaboradores¹⁸¹ demonstraram uma alta variação entre tempo de meia vida plasmática ($T_{1/2}$) em indivíduos tratados por 6 meses com sertralina. Após este período contínuo de administração, os valores de $T_{1/2}$ variaram entre 12 a 50 horas. Melis e colaboradores¹⁶⁶ observaram que após administração de uma dose única de sertralina em ratos Wistar (2 mg intravenosa e 5 mg oral), os valores encontrados $T_{1/2}$ foram de 3,55 horas para via intravenosa e 4,08 horas, para a via oral. Com base nestes dados, a proposta de estudo com a SER neste trabalho foi a administração diária (2 vezes ao dia com intervalo de 12 horas), na tentativa de proporcionar concentrações plasmáticas mais estáveis.

Para a escolha da dose administrada de sertralina, primeiramente foi analisado os parâmetros farmacocinéticos disponíveis na literatura, entre eles: i) concentrações plasmáticas máximas (C_{max}); ii) tempo máximo para atingir a C_{max} (T_{max}) e iii) dose letal 50% (DL_{50}). Reis e colaboradores¹⁸¹, observaram que pacientes tratados oralmente por um período de seis meses com o fármaco SER, independente da dose utilizada, a sertralina atingiu um nível de concentração plasmática máximo de 107 ng/mL. Por outro lado, achados de Levine e colaboradores¹⁶⁵ demonstraram que, após administração oral do fármaco em humanos nas doses de 50 a 200 mg/dia, a SER apresentou uma absorção oral lenta, com picos de concentração plasmática detectáveis após 6 a 8 horas da

ingestão do fármaco, e um valor de C_{max} de 55 a 250 ng/mL nas doses estudadas^{165,182}. Estes dados demonstraram que os níveis plasmáticos de SER podem ser elevados conforme o aumento da dose administrada. Quando utilizado o modelo de ratos Wistar, Melis e colaboradores¹⁶⁶, demonstraram que após a administração oral de SER em dose única a 16,7 mg/kg, o fármaco apresentou níveis plasmáticos máximos próximos àqueles reportados em humanos, com valores de $C_{max} = 156$ ng/mL, além do tempo máximo para atingir o C_{max} (T_{max}) de 64 minutos. Apesar da baixa biodisponibilidade do fármaco, Johansen e colaboradores⁶⁶ discutem que a SER tem como alvo preferencial o fígado. Eles sugerem ainda que este fato pode ter contribuído para o acúmulo do fármaco no órgão, proporcionando concentrações suficientes para eliminação do vírus *Ebola*. No presente trabalho, considerando que a *Leishmania infantum* reside preferencialmente em fígado e baço, este acúmulo poderia ser benéfico, favorecendo altas concentrações (não tóxicas) do fármaco para eliminação do parasita.

Finalmente, para considerar a dose a ser administrada nos hamsteres infectados com *L. infantum*, buscou-se avaliar na literatura aspectos toxicológicos do fármaco. Considerando que a SER é um fármaco seguro, com valor de DL_{50} de 765 g/kg (2.5 mol/kg)¹⁸³, o regime de tratamento proposto foi de 15 e 30 mg/kg (2 vezes ao dia), durante 10 dias consecutivos. Johansen e colaboradores⁶⁶, trabalhando com o vírus *Ebola*, propuseram um regime de tratamento bastante semelhante, onde apesar de terem escolhido a via intraperitoneal, utilizaram doses próximas daquelas administradas neste estudo, sendo 10 mg/kg, administrados também em duas doses diárias durante 10 dias consecutivos.

Considerada prioridade pela OMS a seleção de fármacos orais para a LV, este foi um dos critérios focados no trabalho⁵. Assim, a administração oral da SER

foi investigada, demonstrando ser mais efetiva quando comparada à administração intraperitoneal. Uma vez que o fármaco apresenta níveis plasmáticos reduzidos após administração oral¹⁶⁶, neste trabalho inclui-se a via de administração intraperitoneal, objetivando o aumento de sua disponibilidade para o fígado. Brener¹⁸⁴ descreveu que fármacos administrados pela via intraperitoneal são preferencialmente direcionados ao fígado por meio do sistema porta, onde, além da difusão do fármaco pela membrana peritoneal para a circulação, o sistema linfático também contribui para este processo. Porém, o presente estudo demonstrou falha terapêutica quando a SER foi administrada pela via intraperitoneal. Este fato poderia ser explicado com base na conversão do fármaco a um possível metabólito inativo, que não apresentasse atividade contra os amastigotas de *Leishmania*.

A metabolização da SER é dada principalmente pelo fígado, sendo convertida em seu metabólito, desmetilsertralina. A atividade *in vitro* do metabólito como inibidor de recaptação de serotonina é reduzida em aproximadamente 90% e, praticamente, não apresenta atividade em modelos experimentais^{165,185}. Essa transformação se dá principalmente por meio do citocromo P-450, isoenzima 3A4^{165,186,187}, apesar do fármaco ser considerado um inibidor promíscuo de CYP450¹⁸³.

No presente estudo, apesar dos dados serem referentes à atividade do fármaco, nenhum ensaio foi realizado até o momento com a desmetilsertralina, o que poderia contribuir na compreensão do efeito antiparasitário da SER. Assim, no caso da desmetilsertralina ser inativa frente à *Leishmania*, uma administração intraperitoneal poderia ter um efeito negativo em relação ao efeito antiparasitário da SER, uma vez que por esta via, ocorre o direcionamento preferencial do fármaco para o fígado pelo sistema porta, explicando assim a falha terapêutica observada.

Os dados experimentais mostraram um aumento, ainda que não (significativo), dos parasitas no fígado após a administração da SER em doses mais elevadas. Li e colaboradores¹⁸⁸ relataram que a SER tem uma ação sobre mitocôndrias de mamíferos, inibindo os complexos I e V da cadeia respiratória. Este fato pode ter contribuído com alguma toxicidade ao fígado, resultando no aumento dos parasitas, porém, futuros estudos deverão ser realizados para elucidar este mecanismo.

O reposicionamento de fármacos é uma excelente abordagem em doenças negligenciadas. Tendo em vista que a SER é um fármaco amplamente utilizado na clínica, com segurança para pacientes idosos, crianças e gestantes, e que apresentou resultados promissores frente ao tratamento experimental de *Leishmania infantum*, futuros estudos poderão confirmar o potencial do fármaco como um candidato para o tratamento da LV. Além disso, maiores esforços serão depositados na tentativa de entender a farmacocinética e a farmacodinâmica da SER no modelo experimental da LV, bem como seu mecanismo de ação no parasita.

CAPÍTULO 2

4.2 TRIAGEM DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS

4.2.1 Triagem de Novos Compostos Sintéticos Análogos de Naftoquinonas

4.2.1.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e concentração citotóxica 50% (CC₅₀) em células NCTC dos compostos análogos sintéticos de naftoquinonas

Foi realizada a determinação da atividade antiparasitária de 36 compostos sintéticos de naftoquinonas tanto para as formas promastigotas quanto para as formas amastigotas de *L. (L.) infantum*. Dentre os compostos, 27 demonstraram atividade para as formas promastigotas com valores de CE₅₀ entre 8 a 189 µM e 14 compostos demonstraram atividade para as formas amastigotas intracelulares, com valores de CE₅₀ entre 12 à 65 µM (Tabela 9). A respeito da atividade sobre os amastigotas intracelulares, forma relevante do parasita, o composto **15** demonstrou ser o mais efetivo com o menor valor de CE₅₀ da série (13,0 µM). Posteriormente foi realizado o ensaio de citotoxicidade para detectar os Índices de Seletividade (I.S.). Dentre os compostos, cinco apresentaram I.S. maior que cinco levando em consideração a atividade nos amastigotas, sendo estes: compostos **14**, **15**, **20**, **24**, **25**. Anfotericina B, Glucantime® e miltefosina foram utilizados como fármacos

padrões e os valores se encontram na tabela 9. As estruturas químicas dos compostos se encontram na figura 27.

Tabela 9 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade dos análogos sintéticos de naftoquinonas. Valores de CE₅₀ contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, CC₅₀ contra células de mamíferos (NCTC clone 929) e os respectivos IS. Valores expressos em µM.

Sigla dos Compostos	Promastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Amastigotas CE ₅₀ (µM) (IC95%)	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM) (IC95%)	Índice de Seletividade
isa 1	na	Na	89,1 (82,8 - 95,9)	nd*
isa 2	124,3 (115,8 - 133,3)	Na	84,7 (77,0 - 93,0)	nd*
isa 3	75,0 (71,1 - 79,1)	Na	92,6 (90,1 - 95,0)	nd*
isa 4	85,4 (78,5 - 92,8)	Na	82,2 (74,5 - 90,7)	nd*
isa 5	129,0 (115,6 - 143,9)	Na	97,9 (85,8 - 111,8)	nd*
isa 6	188,5 (177,2 - 200,5)	Na	100,5 (86,8 - 116,3)	nd*
isa 7	8,4 (4,3 - 16,5)	Na	85,5 (79,4 - 92,1)	nd*
isa 8	189,9 (178,5 - 203,2)	65,5 (61,1 - 70,3)	173,6 (208,6 - 462,4)	2,65*
isa 13	na	Na	>200	nd*
isa 14	20,7 (17,7 - 24,2)	40,4 (13,2 - 123,8)	>200	>4,95*
isa 15	28,8 (26,6 - 31,3)	13,00 (8,6 - 19,6)	>200	>15,4*
isa 16	45,1 (40,7 - 49,9)	Na	138,2 (118,4 - 161,4)	nd*
isa 17	na	Na	>200	nd*
isa 18	na	Na	>200	nd*
isa 19	na	Na	>200	nd*
isa 20	72,7 (58,2 - 90,9)	29,5 (27,7 - 31,5)	163,0 (143,2 - 185,7)	5,52*
isa 21	68,9 (62,2 - 76,3)	57,0 (52,0 - 62,5)	183,3 (48,1 - 698,7)	3,21*
isa 22	58,3 (50,8 - 66,9)	49,3 (44,7 - 54,5)	175,3 (81,1 - 378,9)	3,55*
isa 23	9,1 (7,7 - 10,6)	Na	69,5 (54,0 - 89,5)	nd*
isa 24	26,4 (23,8 - 29,4)	14,7 (12,5 - 17,3)	137,6 (118,3 - 160,0)	9,36*

Sigla dos Compostos	Promastigotas CE ₅₀ (μM) (IC95%)	Amastigotas CE ₅₀ (μM) (IC95%)	Citotoxicidade CC ₅₀ (μM) (IC95%)	Índice de Seletividade
isa 25	27,4 (24,5 - 30,6)	16,6 (14,3 - 19,3)	136,1 (115,4 - 160,4)	8,19*
isa 26	30,9 (29,0 - 33,0)	25,4 (19,8 - 32,7)	45,1 (32,1 - 63,4)	1,77*
isa 27	27,5 (24,2 - 31,3)	46,9 (42,8 - 51,4)	152,7 (139,7 - 167,0)	3,25*
isa 28	na	na	>200	nd*
isa 30	107,8 (95,7 - 121,5)	na	42,6 (34,2 - 53,1)	nd*
isa 31	49,2 (36,2 - 66,7)	na	33,9 (28,2 - 40,7)	nd*
isa 32	51,8 (27,6 - 96,9)	na	42,1 (24,3 - 72,9)	nd*
isa 33	40,1 (14,5 - 110,8)	na	94,2 (79,8 - 111,1)	nd*
isa 34	20,3 (8,0 - 51,8)	39,1 (28,0 - 54,6)	75,3 (52,0 - 108,9)	1,92*
isa 35	120,5 (31,8 - 455,9)	45,8 (40,8 - 51,4)	81,6 (34,8 - 191,1)	1,78*
isa 36	na	na	134,8 (71,9 - 253,0)	nd*
isa 37	8,1 (3,5 - 18,5)	39,1 (35,4 - 43,2)	74,9 (45,4 - 123,8)	1,91*
isa 38	55,9 (26,7 - 117,3)	32,4 (30,6 - 34,3)	47,9 (42,6 - 53,9)	1,47*
isa 39	82,8 (45,9 - 149,5)	na	96,0 (88,3 - 104,5)	nd*
isa 40	na	na	75,1 (54,3 - 103,9)	nd*
isa 41	na	na	58,2 (34,6 - 98,0)	nd*
anfotericina B	0,16 (0,13 - 0,19)	0,07	56,6 (44,4 - 72,2)	809*
Glucantime®	na	25,0	>200	>8,0*
Miltefosina	16,8 (15,4 - 17,5)	17,8 (11,6 - 24,6)	122,0 (94,8 - 157,0)	6,85*

Isa: naftoquinonas; CE₅₀: concentração efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50%; IC95%: intervalo de confiança 95%; na: não ativo; nd: não determinado; *seletividade no amastigota intracelular. A concentração do antimônio foi expressa em μg/mL devido a ausência na literatura da estrutura do antimônio de N-metil-glucamina.

ISA 001

ISA 002

ISA 003

ISA 004

ISA 005

ISA 006

ISA 007

ISA 008

ISA 013

ISA 014

ISA 015

ISA 016

ISA 017

ISA 018

ISA 019

ISA 020

ISA 021

ISA 022

Figura 27 - Estruturas químicas dos compostos análogos sintéticos de naftoquinonas. Isa: naftoquinonas.

4.2.2.1 DISCUSSÃO

O lapachol é uma naftoquinona natural pertencente à classe das alquil-1,4-naftoquinonas, que constituem um grupo importante de compostos naturais e sintéticos. Apresentam vários tipos de atividade biológica, como antimalárica, antiprotozoária e dentre estas, anti-*Leishmania*^{189,190}. Exemplos de fármacos derivados das alquil-1,4-naftoquinonas podem ser vistos em uso na clínica veterinária para o tratamento de protozooses, como a atavaquona, parvaquona^{191,192} e buparvaquona utilizada no tratamento da teileriose bovina¹⁹³. Além disso, a buparvaquona vem sendo amplamente explorada como um potencial candidato a fármaco para leishmaniose visceral com valores de CE₅₀ entre 0.005 e 1 µM contra *L. (L.) donovani*^{194,195} e *L. (L.) infantum*⁸⁷.

A síntese de 2-hidroxi-3-fenilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinonas e sua atividade contra *Plasmodium falciparum* foi recentemente reportada por Sharma e colaboradores¹⁹⁶. Essa mesma série de 36 compostos foram sintetizados por meio de uma reação que envolve três componentes para a preparação da fenilsulfonilmetil-[1,4]-naftoquinona, via o-quinona metido (Figura 28), e então avaliado seu potencial *in vitro* contra *L. (L.) infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil.

Figura 28 - Naftoquinona utilizada como protótipo na síntese dos 36 derivados de 2-hidroxi-3-fenilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinonas.

Os resultados demonstram promissora atividade anti-*Leishmania*. Dentre os 36 compostos testados, 27 demonstraram atividade contra formas promastigotas, mas somente três compostos (**15**, **24** e **25**) demonstraram valores de CE_{50} próximos a miltefosina, fármaco utilizado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia. Considerando o amastigota intracelular, 14 compostos demonstraram atividade, porém, 5 destes (**14**, **15**, **20**, **24** e **25**) apresentaram seletividade maior que 5. A respeito da toxicidade, o composto **15** foi o mais promissor, com uma seletividade pelo menos duas vezes maior que a miltefosina (I.S. > 15).

Corroborando o estudo de Sharma e colaboradores¹⁹⁶, os compostos mais promissores também demonstraram os dois grupamentos fenil em R1 e R2, mas em contraste com *Plasmodium*, a atividade anti-*Leishmania* não foi maior quando o grupo *p*-nitro foi empregado como complemento em R1. Além disso, a presença dos dois grupamentos fenil em R1 e R2 foi essencial para a manutenção da atividade contra o amastigota, provavelmente por aumentar a penetração em macrófagos ou afetar enzimas específicas da fase intracelular do parasita. Apesar de relatos na literatura sobre compostos com grupo nitro apresentarem promissora atividade anti-*Leishmania* com valores de CE_{50} na faixa de 100 nM¹⁹⁷, sua elevada toxicidade também foi verificada por Kovacic e colaboradores¹⁹⁸. O presente estudo corrobora estes dados, demonstrando também a elevada toxicidade *in vitro* presente nos compostos com o grupo nitro.

Entre os compostos mais ativos, contendo os grupos fenil em R1 e R2, é notório que a presença do flúor no R2 (composto **15**) elevou a seletividade, ou seja, reduziu a toxicidade e aumentou a atividade no amastigota intracelular. Por outro lado, a substituição do flúor pelo grupo hidroxila na mesma posição do R2, reduziu em pelo menos quatro vezes a seletividade (composto **22**). Apesar de aumentar em três vezes o valor de CE_{50} , a substituição do flúor (composto **15**) pelo cloro

(composto **14**) foi também uma importante contribuição, mantendo a atividade anti-amastigota e, aparentemente não modificando a toxicidade.

Tanto o cloro quanto o flúor, possuem algumas propriedades em particular, como carga eletronegativa e elevado potencial de oxidação, fato este que pode ter contribuído para elevar a seletividade. Ainda assim, a substituição do flúor pode ter alterado algumas das propriedades físico-químicas do composto frente à célula, contribuindo para o efeito biológico. Muitos compostos fluorados são amplamente utilizados no tratamento de algumas doenças, incluindo agentes antimaláricos, antibacterianos, antifúngicos, antidepressivos, anti-inflamatórios, antipsicóticos, antivirais, compostos esteroidais, bem como anestésicos¹⁹⁹. Considerando o flúor o elemento mais eletronegativo da tabela periódica, a substituição do hidrogênio pelo flúor pode alterar seu pKa e até mesmo a reatividade química e estabilidade dos grupos funcionais vizinhos²⁰⁰. Ainda que estas sugestões referentes às alterações estruturais sejam apenas hipóteses não validadas, estudos futuros poderão ser realizados para a confirmação e otimização dos compostos, analisando ainda a contribuição individual de cada substituinte.

Sharma e colaboradores¹⁹⁶ demonstraram o potencial *in vitro* para *Plasmodium* desta nova série de naftoquinonas; por outro lado, os compostos mais promissores com valores de CE₅₀ inferiores a 10 µM apresentavam o grupo *p*-nitro no anel fenólico como substituinte em R1. Com base na substituição dos grupos metil nas diferentes posições do R2, foi observado uma alteração considerável no efeito biológico. A modificação do grupo *p*-metil (composto **20**) para o *m*-metil (composto **24**) aumentou em cerca de duas vezes a atividade anti-amastigota, bem como a seletividade. Por outro lado, a substituição do grupo *m*-metil (composto **24**) pelo grupo *o*-fenil (composto **26**) aumentou em cerca de 3 vezes a toxicidade, porém a atividade anti-amastigota se manteve similar. Outra importante

contribuição foi observada entre os compostos **20** e **21**; a substituição do grupo metil no R2 (composto **20**) aumentou em duas vezes a atividade no amastigota quando comparado com o composto **21**, o qual apresenta um grupo metoxil em R2. Finalmente, a presença do enxofre no R2 (composto **16**) resultou na falta de atividade anti-amastigota quando comparado com os compostos **20** e **21**.

Em estudos de Descoberta de Fármacos, conhecidos como *Drug Discovery*, é de fundamental importância o conhecimento das características biológicas e físico-químicas desejadas para a seleção de novos compostos na doença estudada. Estas características são conhecidas como *Target Candidate Compound* (TCC) ou *Target Candidate Profile* (TCP). Segundo Don e Ioset⁶³, ambos da organização Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), o *TCP* na fase de *hit compound* para leishmaniose visceral inclui uma série de fatores, tais como: i) $CE_{50} < 10 \mu M$; ii) seletividade > 10 ; iii) aderência às características/propriedades de fármacos (*drug-likeness*); iv) aderência (total ou parcial) a regra de Lipinsky; v) ausência de alertas estruturais, incluindo grupamentos altamente reativos e tóxicos; vi) metabolismo adequado bem como estabilidade química e metabólica; vii) síntese orgânica com menos de oito etapas⁶³. Ainda que apenas um composto do estudo tenha se enquadrado parcialmente nas regras para CE_{50} e seletividade (composto **15**), futuros estudos *in silico* poderão ser realizados para averiguar a aderência destes compostos ao *TCP* para leishmaniose visceral; sendo assim, depois desta seleção, poderão ser incluídos em um programa de otimização de compostos líderes (*lead optimization*) que abrange ainda uma série de estudos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Há de salientar ainda, que atualmente, vem sendo fortemente sugerido que estudos de farmacocinética e farmacodinâmica (PKPD) devam ser realizados já nas fases

iniciais do processo de *Drug Discovery*, contribuindo desta forma, com um maior êxito para os ensaios de efetividade em modelo experimental⁶².

Depois de cumpridas estas etapas, futuros estudos experimentais com as 2-hidroxi-3-fenilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinonas poderão ainda comprovar o verdadeiro potencial destes compostos como candidatos a fármacos para a LV.

Os resultados deste estudo foram publicados no periódico PLoS One (Anexo 2).

4.2.2 Triagem de Novos Compostos Sintéticos quelantes de ferro

4.2.2.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e concentração citotóxica 50% (CC₅₀) em células HL-60 dos compostos sintéticos do acoplamento do quelante de ferro com a cloroquina

A segunda quimioteca contendo inicialmente 354 compostos pertencentes ao Prof. Wagner Gerd (*King's College London*), fez parte do Projeto Fapesp-Kings College London, que visou identificar novos compostos anti-*Leishmania*. Devido a ausência das estruturas, nesta tese será demonstrado apenas dois compostos que tiveram origem através do acoplamento do quelante de ferro deferiprona com a cloroquina.

Figura 29 - Estruturas químicas dos compostos: cloroquina (a) e deferiprona (b).

Figura 30 - Estruturas químicas dos compostos sintéticos derivados do acoplamento da deferiprona com a cloroquina. a (X = Cl); b (X = H).

Tabela 10 - Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade da cloroquina, deferiprona e dos derivados sintéticos deste acoplamento. Valores de CE_{50} contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, CC_{50} contra células de mamíferos (HL-60). Valores expressos em μM .

Compostos	Promastigotas CE_{50} (μM)	Citotoxicidade CC_{50} (μM)
29 a	3,7	>100
29 b	>100	>100
30 a	27,1 ($\pm 7,0$)	50,3 ($\pm 1,1$)
30 b	>100	>100

CE_{50} : concentração efetiva 50%; CC_{50} : concentração citotóxica 50%; 29a: cloroquina; 29b: deferiprona; 30a: análogo sintético com inclusão do Cl; 30b: análogo sintético com inclusão do H.

4.2.2.2.1 DISCUSSÃO

Ainda, utilizando a estratégia de reposicionamento de fármacos acoplada à modificação estrutural por meio de síntese orgânica, foram sintetizados compostos quelantes de ferro juntamente com a cloroquina, fármaco utilizado no tratamento clínico da malária (Figura 29 a). Tem sido demonstrado o papel do ferro (Fe^+) em muitos processos bioquímicos, devido à sua alta afinidade por oxigênio²⁰¹. Em protozoários, bem como em fungos e bactérias, o ferro é um fator de crescimento essencial²⁰² e quelantes de ferro têm sido direcionado como uma possível estratégia para combater infecções parasitárias²⁰³. É sabido que o quelante de ferro desferroxamina (DFO) compromete a atividade do Fe^+ em protozoários parasitas, como a ribonucleótido-redutase, que está diretamente envolvida na síntese de DNA, resultando na falta de crescimento dos mesmos^{204,205}. Estudos demonstraram que DFO foi altamente ativo contra *P. Falciparum*²⁰⁶ bem como *T. Brucei*^{207,208}. Como outro importante quelante de ferro, citasse a deferiprona (Figura 29 b), um fármaco pertencente à classe das 3-hidroxipiridina-4-ona (HPO). A deferiprona é utilizada clinicamente para o tratamento de sobrecarga de ferro, porém seu potencial antimalárico também foi explorado^{209,210}. Sendo assim, dois novos compostos foram sintetizados, derivados do acoplamento da deferiprona com a cloroquina (Figura 30 a e b), sendo possível notar que o composto **30a**, mas não seu análogo estrutural **30b**, demonstrou atividade contra os promastigotas de *L. (L.) infantum*; ainda assim, nenhuma atividade foi detectada sob os amastigotas intracelular. A falta de atividade na forma intracelular pode ser em decorrência das diferenças do metabolismo entre o promastigota e o amastigota, ou mesmo devido à ausência de receptores específicos para os compostos nos macrófagos. Ainda assim, o composto **30a** demonstrou atividade contra os promastigotas, enquanto

que a deferiprona (**29b**), não apresentou atividade na máxima concentração testada. Neste contexto, é interessante notar que a substituição do Cl (**30a**) pelo H (**30b**) aboliu a toxicidade para as células de mamíferos, por outro lado, também zerou a atividade contra os promastigotas (Tabela 10).

Tendo em vista, a estratégia de modificação estrutural acoplada à estratégia de reposicionamento de fármacos, estes estudos podem contribuir na busca de novos compostos derivados de quelantes de ferro que se mostrem ativos na forma relevante da doença. Sendo assim, devido à falta de atividade anti-*Leishmania*, não foi dado prosseguimento ao estudo. Em decorrência do estudo dos quelantes de ferro e seus derivados sintéticos, o trabalho foi finalizado e publicado no periódico Bioorganic Medical Chemistry que pode ser encontrado no anexo 3.

5 CONCLUSÕES

- a) Dentre 36 compostos análogos sintéticos de naftoquinonas, 14 apresentaram atividade anti-*Leishmania* em formas amastigotas intracelulares. Apenas 5 compostos apresentaram um índice de seletividade maior que 5;
- b) Estudos com o fármaco deferiprona conjugada com cloroquina demonstraram atividade apenas contra a forma extracelular do parasita;
- c) Dentre 10 fármacos antagonistas de receptor H1 de histamina testados, apenas a cinarizina demonstrou atividade nos amastigotas intracelulares;
- d) O fármaco cinarizina, tanto na forma livre quanto lipossomal, não demonstrou efetividade no modelo de hamster infectado com *L. (L.) infantum*;
- e) Apesar da atividade em amastigota intracelular abaixo de 1 μM e índice de seletividade >50 , o fármaco amiodarona não demonstrou eficácia no modelo de hamster infectado com *L. (L.) infantum* na dose testada, aumentando a densidade parasitária no fígado e baço em relação ao controle quando administrada pela via intraperitoneal;
- f) O antidepressivo sertralina foi o fármaco mais promissor, apresentando atividade anti-*Leishmania infantum* contra formas amastigotas abaixo de 2 μM e índice de seletividade de 10. Quando administrada pela via oral demonstrou eficácia $>65\%$ em baço e fígado;
- g) A sertralina quando administrada pela via oral, porém em doses maiores, resultou em aumento da densidade parasitária no fígado. Administrada pela via intraperitoneal, o fármaco foi inefetivo;

- h) O fármaco nitazoxanida apresentou atividade anti-*Leishmania infantum* contra formas amastigotas e índice de seletividade de 2,5;
- i) Quando encapsulado em lipossomos, a nitazoxanida foi amplamente captada por macrófagos infectados e sadios, distribuindo-se de forma homogênea no citoplasma;
- j) Em modelo experimental, o fármaco nitazoxanida oral não demonstrou efetividade, porém, quando administrado na forma lipossomal, reduziu a densidade parasitária em 50 e 82% no baço e fígado, respectivamente;
- k) A formulação lipossomal foi caracterizada físico-quimicamente resultando em vesículas com diâmetro inferior a 200 nm de carga negativa e unilamelares;
- l) O metabólito da nitazoxanida, tizoxanida, apresentou atividade anti-*Leishmania* contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*, demonstrando potência similar ao fármaco;
- m) Os estudos farmacocinéticos da NTZ livre e lipossomal em modelo murino demonstraram valores de $T_{1/2}$ extremamente baixos. Contudo, a exposição do fármaco quando encapsulado em lipossomos foi cerca de 4 vezes maior que o fármaco livre;
- n) O presente trabalho indica a necessidade de ensaios de PK nas fases iniciais dos estudos para adequação dos regimes de tratamento;
- o) Considerando a segurança do fármaco sertralina e sua promissora atividade anti-*Leishmania*, o presente trabalho sugere este fármaco como candidato para futuros estudos pré-clínicos em LV.

REFERÊNCIAS

- ¹Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected tropical diseases. *Br Med Bull*. 2010;93:179-200.
- ²Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(11):941-55.
- ³Renslo AR, McKerrow JH. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat Chem Biol*. 2006;2(12):701-10.
- ⁴Sundar S, Chakravarty J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(1):43-59.
- ⁵World Health Organization. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting March 2010. Geneva: WHO;2010. (WHO Technical report series; 949).
- ⁶Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- ⁷Seifert K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med Chem J*. 2011;5:31-9.
- ⁸Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82.
- ⁹Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16(5):188-9.
- ¹⁰Lukes J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9375-80.
- ¹¹Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

- ¹²Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol. 1996;14(5):417-23.
- ¹³Bates PA, Depaquit J, Galati EA, Kamhawi S, Maroli M, McDowell MA, et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. Parasit Vectors. 2015;8:131.
- ¹⁴Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000;16(7):292-7.
- ¹⁵Dawit G, Girma Z, Simenew K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol. 2013;4:166.
- ¹⁶Center for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis [cited 2015. Jun 30]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- ¹⁷Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004;57:1-88.
- ¹⁸Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(3):e2725.
- ¹⁹Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18.
- ²⁰Alves WA. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. Bol Epidemiol Paulista (BEPA). 2009;6:25-9.
- ²¹Rangel O, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Ciaravolo RMC, Tolezano JE, et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. Bol Epidemiol Paulista BEPA. 2013;10(111):3-14.
- ²²Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJ, et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. Chem Rev. 2014;114(22):11305-47.

- ²³Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(1):69-72.
- ²⁴Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(12):763-74.
- ²⁵Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001;6(11):849-54. Erratum in: *Trop Med Int Health* 2002a;7(3):293.
- ²⁶Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2006;61:223-74.
- ²⁷Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 2002b;28:1739-46.
- ²⁸Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003a;19(11):502-8.
- ²⁹Croft SL, Seifert K, Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol Biochem Parasitol.* 2003b;126(2):165-72.
- ³⁰Berman J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 2005;6(8):1381-8.
- ³¹Sindermann H, Engel J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100 Suppl 1:S17-20.
- ³²Dorlo TP, van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, de Vries HJ, Beijnen JH, et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2855-60.
- ³³Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):543-50.
- ³⁴Tekwani BL, Walker LA. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(6):623-31.

³⁵Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3(10):1446-52.

³⁶Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, et al. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(6):685-9.

³⁷Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Felton JM, Sabin AJ, Horton J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1005-11.

³⁸Wasunna MK, Rashid JR, Mbui J, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, et al. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5):871-6. Erratum in: *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):185.

³⁹Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2571-81.

⁴⁰Winkelmann E, Raether W, Sinharay A. Chemotherapeutically active nitro compounds. 4.5-Nitroimidazoles (Part II). *Arzneimittelforschung*. 1978;28(3):351-66.

⁴¹Jennings FW, Urquhart GM. The use of the 2 substituted 5-nitroimidazole, Fexinidazole (Hoe 239) in the treatment of chronic *T. brucei* infections in mice. *Z Parasitenkd*. 1983;69(5):577-81.

⁴²Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FR, Norval S, Kime R, et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med*. 2012;4(119):119re1.

^{43a}Clinical Trial. [citado 2015]. Disponível em: (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01980199>)

⁴³Patterson S, Wyllie S, Stojanovski L, Perry MR, Simeons FR, Norval S, et al. The R enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4699-706.

- ⁴⁴Palit P, Hazra A, Maity A, Vijayan RS, Manoharan P, Banerjee S, et al. Discovery of safe and orally effective 4-aminoquinoline analogues as apoptotic inducers with activity against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):432-45.
- ^{45a}Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(4):859-63.
- ⁴⁵Campos Vieira N, Vacus J, Fournet A, Baudouin R, Bories C, Séon-Ménier B, et al. Antileishmanial activity of a formulation of 2-n-propylquinoline by oral route in mice model. *Parasite*. 2011;18(4):333-6.
- ⁴⁶Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbiéri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(2):365-8.
- ⁴⁷Sett R, Basu N, Ghosh AK, Das PK. Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J Parasitol*. 1992;78(2):350-4.
- ⁴⁸Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(6):473-80.
- ⁴⁹Alving CR, Steck EA, Chapman WL Jr, Waits VB, Hendricks LD, Swartz GM Jr, et al. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(6):2959-63.
- ⁵⁰New RRC. *Liposomes: a practical approach*. Oxford: Oxford University;1990.
- ⁵¹Frézard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim Nova*. 2005;3:511-8.
- ⁵²Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm*. 2006;315(1-2):140-7.
- ⁵³Batista CM, Carvalho CMB, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Braz J Pharm Sci*. 2007;43(2):167-179.

- ⁵⁴Banerjee R. Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl.* 2001;16(1):3-21.
- ⁵⁵Quilitz R. The Use of Lipid Formulations of Amphotericin B in Cancer Patients. *Cancer Control.* 1998;5(5):439-449.
- ⁵⁶Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ.* 1998;76(1):25-32.
- ⁵⁷Meyerhoff A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1999;28(1):42-8; discussion 49-51.
- ⁵⁸Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2006;43(7):917-24.
- ⁵⁹Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 2010;362(6):504-12.
- ⁶⁰Olliaro P, Darley S, Laxminarayan R, Sundar S. Cost-effectiveness projections of single and combination therapies for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health.* 2009;14(8):918-25.
- ⁶¹Sundar S, Mehta H, Chhabra A, Singh V, Chauhan V, Desjeux P, et al. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(5):608-13.
- ^{62a}Sundar S, Goyal AK, More DK, Singh MK, Murray HW. Treatment of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with ultra-short courses of amphotericin-B-lipid complex. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92(7):755-64.
- ⁶²Tuntland T, Ethell B, Kosaka T, Blasco F, Zang RX, Jain M, et al. Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research. *Front Pharmacol.* 2014;5:174.

- ⁶³Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 2014;141(1):140-6.
- ⁶⁴Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):751-61.
- ⁶⁵Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):673-83.
- ⁶⁶Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med*. 2015;7(290):290ra89.
- ⁶⁷Nwaka S, Ridley RG. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(11):919-28.
- ⁶⁸Goodwin LG. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89(3):339-41.
- ⁶⁹Cappuccino EF, Stauber LA. Some compounds active against experimental visceral leishmaniasis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;101:742-4.
- ⁷⁰Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol*. 1998;30(4):435-43.
- ⁷¹Moskalenko Nlu, Pershin GN. [Comparative study of the chemotherapeutic effect of paromomycin and monomycin in experimental cutaneous leishmaniasis in albino mice]. *Farmakol Toksikol*. 1966;29(1):90-4.
- ⁷²Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(2):221-5.
- ⁷³Wilson DW, Langer C, Goodman CD, McFadden GI, Beeson JG. Defining the timing of action of antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(3):1455-67.

⁷⁴Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;13(4):243-8.

⁷⁵Gilbert IH. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *J Med Chem*. 2013;56(20):7719-26.

⁷⁶Wyllie S, Oza SL, Patterson S, Spinks D, Thompson S, Fairlamb AH. Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Mol Microbiol*. 2009;74(3):529-40.

⁷⁷Peters JU, Hert J, Bissantz C, Hillebrecht A, Gerebtzoff G, Bendels S, et al. Can we discover pharmacological promiscuity early in the drug discovery process? *Drug Discov Today*. 2012;17(7-8):325-35.

⁷⁸Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol*. 2009;27(2):157-67.

⁷⁹DNDi. Medicamentos para Doenças Negligenciadas. [citado 2015]. Disponível em: <http://www.dndi.org/>

⁸⁰Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(7):507-19.

⁸¹Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. *J Protozool*. 1958;5:269–273.

⁸²Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986;93:157-65.

⁸³De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, Campbell L, Wyllie S, Joshi D, et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):2913-22. doi: 10.1128/AAC.02398-12. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7622.

⁸⁴Gehrke SS, Pinto EG, Steverding D, Pleban K, Tempone AG, Hider RC, et al. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(3):805-13.

- ⁸⁵Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(9):4194-8.
- ⁸⁶Tempone AG, Mortara RA, de Andrade HF Jr, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:159-63.
- ⁸⁷Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccia VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum* chagasi. *Exp Parasitol*. 2012;130:195-99.
- ⁸⁸Reimão JQ, Tempone AG. Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:1032-8.
- ⁸⁹Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccia VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*. 2011;109(2):267-74.
- ⁹⁰Aslam S, Musher DM. Nitazoxanide: clinical studies of a broad-spectrum anti-infective agent. *Future Microbiol*. 2007;2(6):583-90.
- ⁹¹Di Santo N, Ehrisman J. A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug. *Mutat Res*. 2014;768:16-21.
- ⁹²Rossignol JF. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res*. 2014;110:94-103.
- ⁹³Belardo G, Cenciarelli O, La Frazia S, Rossignol JF, Santoro MG. Synergistic effect of nitazoxanide with neuraminidase inhibitors against influenza A viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):1061-9.
- ^{94a}Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, Resnick H, Samudrala S, Ginocchio C, Bardin M, Rossignol JF; US Nitazoxanide Influenza Clinical Study Group. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(7):609-18. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70717-0.

⁹⁴Cao J, Forrest JC, Zhang X. A screen of the NIH Clinical Collection small molecule library identifies potential anti-coronavirus drugs. *Antiviral Res.* 2015;114:1-10.

⁹⁵Gekonge B, Bardin MC, Montaner LJ. Short communication: Nitazoxanide inhibits HIV viral replication in monocyte-derived macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015;31(2):237-41.

⁹⁶Somvanshi VS, Ellis BL, Hu Y, Aroian RV. Nitazoxanide: nematicidal mode of action and drug combination studies. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;193(1):1-8.

⁹⁷Chan-Bacab MJ, Hernández-Núñez E, Navarrete-Vázquez G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1292-3.

⁹⁸Zhang R, Shang L, Jin H, Ma C, Wu Y, Liu Q, et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of nitazoxanide against *Leishmania donovani*. *Parasitol Res.* 2010;107:475-9.

⁹⁹Navarrete-Vazquez G, Chávez-Silva F, Argotte-Ramos R, Rodríguez-Gutiérrez Mdel C, Chan-Bacab MJ, Cedillo-Rivera R, et al. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;10:3168-71.

¹⁰⁰Mesquita JT, Pinto EG, Taniwaki NN, Galisteo AJ Jr, Tempone AG. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Acta Trop.* 2013;128(3):666-73.

¹⁰¹Hong SK, Kim HJ, Song CS, Choi IS, Lee JB, Park SY. Nitazoxanide suppresses IL-6 production in LPS-stimulated mouse macrophages and TG-injected mice. *Int Immunopharmacol.* 2012;13(1):23-7.

¹⁰²Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LC, Lino MT, de Oliveira MF, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004375.

¹⁰³DrugBank. [cited 2015]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00507>

¹⁰⁴Huang X, Guo C, Chen Z, Liu Y, He L, Zeng Z, et al. Metabolism of nitazoxanide in rats, pigs, and chickens: Application of liquid chromatography coupled to hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;1000:147-54.

¹⁰⁵Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e912.

¹⁰⁶Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):255-60.

¹⁰⁷Dorlo TP, van Thiel PP, Schoone GJ, Stienstra Y, van Vugt M, Beijnen JH, et al. Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(12):e1436.

¹⁰⁸Kassam K, Davidson R, Tadrous PJ, Kumar M. Lingual Leishmaniasis Presenting to Maxillofacial Surgery in UK with Successful Treatment with Miltefosine. *Case Rep Med*. 2013;2013:975131.

¹⁰⁹Barratt GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm Sci Technol Today* 3. 2000;163-71.

¹¹⁰Abreu AS, Castanheira EM, Queiroz MJ, Ferreira PM, Vale-Silva LA, Pinto E. Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1Hindole-2-carboxylate. *Nanoscale Res Lett*. 2011;6(1):482.

¹¹¹Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm*. 1997;154:123-40.

¹¹²Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF Jr. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:60-8.

¹¹³Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*. 1995;270:16221-4.

¹¹⁴Nishikawa K, Arai H, Inoue K. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem*. 1990;265:5226-31.

¹¹⁵Yamaguchi A, Yamamoto N, Akamatsu N, Saido TC, Kaneda M, Umeda M, et al. PS-liposome and ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183) of CD36: a study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody. *Thromb Res*. 2000;97:317-26.

¹¹⁶Borborema SE, Schwendener RA, Osso JA Jr, de Andrade HF Jr, do Nascimento N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (Leishmania) major-infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(4):341-7.

¹¹⁷Tempone AG, de Andrade HF Jr. Nanoformulations of Pentavalent Antimony Entrapped in Phosphatidylserine-Liposomes Demonstrate Higher Efficacy against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67:64-8.

¹¹⁸Broekhuysen J, Stockis A, Lins RL, De Graeve J, Rossignol JF. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2000;38(8):387-94.

¹¹⁹Stockis A, Deroubaix X, Lins R, Jeanbaptiste B, Calderon P, Rossignol JF. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1996;34(8):349-51.

¹²⁰Zhao Z, Xue F, Zhang L, Zhang K, Fei C, Zheng W, et al. The pharmacokinetics of nitazoxanide active metabolite (tizoxanide) in goats and its protein binding ability in vitro. *J Vet Pharmacol Ther*. 2010;33(2):147-53.

¹²¹Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006a;123:399-410.

¹²²Del Cuvillo A, Sastre J, Montoro J, Jáuregui I, Dávila I, Ferrer M, et al. Allergic conjunctivitis and H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:11-8.

¹²³Marieb E. Human anatomy & physiology. San Francisco: Benjamin Cummings; 2001.

- ¹²⁴Triggiani M, Petraroli A, Loffredo S, Frattini A, Granata F, Morabito P, et al. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:472-81.
- ¹²⁵Mayence A, Vanden Eynde JJ, LeCour L Jr, Walker LA, Tekwani BL, Huang TL. Piperazine-linked bisbenzamides: a novel class of antileishmanial agents. *Eur J Med Chem*. 2004;39:547-53.
- ¹²⁶Foroumadi A, Emami S, Pournourmohammadi S, Kharazmi A, Shafiee A. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Eur J Med Chem*. 2005;12:1346-50.
- ¹²⁷Nguewa PA, Fuertes MA, Iborra S, Najajreh Y, Gibson D, Martínez E, et al. Water soluble cationic trans-platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania infantum*. *J Inorg Biochem*. 2005;99:727-36.
- ¹²⁸Behrouzi-Fardmoghdam M, Poorrajab F, Ardestani SK, Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:4509-15.
- ¹²⁹Gnoatto SC, Dalla Vecchia L, Lencina CL, Dassonville-Klimpt A, Da Nascimento S, Mossalayi D, et al. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008a;23:604-10.
- ¹³⁰Poorrajab F, Ardestani SK, Emami S, Behrouzi-Fardmoghdam M, Shafiee A, Foroumadi A. Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: synthesis and in vitro biological evaluation. *Eur J Med Chem*. 2009;44:1758-62.
- ¹³¹Andrade-Neto VV, Matos-Guedes HL, Gomes DC, Canto-Cavaleiro MM, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(3):416-9.
- ¹³²McGaughey CA. Preliminary note on the treatment of spirocercosis in dogs with a piperazine compound, caricide (Lederle). *Vet Rec*. 1950;62:814-5.
- ¹³³Weis R, Schweiger K, Faist J, Rajkovic E, Kungl AJ, Fabian WM, et al. Antimycobacterial and H1-antihistaminic activity of 2-substituted piperidine derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:10326-31.

- ¹³⁴Tao B, Huang TL, Zhang Q, Jackson L, Queener SF, Donkor IO. Synthesis and anti-Pneumocystis carinii activity of conformationally restricted analogues of pentamidine. Eur J Med Chem. 1999;34:531-8.
- ¹³⁵Keenan M, Alexander PW, Diao H, Best WM, Khong A, Kerfoot M, et al. Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of Trypanosoma cruzi. Bioorg Med Chem. 2013;21:1756-63.
- ¹³⁶Donkor IO, Huang TL, Tao B, Rattendi D, Lane S, Vargas M, et al. Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners. J Med Chem. 2003;46:1041-8.
- ¹³⁷Gnoatto SC, Susplugas S, DallaVecchia L, Ferreira TB, Dassonville-Klimpt A, Zimmer KR, et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. Bioorg Med Chem. 2008b;16:771-82.
- ¹³⁸Reimão JQ, Scotti MT, Tempone AG. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study. Bioorg Med Chem. 2010;18:8044-53.
- ¹³⁹Frézard F, Demicheli C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. Expert Opin Drug Deliv. 2010;7:1343-58.
- ¹⁴⁰Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G, et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in Leishmania mexicana. Antimicrob Agents Chemother. 2009a;53(4):1403-10.
- ¹⁴¹de Macedo-Silva ST, de Oliveira Silva TL, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of Leishmania amazonensis. Mol Biol Int. 2011;2011:876021.
- ¹⁴²Paniz-Mondolfi AE, Pérez-Alvarez AM, Reyes-Jaimes O, Socorro G, Zerpa O, Slova D, et al. Concurrent Chagas' disease and borderline disseminated cutaneous leishmaniasis: The role of amiodarone as an antitrypanosomatidae drug. Ther Clin Risk Manag. 2008;4(3):659-63.

¹⁴³Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006b;19(1):111-26.

¹⁴⁴Singh BN. Amiodarone: historical development and pharmacologic profile. *Am Heart J.* 1983;106(4 Pt 2):788-97.

¹⁴⁵Benaïm G, Sanders JM, García-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* 2006;49(3):892-9.

¹⁴⁶Nishida A, Takizawa T, Matsumoto A, Miki T, Seino S, Nakaya H. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels and L-type Ca²⁺ channels by amiodarone elicits contradictory effect on insulin secretion in MIN6 cells. *J Pharmacol Sci.* 2011;116(1):73-80.

¹⁴⁷DrugBank. [cited 2015]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01118>

¹⁴⁸Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 2006;111(1-2):56-64.

¹⁴⁹Barle EL, Cerne M, Peternel L, Homar M. Reduced intravenous toxicity of amiodarone nanosuspension in mice and rats. *Drug Chem Toxicol.* 2013;36(3):263-9.

¹⁵⁰Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(11):1303-10.

¹⁵¹Morvay N, Baczkó I, Sztojkov-Ivanov A, Falkay G, Papp JG, Varró A, et al. Long-term pretreatment with desethylamiodarone (DEA) or amiodarone (AMIO) protects against coronary artery occlusion induced ventricular arrhythmias in conscious rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;2:1-5.

¹⁵²Zhang MQ, Wilkinson B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(6):478-88.

¹⁵³Pomponio G, Savary CC, Parmentier C, Bois F, Guillouzo A, Romanelli L, et al. In vitro kinetics of amiodarone and its major metabolite in two human liver cell models after acute and repeated treatments. *Toxicol In Vitro.* 2015;30:36-51.

¹⁵⁴Buggey J, Kappus M, Lagoo AS, Brady CW. Amiodarone-Induced Liver Injury and Cirrhosis. *ACG Case Rep J*. 2015;2(2):116-8.

¹⁵⁵Cataldi A, Gonella D, Robutti N, Siri M, Buonocore S, Odetti P. Hepatotoxicity after intravenous amiodarone. *Aging Clin Exp Res*. 2008;20(6):593-6.

¹⁵⁶Cimic A, Sirintrapun J. Amiodarone hepatotoxicity with absent phospholipidosis and steatosis: a case report and review of amiodarone toxicity in various organs. *Case Rep Pathol*. 2013;2013:201095.

¹⁵⁷Turk U, Turk BG, Yilmaz SG, Tuncer E, Alioğlu E, Dereli T. Amiodarone-induced multiorgan toxicity with ocular findings on confocal microscopy. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2015;22(2):258-60.

¹⁵⁸Gassanov N, Caglayan E, Erdmann E, Er F. [Amiodarone-induced liver dysfunctions]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2010;135(27):1372-4.

¹⁵⁹Plomp TA, Wiersinga WM, Van Rossum JM, Maes RA. Pharmacokinetics and body distribution of amiodarone and desethylamiodarone in rats after oral administration. *In Vivo*. 1987;1(5):265-79.

¹⁶⁰Takai S, Oda S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Establishment of a mouse model for amiodarone-induced liver injury and analyses of its hepatotoxic mechanism. *J Appl Toxicol*. 2015;36(1):35-47.

¹⁶¹Serrano-Martín X, Payares G, De Lucca M, Martinez JC, Mendoza-León A, Benaim G. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009b;53(12):5108-13.

¹⁶²Benaim G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Parra-Gimenez N, Plaza-Rojas L, et al. Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania Mexicana* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2295-303.

¹⁶³Pinto EG, da Costa-Silva TA, Tempone AG. Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo evaluation using phosphatidylserine-liposomes. *Acta Trop*. 2014;137:206-10.

- ¹⁶⁴Murdoch D, McTavish D. Sertraline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in depression and obsessive-compulsive disorder. *Drugs*. 1992;44(4):604-24.
- ¹⁶⁵Levine B, Jenkins AJ, Smialek JE. Distribution of sertraline in postmortem cases. *J Anal Toxicol*. 1994;18(5):272-4.
- ¹⁶⁶Melis V, Usach I, Peris JE. Determination of sertraline in rat plasma by HPLC and fluorescence detection and its application to in vivo pharmacokinetic studies. *J Sep Sci*. 2012;35(23):3302-7.
- ¹⁶⁷DeVane CL. Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. *J Clin Psychiatry*. 1992;53 Suppl:13-20.
- ¹⁶⁸Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, Garcia-Rodríguez JA. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;14(3):177-80.
- ¹⁶⁹Misri S, Kostaras D, Kostaras X. The use of selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and lactation: current knowledge. *Can J Psychiatry*. 2000;45(3):285-7.
- ¹⁷⁰Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*. 2011;77(6):572-85.
- ¹⁷¹Ayaz M, Subhan F, Ahmed J, Khan AU, Ullah F, Ullah I, et al. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. *J Biol Res (Thessalon)*. 2015;22(1):4.
- ¹⁷²Munoz-Bellido JL, Munoz Criado S, Garcia-Rodriguez JA. In vitro activity of psychiatric drugs against *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). *J Antimicrob Chemother*. 1996;37:1005–9.
- ¹⁷³Bohnert JA, Szymaniak-Vits M, Schuster S, Kern WV. Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):2057-60.
- ¹⁷⁴Drinberg V, Bitcover R, Rajchenbach W, Peer D. Modulating cancer multidrug resistance by sertraline in combination with a nanomedicine. *Cancer Lett*. 2014;354(2):290-8.

¹⁷⁵Coutaux AF, Mooney JJ, Wirth DF. Neuronal monoamine reuptake inhibitors enhance in vitro susceptibility to chloroquine in resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(6):1419-21.

¹⁷⁶Palit P, Ali N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(5):1120-4.

¹⁷⁷Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, et al. Imipramine is an orally active drug against both antimony sensitive and resistant *Leishmania donovani* clinical isolates in experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1987.

¹⁷⁸Dinesh N, Kaur PK, Swamy KK, Singh S. Mianserin, an antidepressant kills *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol*. 2014;144:84-90.

¹⁷⁹Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Naskar K, Sundar S, Dujardin JC, et al. Imipramine exploits histone deacetylase 11 to increase the IL-12/IL-10 ratio in macrophages infected with antimony-resistant *Leishmania donovani* and clears organ parasites in experimental infection. *J Immunol*. 2014;193(8):4083-94.

¹⁸⁰Singh S, Dinesh N, Kaur PK, Shamiulla B. Ketanserin, an antidepressant, exerts its antileishmanial action via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) enzyme of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res*. 2014;113(6):2161-8.

¹⁸¹Reis M, Aberg-Wistedt A, Agren H, Höglund P, Akerblad AC, Bengtsson F. Serum disposition of sertraline, N-desmethylsertraline and paroxetine: a pharmacokinetic evaluation of repeated drug concentration measurements during 6 months of treatment for major depression. *Hum Psychopharmacol*. 2004;19(5):283-91.

¹⁸²Bosch ME, Sánchez AJ, Rojas FS, Ojeda CB. Analytical methodologies for the determination of sertraline. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(5):1290-302.

¹⁸³DrugBank. [cited 2015]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01104>

¹⁸⁴Brener Z. Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitology Today*. 1986;2(7):196-7.

- ¹⁸⁵Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1305-22.
- ¹⁸⁶Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2000;85(1):11-28.
- ¹⁸⁷Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA. Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol Rep*. 2013;65(5):1247-55.
- ¹⁸⁸Li Y, Couch L, Higuchi M, Fang JL, Guo L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. *Toxicol Sci*. 2012;127(2):582-91.
- ¹⁸⁹Jewess PJ, Chamberlain K, Boogaard AB, Devonshire AL, Khambay BP. Insecticidal 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones: correlation of inhibition of ubiquinol cytochrome c oxidoreductase (complex III) with insecticidal activity. *Pest Manag Sci*. 2002;58:243-7.
- ¹⁹⁰Miguel del Corral JM, Castro MA, Gordaliza M, Martin ML, Oliveira AB, Gualberto SA, et al. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic 6(7)-alkyl-2-hydroxy-1, 4-naphthoquinones. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2002;335:427-37.
- ¹⁹¹Hashemi-Fesharki R. Chemotherapeutic value of parvaquone and buparvaquone against *Theileria annulata* infection of cattle. *Res Vet Sci*. 1991;50:204-7.
- ¹⁹²Musoke RA, Tweyongyere R, Bizimenyera E, Waiswa C, Mugisha A, Biryomumaisho S, et al. Treatment of East Coast fever of cattle with a combination of parvaquone and frusemide. *Trop Anim Health Prod*. 2004;36:233-45.
- ¹⁹³Saruhan B, Paşa S. Therapeutic efficacy of buparvaquone (buparvon) in cattle with theileriosis. *Turkiye Parazitol Derg*. 2008;32:317-21.
- ¹⁹⁴Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30:827-32.
- ¹⁹⁵Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:802-10.

- ¹⁹⁶Sharma A, Santos IO, Gaur P, Ferreira VF, Garcia CR, da Rocha DR. Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3 phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem*. 2013;59:48-53.
- ¹⁹⁷Voak AA, Seifert K, Helsby NA, Wilkinson SR. Evaluating aziridinylnitrobenzamide compounds as leishmanicidal prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:370-7.
- ¹⁹⁸Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J Appl Toxicol*. 2014;34(8):810-24.
- ¹⁹⁹Lu SF, Herbert B, Haufe G, Laue KW, Padgett WL, Oshunleti O, et al. Syntheses of (R)- and (S)-2- and 6-fluoronorepinephrine and (R)- and (S)-2- and 6-fluoroepinephrine: effect of stereochemistry on fluorine-induced adrenergic selectivities. *J Med Chem*. 2000;43:1611-9.
- ²⁰⁰Park BK, Kitteringham NR, O'Neill PM. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:443-70.
- ²⁰¹Hershko C, Peto TE. Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *J Exp Med*. 1988;168(1):375-87.
- ²⁰²Weinberg ED. Patho-ecological implications of microbial acquisition of host iron. *Rev Med Microbiol*. 1998;9:171-8.
- ²⁰³Taylor MC, Kelly JM. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology*. 2010;137(6):899-917.
- ²⁰⁴Atkinson CT, Bayne MT, Gordeuk VR, Brittenham GM, Aikawa M. Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(5):593-601.
- ²⁰⁵Lytton SD, Mester B, Libman J, Shanzer A, Cabantchik ZI. Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials: II. Evidence for differential effects on parasite iron-dependent nucleic acid synthesis. *Blood*. 1994;84(3):910-5.

²⁰⁶Hershko C, Gordeuk VR, Thuma PE, Theanacho EN, Spira DT, Hider RC, et al. The antimalarial effect of iron chelators: studies in animal models and in humans with mild falciparum malaria. *J Inorg Biochem.* 1992;47(3-4):267-77.

²⁰⁷Breidbach T, Scory S, Krauth-Siegel RL, Steverding D. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol.* 2002;32(4):473-9.

²⁰⁸Merschjohann K, Steverding D. In vitro growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2006;16:5:3.

²⁰⁹Hider RC, Liu Z. The treatment of malaria with iron chelators. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:59-64.

²¹⁰Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):547-83.

ANEXOS

Anexo1 - Paper Acta Tropica

Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania* (L.) *infantum*: an *in vitro* and *in vivo* evaluation using phosphatidylserine-liposomes

Erika G. Pinto^{a,b}, Thais A. da Costa-Silva^a, Andre Gustavo Tempone^{a,*}

^a Center for Parasitology and Mycology, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 01246-900, São Paulo SP, Brazil

^b Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000, São Paulo SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2014

Received in revised form 22 May 2014

Accepted 27 May 2014

Available online 4 June 2014

Keywords:

Leishmania
Histamine
H1 antagonist
Liposomes
Cinnarizine
Therapy

ABSTRACT

Considering the limited and toxic therapeutic arsenal available for visceral leishmaniasis (VL), the drug repositioning approach could represent a promising tool to the introduction of alternative therapies. Histamine H1-receptor antagonists are drugs belonging to different therapeutic classes, including antiallergics and anxiolytics. In this work, we described for the first time the activity of H1-antagonists against *L. (L.) infantum* and their potential effectiveness in an experimental hamster model. The evaluation against promastigotes demonstrated that chlorpheniramine, cinnarizine, hydroxyzine, ketotifen, loratadine, quetiapine and risperidone exerted a leishmanicidal effect against promastigotes, with IC₅₀ values in the range of 13–84 μM. The antihistaminic drug cinnarizine demonstrated effectiveness against the intracellular amastigotes, with an IC₅₀ value of 21 μM. The mammalian cytotoxicity was investigated in NCTC cells, resulting in IC₅₀ values in the range of 57–229 μM. Cinnarizine was *in vivo* studied as a free formulation and entrapped into phosphatidylserine-liposomes. The free drug was administered for eight consecutive days at 50 mg/kg by intraperitoneal route (i.p.) and at 100 mg/kg by oral route to *L. infantum*-infected hamsters, but showed lack of effectiveness in both regimens, as detected by real time PCR. The liposomal formulation was administered by i.p. route at 3 mg/kg for eight days and reduced the parasite burden to 54% in liver when compared to untreated group; no improvement was observed in the spleen of infected hamsters. Cinnarizine is the first antihistaminic drug with antileishmanial activity and could be used as scaffold for drug design studies for VL.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The indication of a new use for approved or existing drugs represent a fast and affordable approach to the discovery of new therapies and it has been known as drug repositioning or repurposing. Successful repurposing approaches include almost all drugs in clinical use for leishmaniasis, together with the last discovery of the anticancer drug miltefosine (Croft et al., 1996). Widespread in 98 countries with an estimated prevalence of 12 million cases worldwide, leishmaniasis remains a neglected tropical disease, resulting in a variety of clinical forms. The chemotherapy for leishmaniasis is limited and generally ineffective, causing severe side effects and relapses due to resistance (Croft and Olliaro, 2011). In mammals, the histamine is synthesized in a restricted population of neurons and its effect is mediated through four pharmacologically distinct subtypes of receptors (H1, H2, H3, and

H4) (Yanai et al., 1992). Histamine H1-receptor antagonists are drugs that competitively inhibit the release of histamine in mastocytes, but are versatile compounds used in the treatment of allergies and as anxiolytics (Kalpaklioglu and Baccioglu, 2012). The anti-infective activity of H1-antagonist derivatives has also been described against *Mycobacterium tuberculosis* (Weis et al., 2008). In this work, seven H1 antagonists were selected to be studied against extracellular and intracellular forms of *L. (L.) infantum*. The *in vivo* activity of the most effective compound was studied in a *L. infantum*-hamster model using different routes of administration as a free drug and entrapped into phosphatidylserine-liposomes.

2. Material and methods

2.1. Drugs and chemicals

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Thiazol blue; MTT), sodium dodecyl sulfate (SDS), cholesterol, miltefosine, M-199 medium, RPMI-PR- 1640 medium (without phenol red) were purchased from Sigma–Aldrich (St

* Corresponding author. Tel.: +55 3068 2974.

E-mail address: atempone@usp.br (A.G. Tempone).

Louis, MO). H1-antagonists were kindly donated by Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz (Universidade de São Paulo-Brazil). The lipids were kindly provided by LIPOID GmbH (Germany).

2.2. Bioassay procedures

BALB/c mice and golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were obtained from the animal breeding facility at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil). The animals were maintained in sterilized cages and were given water and food *ad libitum*. Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission and in agreement with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

2.3. Parasites and mammalian cells maintenance

Leishmania (L.) *infantum* amastigotes (MHOM/BR/1972/LD) were obtained from the hamster spleen by differential centrifugation and the parasite burden was determined using the Stauber method (Stauber et al., 1958). Promastigotes and macrophages were maintained as described previously (Corrêa et al., 2011).

2.4. Determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against promastigotes and amastigotes

To determine the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against *L. (L.) infantum*, promastigotes seeded were incubated in different concentrations for 48 h at 24 °C and the parasite viability was determined using the MTT assay at 570 nm (Corrêa et al., 2011). For the determination of the IC₅₀ against amastigotes, peritoneal macrophages were infected *L. (L.) infantum* amastigotes and treated with drugs for 120 h. The parasite burden was verified by light microscopy using the number of infected macrophages out of 400 cells (Yardley and Croft, 2000).

2.5. Determination of the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) against mammalian cells

Mouse cells (NCTC clone 929) were incubated with test compounds for 48 h. The viability of the cells was determined using the MTT assay at 570 nm (Tada et al., 1986).

2.6. Experimental studies

The efficacy of CNZ treatment (oral and intraperitoneal) was determined using young male golden hamsters previously infected (i.p. route) with *L. (L.) infantum* amastigotes (1×10^8 /animal). Forty days after infection, the hamsters were treated intraperitoneally and orally for eight consecutive days with CNZ ($n=5$ /group). The control group was treated with vehicles. The animals were euthanized 50 days post-infection and the parasite burden was evaluated by real time PCR using RNA samples obtained from the spleen and liver fragments (Reimão et al., 2012).

2.7. Cinnarizine entrapment in liposomes

Liposomes were prepared by the lipid hydration method followed by freeze-thawing (Szoka and Papahadjopoulos, 1980). For liposome preparation, saturated egg phosphatidylcholine, phosphatidylserine and cholesterol were used at a 7:2:1 molar ratio according to previously described methodology (Reimão et al., 2012).

2.8. Statistical analysis

All data obtained were reported as the mean of two/three independent assays. The IC₅₀ values were calculated using sigmoid dose-response curves by Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA), and the 95% confidence intervals were included in parentheses.

3. Results

3.1. In vitro determination of the antileishmanial activity

Seven H1-antagonists (Fig. 1) were *in vitro* tested against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania* (L.) *infantum*. After 48 h incubation with promastigotes, all tested drugs eliminated 100% of parasites at the highest tested concentration, with IC₅₀ values in a range of 13–84 μM (Table 1). Ketotifen and chlorpheniramine showed the lowest IC₅₀ values of 13 and 15 μM, respectively, and hydroxyzine and quetiapine the highest IC₅₀ values of 59 and 84 μM, respectively. When tested against the intracellular amastigotes, only cinnarizine displayed antileishmanial activity, eliminating 100% of amastigotes after 120 h, with an IC₅₀ value of 21.53 μM. Miltefosine was used as standard drug showing IC₅₀ values against promastigotes and intracellular amastigotes of 16.43 μM and 16.86 μM, respectively (Table 1). No damage to host cells could be observed at those concentrations need to affect *Leishmania*, as detected by light microscopy.

3.2. In vitro determination of the cytotoxicity concentration (CC₅₀)

In order to evaluate the CC₅₀ of compounds, NCTC cells were incubated for 48 h and the cell viability was determined by the colorimetric MTT method. Risperidone and loratadine demonstrated the lowest IC₅₀ values of 57 and 65 μM, respectively; hydroxyzine and quetiapine the showed the highest CC₅₀ values of 159 and 229 μM, respectively. Miltefosine was used as a standard drug and showed an IC₅₀ of 122 μM (Table 1).

3.3. Experimental evaluation of free cinnarizine (CNZ) and entrapped into phosphatidylserine-liposomes (CNZ-LP)

After 40 days of infection, *L. (L.) infantum*-infected hamsters were treated intraperitoneally with free CNZ at 50 mg/kg/day and orally at CNZ 100 mg/kg/day for eight consecutive days and the parasite burden was evaluated in spleen and liver by real-time PCR. The CNZ treated group showed similar parasite burden to untreated group, demonstrating no effectiveness; free drug was unable to reduce amastigotes in spleen and liver of infected hamsters (Fig. 2). The liposomal drug (CNZ-LP) was administered by intraperitoneal route at 3 mg/kg/day for the same period, reducing the parasite burden to 54% the in liver; no reduction in spleen could be detected. Untreated group was used for normalization and demonstrated a standard parasite burden in spleen and liver by qPCR (Fig. 2).

4. Discussion

Drug repositioning is a fast and cost-effective approach to the introduction of new therapies and represents a successful approach for neglected diseases. In leishmaniasis, some important examples include the discovery of miltefosine, an oral anticancer drug, as well as the antifungal drugs amphotericin B and the azoles (Croft et al., 2006). In this work, we demonstrated for the first time in literature the activity of histamine H1-antagonists against *L. (L.) infantum*. All tested drugs demonstrated antiparasitic activity,

Fig. 1. Chemical structures of (1) chlorferinamine, (2) cinnarizine, (3) hydroxyzine; (4) ketotifen, (5) loratadine, (6) quetiapine, (7) risperidone. Source: PubMed compound.

killing the extracellular promastigotes, but cinnarizine was the only drug which exerted selectivity towards the intracellular amastigotes, with a similar effectiveness to the standard drug miltefosine and a selectivity index of approximately 4. The lack of activity of drugs towards the intracellular amastigotes could be ascribed to diverse aspects, including the lack of specific macrophage receptors, poor targetability to the parasitophorous vacuole inside the host cells, as well as the metabolic resistance of *Leishmania* amastigotes (Tempone et al., 2010).

Considering our tested H1-antagonists, a similar chemical profile could be observed among three drugs (cinnarizine, hydroxyzine and quetiapine), as the presence of the piperazine ring. Piperazine-containing drugs as the antifungal ketoconazole has been widely used in the clinical therapy of cutaneous leishmaniasis (Andrade-Neto et al., 2012). A series of 1,4-diarylpiperazines demonstrated antitrypanosomal activity (Donkor et al., 2003), anti-*Plasmodium falciparum* activity (Gnoatto et al., 2008), as well as anti-*Leishmania donovani* activity (Mayence et al., 2004). Our work corroborate the potential antiparasitic activity of piperazine compounds and

additionally, describe for the first time the antileishmanial activity of the antihistaminic drug cinnarizine. Cinnarizine has also been described as a calcium channel blocker, inhibiting the contractions of vascular smooth muscle cells by blocking L-type and T-type voltage gated calcium channels. Antileishmanial and antitrypanosomal activities of calcium channel blockers have been described. Reimão et al. (2010) demonstrated the anti-*Leishmania infantum* activity of eight calcium channel blockers against intracellular amastigotes, with IC_{50} values in a range of 5–176 μ M.

Considering the effectiveness of cinnarizine against the clinical relevant forms of *Leishmania*, the intracellular amastigotes, we also investigated its *in vivo* potential using the *L. (L.) infantum* hamster model through the intraperitoneal and oral routes of administration. Our results demonstrated that free cinnarizine (CNZ) was ineffective to reduce the parasite burden in the liver and spleen of animals. The lack of efficacy could be ascribed to pharmacokinetic and/or pharmacodynamic problems, but if adequately studies, it could be circumvented by adequate drug delivery systems. In a previous work, Tempone and co-workers (2010) demonstrated

Table 1

Antileishmanial and mammalian cytotoxicity of H1-antagonists. The viability of promastigotes and NCTC cells was determined by the MTT assay.

Drugs	IC_{50} (μ M) 95% C.I.		
	Promastigotes	Amastigotes	NCTC
chlorpheniramine	15.07 (13.74–16.52)	na	87.39 (65.37–116.8)
cinnarizine	34.09 (30.38–38.26)	21.53 (18.56–24.96)	87.48 (65.65–116.6)
hydroxyzine	59.57 (58.36–60.81)	na	159.50 (148.70–171.10)
ketotifen	13.46 (10.84–16.71)	na	86.88 (60.97–123.8)
loratadine	52.96 (31.48–89.10)	na	69.52 (55.58–86.82)
quetiapine	84.64 (79.45–90.16)	na	229.20 (186.10–282.20)
risperidone	19.71 (16.47–23.59)	na	57.89 (49.63–67.52)

IC_{50} : 50% inhibitory concentration; 95% C.I.: 95% confidence interval; n.a.: not active. Miltefosine against promastigotes IC_{50} : 16.43 μ M (15.45–17.46); intracellular amastigotes IC_{50} : 16.86 μ M (11.57–24.57); NCTC: 122.0 μ M (94.78–157.00).

Fig. 2. *In vivo* evaluation of free and liposomal cinnarizine in *Leishmania infantum*-infected hamsters. The drug was administered for eight consecutive days as a free formulation (A and B) at 100 mg/kg (oral) and 50 mg/kg (i.p.) and the CNZ-LP (C and D) at 3 mg/kg (i.p.). Real-time PCR quantification (RNA amastigotes) of parasite burden in spleen (A and C) and liver (B and D). Data was normalized based in untreated group (control group treated with vehicle).

the superior antileishmanial efficacy of furazolidone entrapped into phosphatidylserine-liposomes (PS-LP), targeting intracellular amastigotes in liver and spleen, as observed by confocal microscopy of fluorescent-labelled liposomes. In our work, the entrapment of CNZ into PS-LP rendered a higher efficacy in liver, reducing the parasite burden to 54% when compared to untreated group. The targeting ability of PS-LP to macrophages might have improved the efficacy of CNZ in this organ, since the free drug showed lack of effectiveness. But the liposomal cinnarizine failed to treat the infection in spleen, which could be ascribed to the higher parasite burden (amastigotes/gram of organ) in this organ when compared to liver. As an alternative, higher doses, different regimens and routes of administration could be used to improve its *in vivo* efficacy. Our work demonstrated the antileishmanial activity of histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania* (*L.*) *infantum*. By using a PS-LP formulation, cinnarizine showed reduction in the parasite burden of infected hamsters and if adequately studied, could be used as scaffold for drug design studies for VL.

Ethics

All procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission (project number CEUA-IAL/Pasteur 06/2011), and in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences.

Acknowledgments

This work was supported by grants from São Paulo State Research Foundation (FAPESP project 2012/18756-1). We acknowledge FAPESP for E.G.P. scholarship (2011/23703-1) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) for the scientific award to A.G.T. We also thank Prof. Dr. Humberto G. Ferraz (University of São Paulo) for the kind donation of antihistaminics.

References

- Andrade-Neto, V.V., Matos-Guedes, H.L., Gomes, D.C., Canto-Cavaleiro, M.M., Rossi-Bergmann, B., Torres-Santos, E.C., 2012. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 107, 416–419.
- Corrêa, D.S., Tempone, A.G., Reimão, J.Q., Taniwaki, N.N., Romoff, P., Fávero, O.A., Sartorelli, P., Mecchi, M.C., Lago, J.H., 2011. Anti-leishmanial and antitrypanosomal potential of polygodol isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miels (Winteraceae). *Parasitol. Res.* 109, 231–236. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2229-8>.
- Croft, S.L., Olliaro, P., 2011. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1478–1483. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03630>.
- Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 399–410.
- Croft, S.L., Snowden, D., Yardley, V., 1996. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38, 1041–1047.

- Donkor, I.O., Huang, T.L., Tao, B., Rattendi, D., Lane, S., Vargas, M., Goldberg, B., Bacchi, C., 2003. Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J. Med. Chem.* 46, 1041–1048.
- Gnoatto, S.C., Susplugas, S., DallaVecchia, L., Ferreira, T.B., Dassonville-Klimpt, A., Zimmer, K.R., Demailly, C., Da Nascimento, S., Guillon, J., Grellier, P., Verli, H., Gosmann, G., Sonnet, P., 2008. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: design, synthesis, and biological evaluation of novel N-(3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl)-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 771–782.
- Kalpakioglu, F., Bacciglu, A., 2012. Efficacy and safety of H1-antihistamines: an update. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 11, 230–237.
- Mayence, A., VandenEynde, J.J., LeCour Jr., L., Walker, L.A., Tekwani, B.L., Huang, T.L., 2004. Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 39, 547–553.
- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chioccola, V.L., Tempone, A.G., 2012. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum* chagasi. *Exp. Parasitol.* 130, 195–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.010>.
- Reimão, J.Q., Scotti, M.T., Tempone, A.G., 2010. Anti-leishmanial and anti-trypansomal activities of 1,4-dihydropyridines: in vitro evaluation and structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 8044–8053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.015>.
- Stauber, L.A., Franchino, E.M., Grun, J., 1958. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. *J. Protozool.* 5, 269–273.
- Szoka, F., Papahadjopoulos, D., 1980. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4194–4198.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 6, 157–165.
- Tempone, A.G., Mortara, R.A., de Andrade Jr., H.F., Reimão, J.Q., 2010. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36, 159–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.04.006>.
- Yanai, K., Watanabe, T., Yokoyama, H., Meguro, K., Hatazawa, J., Itoh, M., Iwata, R., Ishiwata, K., Takahashi, T., Ido, T., 1992. Histamine H1 receptors in human brain visualized in vivo by [¹¹C] doxepin and positron emission tomography. *Neurosci. Lett.* 137, 145–148.
- Yardley, V., Croft, S.L., 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13, 243–248.

Anexo 2 - Paper PLoS One

Potential of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: Biological Activity and Structure-Activity Relationships

Erika G. Pinto^{1,2,9}, Isabela O. Santos^{3,9}, Thomas J. Schmidt⁴, Samanta E. T. Borborema¹, Vitor F. Ferreira³, David R. Rocha³, Andre G. Tempone^{1*}

1 Centre for Parasitology and Mycology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil, **2** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **3** Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Niterói, RJ, Brazil, **4** Institute of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry (IPBP), University of Münster, PharmaCampus, Münster, Germany

Abstract

Naphthoquinones have been used as promising scaffolds for drug design studies against protozoan parasites. Considering the highly toxic and limited therapeutic arsenal, the global negligence with tropical diseases and the elevated prevalence of co-morbidities especially in developing countries, the parasitic diseases caused by various *Leishmania* species (leishmaniasis) became a significant public health threat in 98 countries. The aim of this work was the evaluation of antileishmanial *in vitro* potential of thirty-six 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones obtained by a three component reaction of lawson, the appropriate aldehyde and thiols adequately substituted, exploiting the *in situ* generation of *o*-quinonemethides (*o*-QM) via the Knoevenagel condensation. The antileishmanial activity of the naphthoquinone derivatives was evaluated against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) infantum* and their cytotoxicity was verified in mammalian cells. Among the thirty-six compounds, twenty-seven were effective against promastigotes, with IC₅₀ values ranging from 8 to 189 μM; fourteen compounds eliminated the intracellular amastigotes, with IC₅₀ values ranging from 12 to 65 μM. The compounds containing the phenyl groups at R₁ and R₂ and with the fluorine substituent at the phenyl ring at R₂, rendered the most promising activity, demonstrating a selectivity index higher than 15 against amastigotes. A QSAR (quantitative structure activity relationship) analysis yielded insights into general structural requirements for activity of most compounds in the series. Considering the *in vitro* antileishmanial potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones and their structure-activity relationships, novel lead candidates could be exploited in future drug design studies for leishmaniasis.

Citation: Pinto EG, Santos IO, Schmidt TJ, Borborema SET, Ferreira VF, et al. (2014) Potential of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: Biological Activity and Structure-Activity Relationships. PLoS ONE 9(8): e105127. doi:10.1371/journal.pone.0105127

Editor: Paul Taylor, University of Edinburgh, United Kingdom

Received: June 9, 2014; **Accepted:** July 21, 2014; **Published:** August 29, 2014

Copyright: © 2014 Pinto et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP project 2012/18756-1). The authors are grateful to FAPESP scholarship awarded to EGP (2011/23703-1) and the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) scientific award given to A.G.T. Fellowships granted to V.F.F., I.O.S. by CNPq (Brazil) and D.R.R. CAPES-FAPERJ are gratefully acknowledged. This work was partially supported by CNPq grant 471588/2009-1, FAPERJ-PRONEX grant number 110.574/2010. This publication is part of the activities of the Research Network Natural Products against Neglected Diseases (ResNetNPND) (<http://www.uni-muenster.de/ResNetNPND>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: atempone@usp.br

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis is still one of the most neglected diseases, affecting the poorest population in developing countries [1]. The disease is endemic in 98 countries, with a global incidence estimated at approximately 0.9–1.6 million cases occurring each year and Brazil is among the 10 countries with the highest estimated case counts [2]. Currently, the leishmaniasis treatment is based on the use of few drugs such as pentavalent antimonials, miltefosine and amphotericin B, with medium to severe toxic side effects and long-term administration [3]. Over the past years, the lack of new medicines targeting

parasitic diseases affecting people in developing countries has become a global concern [4]. Therefore, an urgent need remains for safer and more effective drug candidates.

Naphthoquinones are a class of chemical compounds exhibiting a variety of anticancer [5], antiviral, trypanocidal, immunomodulatory and antimicrobial activities [6]. Among the 1,4-naphthoquinone derivatives in literature, some promising antimalarials have been described [7–9]. Some other series of 1,4-naphthoquinone derivatives have also been widely evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* [10], *Plasmodium falciparum* [9], and as molluscicidal candidates against *Biomphalaria glabrata* [11]. A number of reports have also shown the antiprotozoal potential of 1,4-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma*

cruzi and *Leishmania* (*L.*) *donovani* [12–13]. In the present study, a series of thirty-six 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones (**1–36**) was synthesized and evaluated against the extracellular and the clinically relevant form of the parasite, the intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum*, which is the etiologic agent of visceral leishmaniasis in Brazil and the Mediterranean region. The *in vitro* toxicity of these compounds against mammalian cells was also studied to provide the selectivity index. Finally, a QSAR analysis was conducted in order to obtain insights into the structural requirements for activity and selectivity within this series of naphthoquinone derivatives.

Materials and Methods

General Procedures

The compounds **1–36** were obtained by reaction of lawsone with formaldehyde *in situ* generating the intermediate ortho-quinonemethide, followed by nucleophilic addition of thiols adequately substituted (Figure 1). This reaction explores *in situ* generation of *o*-quinonemethides (*o*-QM) via the Knoevenagel condensation reaction between lawsone and formaldehyde [9].

Ethics Statement: Bioassay Procedures

BALB/c mice and Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were supplied by the Animal Breeding Facility at the Adolfo Lutz Institute of São Paulo. They were maintained in sterilized cages, receiving water and food *ad libitum*, under climate-controlled ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$ and relative humidity- 60%) and photoperiod-controlled (12 h light-dark cycles) environment. To avoid pain, animals were euthanized using carbon dioxide (purity 99.99%) in a gas chamber, in a flow rate of 20% of the chamber volume per minute, according to the Newcastle Consensus Meeting on Carbon Dioxide Euthanasia of Laboratory Animals (<http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=416&page=292&skin=0>). Animal procedures were performed with the approval of the Research Ethics Commission of Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (project CEUA-IAL/Pasteur 04/2011) in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences (<http://www.nas.edu>) and all efforts were made to minimize suffering.

Parasites and Macrophages Maintenance

L. (L.) infantum (MHOM/BR/1972/LD) promastigotes were maintained in M-199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.25% hemin at 24°C . *L. (L.) infantum* was maintained in golden hamsters for up to approximately 60–70 days post-infection. The amastigotes were obtained from the spleens of previously infected hamsters by differential centrifugation. The macrophages were collected from the peritoneal cavity

of BALB/c mice by washing with RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% FBS). NCTC (clone 929) murine conjunctive cells were maintained in RPMI-1640 (without phenol red and supplemented with 10% FBS) at 37°C in a humidified containing 5% CO_2 .

Determination of the Antileishmanial Activity

To determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) against *L. (L.) infantum*, drugs were dissolved previously in dimethyl sulphoxide (DMSO) and diluted with M-199 medium. Promastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1×10^6 cells per well in 96-well microplates using miltefosine as standard drug. The tested compounds were incubated at the highest concentration of $200 \mu\text{M}$ for 48 h at 24°C . Parasite viability was determined using the MTT assay [14]. Briefly, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at 5 mg/mL , sterilized through $0.22 \mu\text{m}$ membranes and incubated with cells ($20 \mu\text{L}/\text{well}$) for 4 h at 24°C . The extraction of the mitochondrial formazan was done with $80 \mu\text{L}$ of 10% SDS for 18 h at 24°C . The optical density was determined in FilterMax F5 (Molecular Devices) at 570 nm. Promastigotes incubated without compounds were used as the viability control (100% viability) and without cells (blank).

The activity against intracellular *L. (L.) infantum* amastigotes was determined in infected macrophages. Macrophages were obtained as previously described and seeded for 24 h at 1×10^5 cells/well in 16-well slide chambers (Nunc). Amastigotes were isolated from the spleens of previously infected hamsters, separated by differential centrifugation and added to the macrophages at a ratio of 1:10 (macrophage/amastigotes) for 24 h at 37°C . Non-internalized parasites were removed by washing once with medium and the cells were then incubated with the test compounds for 120 h at 37°C in 5% CO_2 , using miltefosine as standard drug. At the end of the assay, the cells were fixed in methanol, stained with Giemsa and observed under a light microscope to determine the number of intracellular parasites. The number of amastigotes was determined in 400 macrophages from the drug-treated and control wells [15].

Cytotoxicity against Mammalian Cells

The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined in NCTC clone 929 murine conjunctive cells. NCTC cells were seeded at 6×10^4 cells/well in 96-well microplates at 37°C in a 5% CO_2 . The mammalian cells were incubated with tested compounds to the highest concentration of $200 \mu\text{M}$ for 48 h at 37°C , using miltefosine as standard drug. The viability of the cells was determined by MTT assay at 570 nm [15]. The selectivity index

Figure 1. General scheme for preparing the 2-hydroxy-3-alkyl[1,4]naphthoquinones or 3-arylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones under microwave irradiation.
doi:10.1371/journal.pone.0105127.g001

(SI) was determined considering the following equation: CC_{50} NCTC cells/ IC_{50} amastigotes.

Statistical Analysis

The obtained data represent the mean and standard deviation of two independent experiments performed in duplicate. The IC_{50} and CC_{50} values were calculated using sigmoid dose-response curves performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), and the 95% confidence intervals (95% CI) were included. The ANOVA test was performed to evaluate the significance ($p < 0.05$) of data.

QSAR Analysis

The biological activity data (IC_{50} values against *L. (L.) infantum* promastigotes available for twenty-seven compounds) were transformed to a molar dimension and used for the QSAR analysis in form of their negative decadic logarithms (pIC_{50}) [16]. These values were in a range from 3.72 to 5.09. 3D molecular models of these twenty-seven compounds were generated with the modeling package MOE rel. 2011.10 (CCG, Montreal). For each structure, a conformational search was performed using a low-mode molecular dynamics method (default parameters, MMFF94X force field) as implemented in MOE. The lowest energy conformer was then energy minimized using the AM1 Hamiltonian as included in MOE's MOPAC module. The optimized geometries thus obtained were used to calculate molecular descriptors. In this study, a total of 308 descriptors were taken into consideration, i.e. analyzed for linear correlation with the target value, pIC_{50} . The full descriptor table is available from the authors (TJS) on request. Descriptor selection was performed with a genetic algorithm – multiple linear regression method (GA-MLR) as available in the MOE program GA.svl [available for MOE users on the CCG SVL exchange site, http://www.chemcomp.com/Support-SVL_Exchange.html]. This algorithm was applied to the data set using three different descriptor blocks such that (a) only 2D descriptors ($n = 186$) (b) only 3D descriptors ($n = 122$) and (c) all 308 descriptors were taken into account. For each setting, three GA runs (population size = 100) were performed, in which the allowed number of descriptors was 3, 4 and 5. The optimization criterion for the GA was a minimization of the LOF (lack of fit), the predefined maximum number of generations was 50,000 and the termination criterion was a failure to achieve an improvement (i.e. further decrease) of the LOF within 1000 generations. After termination, the final model population of each run was validated using leave-one-out cross validation and the model with the highest squared correlation coefficient (Q^2) between the cross validation predictions and the experimental biological data was chosen for further evaluation. This was achieved by applying partial least squares (PLS) regression to the best descriptor combinations found by the GA-MLR calculations. The best model found in this way is described by equation (1).

Results

Antileishmanial Activity

The antileishmanial activity of the thirty-six naphthoquinone derivatives was evaluated against promastigotes of *L. (L.) infantum* by MTT reduction assay, as shown in Table 1. After 48 h of incubation, twenty-seven compounds were active with IC_{50} values in the range of 8.09 to 189.91 μ M; compound **32** was the most active. According to the colorimetric assay of MTT and light microscopy, the active compounds killed 100% of parasites at the highest tested concentration. When tested against the intracellular amastigotes, fourteen compounds resulted in IC_{50} values in the

range of 12.98 to 65.52 μ M. Miltefosine was used as a standard drug and resulted in IC_{50} values of 16.85 and 17.80 μ M, respectively. Among the tested compounds, compound **11** was the most effective, with an IC_{50} value of 12.98 μ M against intracellular amastigotes. Compounds **11**, **20** and **21** showed a similar effectiveness to the standard drug miltefosine. Other tested compounds (**2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **12**, **19**, **25**, **26**, **27**, **28** and **34**) were effective against promastigotes, but exhibited no activity against intracellular amastigotes at the highest tested concentration. In contrast, the naphthoquinone derivatives (**1**, **9**, **13**, **14**, **15**, **24**, **31**, **35** and **36**) showed no activity (>200 μ M) against both forms of *L. (L.) infantum*.

Mammalian Cytotoxicity

The synthesized compounds were incubated with mammalian cells (NCTC clone 929) for 48 h to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and the viability was detected by the colorimetric assay with MTT. Twenty-nine compounds showed 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) values in the range between 33.89 to 183.3 μ M; compounds **9**, **10**, **11**, **13**, **14**, **15** and **24** showed lack of toxicity, and among these compounds, **10** and **11** showed activity against intracellular amastigotes. Miltefosine was used as standard drug and resulted in CC_{50} value of 122 μ M.

Analysis of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR)

In order to gain information on relationships between the chemical structure and bioactivity, a QSAR analysis was undertaken with the activity data of twenty-seven compounds against *L. (L.) infantum* promastigotes. This set of activity data had to be chosen since the number of available data points for anti-amastigote activity and the variance within this set of data were limited.

QSAR aims at a mathematical description of the contributions of structural features and chemical properties, expressed in numerical form as descriptor variables, to bioactivity. Classically, linear regression methods are used to investigate the compounds for correlations between the descriptor and the biological activity data. Here, a set of 308 molecular descriptors were analyzed using a genetic algorithm as a means of variable selection for multiple linear regression (MLR) models, followed by analysis of the resulting QSAR equations of the best MLR models using partial least squares regression (PLS).

The best performance in PLS regression among all tested models was found with a QSAR equation consisting of four 3D descriptors. This model was characterized by an R^2 (coefficient of determination for calibration vs experimental data) of 0.78 and a Q^2 value (coefficient of determination for cross validation predictions vs. experimental data) of 0.68.

QSAR equation (1):

$$pIC_{50} = 12.628 + 0.779 \text{ ASAP6} - 0.532 \text{ FASA_P} - 1.091 \text{ npr1} + 1.261 \text{ glob}$$

($R^2 = 0.780$, $RMSE = 0.176$, $Q^2 = 0.676$, $RMSE$ (cross validation) = 0.217; data were standardized to unit variance, i.e. each value was divided by the standard deviation of the descriptor column)

The descriptors encode the following properties: ASAP6 represents the accessible molecular surface area covered by atoms in a partial charge (q_i) interval from +0.25 to +0.3 e [16] while FASA_P is the fraction of accessible molecular surface area

Table 1. Antileishmanial and cytotoxicity effects of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones.

Compounds	R1	R2	Promastigotes	Amastigotes	Cytotoxicity	S.I.
			IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	
			(C.I.95%)	(C.I.95%)	(C.I.95%)	
1	H	4-CH ₃ C ₆ H ₄	na	na	89.09 (82.77–95.88)	nd
2	H	-C ₆ H ₅	124.3 (115.8–133.3)	na	84.66 (77.02–93.05)	nd
3	H	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	75.0 (71.14–79.08)	na	92.57 (90.14–95.05)	nd
4	H	4-ClC ₆ H ₄	85.38 (78.54–92.82)	na	82.20 (74.47–90.72)	nd
5	H	4-FC ₆ H ₄	129.0 (115.6–143.90)	na	97.94 (85.80–111.80)	nd
6	H	4-CH ₃ SC ₆ H ₄	188.5 (177.2–200.50)	na	100.50 (86.81–116.30)	nd
7	H	4-NO ₂ C ₆ H ₄	8.44 (4.315–16.51)	na	85.51 (79.36–92.14)	nd
8	H	4-OHC ₆ H ₄	189.91 (178.4–203.2)	65.52 (61.10–70.26)	173.62 (208.6–462.4)	2.64
9	H	Propyl	na	na	>200	nd
10	C ₆ H ₅	4-ClC ₆ H ₄	20.72 (17.73–24.21)	40.37 (13.16–123.80)	>200	>4.95
11	C ₆ H ₅	4-FC ₆ H ₄	28.82 (26.57–31.26)	12.98 (8.59–19.58)	>200	>15.4
12	C ₆ H ₅	4-CH ₃ SC ₆ H ₄	45.10 (40.72–49.95)	na	138.2 (118.4–161.4)	nd
13	H	2-CH ₃ C ₆ H ₄	na	na	>200	nd
14	H	3-CH ₃ C ₆ H ₄	na	na	>200	nd
15	H	2-Naphthyl	na	na	>200	nd
16	C ₆ H ₅	4-CH ₃ C ₆ H ₄	72.72 (58.20–90.87)	29.54 (27.68–31.52)	163.0 (143.2–185.7)	5.51
17	C ₆ H ₅	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	68.93 (62.24–76.33)	57.0 (52.01–62.46)	183.3 (48.09–698.7)	3.21
18	C ₆ H ₅	4-OHC ₆ H ₄	58.33 (50.84–66.91)	49.35 (44.66–54.53)	175.3 (81.14–378.9)	3.55
19	C ₆ H ₅	4-NO ₂ C ₆ H ₄	9.06 (7.76–10.59)	na	69.51 (53.99–89.50)	nd
20	C ₆ H ₅	3-CH ₃ C ₆ H ₄	26.43 (23.78–29.38)	14.70 (12.48–17.31)	137.6 (118.3–160.0)	9.36
21	C ₆ H ₅	-C ₆ H ₅	27.42 (24.53–30.65)	16.60 (14.28–19.29)	136.1 (115.4–160.4)	8.20
22	C ₆ H ₅	2-CH ₃ C ₆ H ₄	30.94 (28.98–33.03)	25.43 (19.78–32.69)	45.11 (32.08–63.43)	1.77
23	C ₆ H ₅	2-Naphthyl	27.52 (24.19–31.30)	46.89 (42.79–51.38)	152.7 (139.7–167.0)	3.25
24	C ₆ H ₅	Propyl	na	na	>200	nd
25	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-CH ₃ C ₆ H ₄	107.8 (95.70–121.50)	na	42.65 (34.23–53.14)	nd
26	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-ClC ₆ H ₄	49.17 (36.25–66.69)	na	33.89 (28.20–40.73)	nd
27	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-FC ₆ H ₄	51.76 (27.65–96.90)	na	42.11 (24.33–72.90)	nd
28	4-NO ₂ C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	40.08 (14.50–110.80)	na	94.18 (79.85–111.10)	nd
29	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-CH ₃ SC ₆ H ₄	20.35 (7.99–51.80)	39.15 (28.05–54.65)	75.32 (52.08–108.90)	1.92
30	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-NO ₂ C ₆ H ₄	120.5 (31.83–455.90)	45.80 (40.77–51.45)	81.56 (34.82–191.10)	1.78
31	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-OHC ₆ H ₄	na	na	134.8 (71.86–253.00)	nd
32	4-NO ₂ C ₆ H ₄	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	8.09 (3.55–18.46)	39.11 (35.41–43.19)	74.97 (45.40–123.80)	1.91
33	4-NO ₂ C ₆ H ₄	3-CH ₃ C ₆ H ₄	55.94 (26.68–117.30)	32.41 (30.62–34.31)	47.93 (42.61–53.91)	1.47
34	4-NO ₂ C ₆ H ₄	2-CH ₃ C ₆ H ₄	82.85 (45.93–149.50)	na	96.04 (88.29–104.50)	nd
35	4-NO ₂ C ₆ H ₄	Propyl	na	na	75.10 (54.27–103.90)	nd
36	4-NO ₂ C ₆ H ₄	2-Naphthyl	na	na	58.25 (34.63–98.00)	nd
miltefosine	-	-	16.85	17.80	122	6.85

na: not active; nd: not determined; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration; 95% C.I.: 95% confidence interval; S.I.: selectivity index (CC₅₀ mammalian cells/IC₅₀ amastigotes).
doi:10.1371/journal.pone.0105127.t001

covered by atoms with polar properties (i.e. $|q^i| \geq 0.2$). ASAP6 within this series of compounds is mainly influenced by the partial charge and accessibility of the OH proton at the naphthoquinone core. In some compounds its calculated partial charge is below 0.25 e and apparently there is a correlation between activity and the degree of positive charge (or electron density) and accessibility of this acidic proton. Thus, it may be stated that the overall polarity of the molecules must not be too high for improving the

antileishmanial activity (negative regression coefficient of FASA_P) while the OH proton in the quinone system has some influence, probably due to its H-bonding propensity (positive coefficient of ASAP6). Descriptors npr1 and glob are descriptors related to molecular mass distribution and shape. Npr1 is the normalized principal moment of inertia ratio pmi1/pmi3 where pmi1 and pmi3 are the first and third diagonal elements of the diagonalized moment of inertia tensor. The negative coefficient in the QSAR

equation shows that a high ratio between these two elements would be detrimental to activity, i.e. that a more even mass distribution within the molecule has an enhancing effect on activity. Along the same lines, glob represents the molecular globularity, which is 1 in case of a perfect sphere and 0 in case of a purely 1 or 2-dimensional object. The positive regression coefficient in this case indicates that a more spherical shape appears to enhance activity in this series.

A plot of experimental data vs. calibration and cross validation data is shown in Figure 2. It becomes obvious in this plot that two compounds in the highest activity range, **32** and **7**, are not well represented by the model, i.e. their activity values calculated by the QSAR equation are much lower than the experimental ones. In fact, compound **32** causes the most dramatic effect on the overall correlation, since eliminating it increased the R^2 and Q^2 values to 0.85 and 0.75, respectively (omission of both, **32** and **7** yielded 0.85 and 0.75). Based on these data, it can safely be assumed that the QSAR model presented here explains the

variance of the biological data for most of the compounds very well and thus captures the major structural influences on the bioactivity under study.

Discussion

Naphthoquinones have been considered promising scaffolds against protozoan parasites. Atovaquone, a naphthoquinone, has been used as a fixed-dose combination with proguanil for treating children and adults with uncomplicated malaria or as chemoprophylaxis for preventing malaria in travellers [17]. Other naphthoquinones as buparvaquone (2-((4-tert-Butylcyclohexyl)-methyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone), a veterinary drug against the protozoan parasite *Theileria* spp., has been found to be a promising lead against *Leishmania* spp, with IC_{50} values in the range of 0.005 and 0.12 μ M against *L. (L.) donovani* [18–19]. The synthesis of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones and their activity against the protozoan parasite *Plasmodi-*

Figure 2. Plot of experimental pIC_{50} values vs. values calculated by QSAR equation (1). Blue rhombi: calibration data, red squares: leave one out cross validation predictions. Highlighted by ellipse: Data points for compounds **7** and **32** which are not well explained by the equation. doi:10.1371/journal.pone.0105127.g002

um falciparum was recently reported by Sharma and co-workers [9] and directed us to evaluate their potential *in vitro* activity against the etiologic agent of visceral leishmaniasis in Brazil and the Mediterranean region, the *L. (L.) infantum*.

In this study, 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones were synthesized taking into consideration that the naphthoquinone core remained the same in all the assayed compounds. Their IC₅₀ values were evaluated against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. (L.) infantum*. Among the thirty-six tested compounds, twenty-seven showed activity against the extracellular form of *Leishmania*, the promastigotes, but only compounds **7**, **10**, **19**, **29** and **32** showed similar effectiveness to the standard drug miltefosine. Considering the intracellular amastigotes as the clinically relevant forms, fourteen compounds showed activity; **10**, **11**, **16**, **20** and **21** were the most selective compounds, with selectivity index above 5. Taking into account the mammalian cytotoxicity, compound **11** was the most promising candidate; it was at least 2-fold more selective than miltefosine, showing a selectivity index higher than 15. Despite the clinical use of miltefosine, it has a considerable *in vitro* cytotoxicity to mammalian cells; in our assays, it showed a selectivity index of 6.

Corroborating the study of Sharma and co-workers [9], our most promising compounds also demonstrated the two phenyl groups at R₁ and R₂, but in contrast to *Plasmodium*, the antileishmanial activity was not enhanced when the *p*-nitro group was used as a substituent at R₁. Furthermore, the presence of the two phenyl groups at R₁ and R₂ was mandatory to the anti-amastigote effect in our 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones, since the increased hydrophobicity possibly enhanced the penetration into macrophages or affected specific enzymes of the intracellular stage of the parasite. Although nitro compounds have shown promising antileishmanial activity [20] with IC₅₀ values below 100 nM against intracellular amastigotes, their elevated toxicity has also been described in literature [21]. Our data corroborates previous reports, demonstrating a higher mammalian toxicity when the nitro group was introduced to our 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones.

Among the most active compounds containing the phenyl groups at R₁ and R₂, it is noteworthy that fluorine as a substituent at the phenyl ring at R₂ (compound **11**), decisively improved the selectivity (S.I.>15) towards intracellular amastigotes, also reducing the mammalian toxicity to undetectable levels at the highest tested concentration. In contrast, the substitution of fluorine by a hydroxyl group in the same position at R₂ reduced at least 4-fold the selectivity of compound **18**. Despite the 3-fold increasing of the IC₅₀ value, the substitution of fluorine (compound **11**) by chlorine (compound **10**) was also an important contribution, rendering a promising anti-amastigote activity with low mammalian toxicity. Both chlorine and fluorine possess some extreme properties, in particular, high electronegativity and oxidation potential, which may have contributed to the selectivity towards the intracellular amastigotes without affecting the host cell. Additionally, fluorine substitution can alter the chemical properties, disposition, and biological activity of drugs. Many fluorinated compounds are currently widely used in the treatment of diseases, including antimalarials, antibacterials, antifungals, antidepressants, anti-inflammatory agents, antipsychotics, antivirals, steroids, and anesthetics [22]. Considering that fluorine is the most electronegative element in the periodic table, the replacement of a hydrogen atom for fluorine, can alter the pK_a, the dipole moments, and even the chemical reactivity and stability of neighboring functional groups [23]. Sharma and co-workers [9] demonstrated the *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* of a series of 2-hydroxy-

3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones, but conversely, the most active compounds (IC₅₀<10 μM) had a *p*-nitro phenyl group as a substituent at R₁.

Based on the substitution of methyl groups at different positions at R₂, it was possible to note a considerable alteration in the biological effect. Changing the *p*-methyl group (compound **16**) to a *m*-methyl group (compound **20**) improved about 2-fold its anti-amastigote activity and its selectivity. On the other hand, the substitution of the *m*-methyl group (compound **20**) by the *o*-methyl group (compound **22**) increased about 3-fold the mammalian toxicity, while preserving the anti-amastigote activity at a similar level. Another important contribution could be observed by comparing compounds **16** and **17**; it is notable that the substitution of a methyl group at R₂ (**16**) improved by 2-fold the anti-amastigote activity when compared to compound **17**, which displayed the methoxyl group at R₂. Finally, the presence of the sulphur group at R₂ (compound **12**) negatively contributed to the anti-amastigote effect when compared to compounds **16** and **17**.

Our synthesized series revealed moderate mammalian toxicity, as reflected by selectivity indexes ranging from 1.47 to >15. The cytotoxicity of naphthoquinones has been attributed to the induction of intrinsic apoptotic pathway in a manner associated with a significant reactive oxygen species (ROS) increase in the EL-4 mouse T lymphoma cells [24]. The capacity to produce free oxygen radicals is dramatically influenced by the nature and position of substituents and contributes to both therapeutic and toxic actions of these substances. The antitrypanosomal activity of other β-lapachol-derivatives has been attributed to the production of ROS and electrophilic metabolites, which bind to and inactivate *Trypanosoma cruzi* macromolecules [25]. Ribeiro and co-workers [26] also reported that pterocarpanquinone promotes apoptosis in *L. (L.) amazonensis* promastigotes through the formation of ROS, which cause oxidative stress, mitochondrial membrane depolarization and DNA fragmentation. It was found that diospyrin, a bisnaphthoquinonoid compound [1], and its derivative could induce apoptosis-like death in *L. (L.) donovani* promastigotes through depolarization of mitochondrial membrane potential [27]. Studies on the mechanism of antileishmanial activity showed diospyrin to be a specific inhibitor of type I DNA topoisomerase, an imperative therapeutic target for rational design of antiprotozoal drugs [28]. The antileishmanial activity of naphthoquinones against extracellular and intracellular *L. (L.) donovani* was also shown to be mediated by a nitric oxide-dependent mechanism [13].

Although the promastigote form is not the most relevant life stage with respect to the treatment of clinical infections, our QSAR analysis for the anti-promastigote activity reveals interesting general structural requirements for activity. The observation that descriptors of mass distribution and shape are of influence on the QSAR model indicates that the bioactivity under study depends on specific interactions with a particular biological target. Naphthoquinones may exert biological activity by mechanisms related to either oxidative modification or covalent interactions with target molecules. In the present case, due to the fact that the compounds do not have an unsubstituted carbon in the quinone ring, direct covalent reactions are unlikely. Quite interestingly, descriptors related to redox potential (i.e. HOMO and LUMO energies), which were also present in the variable set, did not yield significant contributions to the overall QSAR model. It may thus be assumed that the differences in activity observed between these molecules are not related to differences in the general mechanism of action but rather in subtle differences related to polarity, hydrogen-bonding and shape that influence non-covalent target binding.

It appears somewhat dissatisfactory that the two most active compounds in the series are not well described by the best QSAR equation we could find, which may indicate that these two compounds do not follow the common structure-activity relationship of the others. However, this may also mean that compounds **7** and **32** could act by a mechanism different from that of the other compounds of this series, which may be an interesting starting point for further studies. Compound **11**, the most selective compound against the intracellular amastigotes, on the other hand, is very well predicted in the QSAR model and thus seems to be mechanistically related (at least concerning the mechanism addressing the promastigotes) with the majority of the data set. However, amastigotes being the more relevant life stage for drug targeting, determination of IC₅₀ values for a larger set of compounds would be useful in order to enable us to derive a

QSAR model also for this life stage which would be desirable for further optimization of this promising class of antileishmanials.

Considering the *in vitro* antileishmanial potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones and their structure-activity relationships, these compounds appear promising novel lead candidates that could be exploited in drug design studies for leishmaniasis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AGT VFF DRR TJS. Performed the experiments: EGP IOS. Analyzed the data: EGP IOS TJS SETB VFF DRR AGT. Contributed reagents/materials/analysis tools: EGP IOS TJS SETB VFF DRR AGT. Contributed to the writing of the manuscript: EGP TJS SETB VFF DRR AGT.

References

- Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, et al. (2012) The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr Med Chem* 19: 2128–2175.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- Croft SL, Olliaro P (2011) Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* 17: 1478–1483.
- Chirac P, Torreale E (2006) Global framework on essential health R&D. *Lancet* 367: 1560–1561.
- Su JC, Lin KL, Chien CM, Tseng CH, Chen YL, et al. (2010) Furan-1,2-naphthoquinone inhibits EGFR signaling associated with G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *Cell Biochem Funct* 28: 695–705.
- Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, et al. (2002) *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Braz J Med Biol Res* 35: 811–818.
- de Rezende LC, Fumagalli F, Bortolin MS, de Oliveira MG, de Paula MH, et al. (2013) *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 4583–4586.
- Schuck DC, Ferreira SB, Cruz LN, da Rocha DR, Moraes M, et al. (2013) Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malar J* 12: 234.
- Sharma A, Santos IO, Gaur P, Ferreira VF, Garcia CR, et al. (2013) Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]-naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem* 59: 48–53.
- Ferreira SB, de Carvalho da Silva F, Bezerra FA, Lourenço MC, Kaiser CR, et al. (2010) Synthesis of alpha- and beta-pyran naphthoquinones as a new class of antitubercular agents. *Arch Pharm (Weinheim)* 343: 81–90.
- Camara CA, Silva TM, da-Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, et al. (2008) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. *An Acad Bras Cienc* 80: 329–334.
- Cameiro PF, do Nascimento SB, Pinto AV, Pinto Mdo C, Lechuga GC, et al. (2012) New oxirane derivatives of 1,4-naphthoquinones and their evaluation against *T. cruzi* epimastigote forms. *Bioorg Med Chem* 20: 4995–5000.
- Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Kapadia G, Owens K, Oghumu S, et al. (2012) Leishmanicidal activity of two naphthoquinones against *Leishmania donovani*. *Biol Pharm Bull* 35: 1761–1764.
- Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K (1986) An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93: 157–165.
- Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG (2011) Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med* 77: 572–585.
- Schmidt TJ, Heilmann J (2002) Quantitative structure-cytotoxicity relationships of sesquiterpene lactones derived from partial charge (Q)-based fractional accessible surface area descriptors (Q_{fr}ASAs). *Quant Struct Act Relat* 21: 276–287.
- Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Laloo DG, Fisher N, et al. (2013) Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother* 68: 977–985.
- Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW (1992) The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 30: 827–832.
- Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Tempone AG (2012) Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum* chagasi. *Exp Parasitol* 130: 195–199.
- Voak AA, Seifert K, Helsby NA, Wilkinson SR (2014) Evaluating aziridinyl nitrobenzamide compounds as leishmanicidal prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 370–377.
- Kovacic P, Somanathan R (2014) Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J Appl Toxicol* doi:10.1002/jat.2980
- Lu SF, Herbert B, Haufe G, Laue KW, Padgett WL, et al. (2000) Syntheses of (R)- and (S)-2- and 6-fluoronorepinephrine and (R)- and (S)-2- and 6-fluoropinephrine: effect of stereochemistry on fluorine-induced adrenergic selectivities. *J Med Chem* 43: 1611–1619.
- Park BK, Kitteringham NR, O'Neill PM (2001) Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 443–470.
- Di Rosso ME, Barreiro Arcos ML, Elingold I, Sterle H, Baptista Ferreira S, et al. (2013) Novel o-naphthoquinones induce apoptosis of EL-4 T lymphoma cells through the increase of reactive oxygen species. *Toxicol In Vitro* 27: 2094–2104.
- Salas CO, Faúndez M, Morello A, Maya JD, Tapia RA (2011) Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Curr Med Chem* 18: 144–161.
- Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavaleiro MM, et al. (2013) LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 68: 789–799.
- Mukherjee P, Majee SB, Ghosh S, Hazra B (2009) Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. *Int J Antimicrob Agents* 34: 596–601.
- Ray S, Hazra B, Mitra B, Das A, Majumder HK (1998) Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol* 54: 994–999.

Anexo 3 - Paper Bioorganic Medical Chemistry

Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators

Sebastian S. Gehrke^{a,b,c}, Erika G. Pinto^{d,e}, Dietmar Steverding^c, Karin Pleban^a, Andre G. Tempone^d, Robert C. Hider^a, Gerd K. Wagner^{a,f,*}

^a Institute of Pharmaceutical Science, School of Biomedical Sciences, King's College London, SE19NH, UK

^b School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK

^c BioMedical Research Centre, Norwich Medical School, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK

^d Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

^e Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^f Department of Chemistry, School of Biomedical Sciences, King's College London, SE19NH, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2012

Revised 8 November 2012

Accepted 9 November 2012

Available online 27 November 2012

Keywords:

Iron chelator
Anti-parasitic
Trypanosoma
Hybrid drugs
Deferiprone

ABSTRACT

Iron is an essential growth component in all living organisms and plays a central role in numerous biochemical processes due to its redox potential and high affinity for oxygen. The use of iron chelators has been suggested as a novel therapeutic approach towards parasitic infections, such as malaria, sleeping sickness and leishmaniasis. Known iron chelating agents such as Deferoxamine and the 3-hydroxypyridin-4-one (HPO) Deferiprone possess anti-parasitic activity but suffer from mammalian toxicity, relatively modest potency, and/or poor oral availability. In this study, we have developed novel derivatives of Deferiprone with increased anti-parasitic activity and reduced cytotoxicity against human cell lines. Of particular interest are several new derivatives in which the HPO scaffold has been conjugated, via a linker, to the 4-aminoquinoline ring system present in the known anti-malaria drug Chloroquine. We report the inhibitory activity of these novel analogues against four parasitic protozoa, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* and *Plasmodium falciparum*, and, for direct comparison, against human cell lines. We also present data, which support the hypothesis that iron starvation is the major cause of growth inhibition of these new Deferiprone–Chloroquine conjugates in *T. brucei*.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neglected tropical diseases such as malaria, sleeping sickness and leishmaniasis continue to pose a very considerable health threat to significant parts of the population, particularly in the developing world.¹ The causative agents of these diseases are different parasitic protozoa, namely *Plasmodium falciparum* (malaria), *Trypanosoma brucei* (human African sleeping sickness), *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) and *Leishmania* sp. (leishmaniasis). In 2008, the WHO recorded nearly 1 million deaths caused by malaria, mostly among African children.² Cases of African sleeping sickness, also known as Human African Trypanosomiasis (HAT), have been reported in 36 sub-Saharan countries, and despite significant progress in the control and treatment of HAT over the past decade, the estimated incidence of HAT still reaches 10,000 cases per annum.³ Chagas disease is a major cause of morbidity and mortality in many regions of South America, with an estimated prevalence of 16–18 million people infected and approximately 45,000

deaths per year due to cardiac disease.⁴ Cases of Visceral Leishmaniasis (VL) have been reported in 98 countries, with an estimated prevalence of 12 million cases worldwide and an incidence of 500,000 new cases per year.⁵ If untreated, all of these diseases, especially HAT and VL, can be fatal.

Current treatment options for these parasitic infections focus mainly on chemotherapy. However, existing therapies often rely on outdated and toxic drugs that were identified decades ago, such as the arsenical melarsoprol for HAT⁶ and pentavalent antimonials for VL.⁷ In the case of Chagas disease, benznidazole and nifurtimox are the only available drugs for the treatment of acute infections, but are ineffective and too toxic against the chronic stage of the disease.⁸ In addition, the clinical use of both drugs can be compromised by significant side effects such as peripheral polyneuropathy, depression of bone marrow, and allergic dermatopathy.⁹ These limitations of the few existing treatments for parasitic infections, together with growing resistance development, have created an urgent medical need for the development of new anti-parasitic agents.¹ The identification of such agents, ideally with oral availability and broad-spectrum activity against several of these parasites, is therefore a highly topical area of research.^{10–13}

* Corresponding author.

E-mail address: gerd.wagner@kcl.ac.uk (G.K. Wagner).

Table 1Activity of reference compounds Chloroquine, Desferoxamine (DFO) and Deferiprone, and of Deferiprone–CQ hybrid **2c**, against different parasites and mammalian cell lines

	GI ₅₀ (μM)			
	CQ	DFO	Deferiprone (1a)	Hybrid (2c)
<i>P. falciparum</i>	0.0025 ^a	28	67 ^b	2.4
<i>T. brucei</i>	15.6	2.9 ^c	>100	3.8
<i>T. cruzi</i>	22.2	n.a. ^d	>100	6.5
<i>L. infantum</i>	3.7	150 ^e	75 ^e , >100 ^f	27.0
HL60	128	18.4 ^c	>100	50.3
K562	n.a. ^d	33.1	n.a. ^d	38.2

^a From Ref. 13.^b From Ref. 25.^c From Ref. 18.^d Data not available.^e From Ref. 36.^f This study.

Iron has a central role in numerous biochemical processes due to its redox potential and high affinity for oxygen.¹⁴ In protozoa, as well as fungi and bacteria, iron is an essential growth factor,¹⁵ and iron chelation has been suggested as a potential new strategy to combat parasitic infections.¹⁶ It has previously been shown that the iron chelator desferoxamine (DFO, Table 1) compromises the activity of Fe(III)-containing enzymes in parasitic protozoa such as ribonucleotide reductase, which is directly involved in DNA synthesis, by chelating cellular iron.^{17–20} Consequently, iron chelators interfere with the growth of protozoan parasites, and DFO has been reported to successfully clear human hosts from *P. falciparum* in over 90% of those treated,²¹ and to also possess cytotoxicity against *T. brucei*.^{18,19} While these results illustrate the potential of DFO and related iron chelators for anti-parasitic applications, the clinical use of DFO itself is compromised by its poor oral availability.^{21,22}

In contrast to DFO, iron chelators of the 3-hydroxypyridin-4-one (HPO) class such as the marketed drug Deferiprone (**1a**, Table 1) are orally active, which is partly due to their relatively low-molecular weight compared to DFO. Despite a molecular weight of <140, **1a** and related HPOs are effective iron chelators with a high selectivity for Fe(III), due to the formation of 3:1 complexes with the metal (Fig. 1). Deferiprone itself, which is used clinically for the treatment of iron overload,²³ has also been assessed for its anti-malarial potential. Although the drug has moderate in vitro activity against *P. falciparum* (Table 1), its in vivo anti-malarial activity, at dosages that are effective for treating iron overload, is poor.²⁴ Structural modifications in position N1, including the introduction of acidic functionalities, did not significantly improve the in vitro activity of **1a**.^{21,25} In addition, **1a** as well as these N1-modified derivatives had only moderate selectivity for *P. falciparum* and also showed significant cytotoxicity against mammalian cells.^{25,26}

In order to improve the anti-parasitic activity of **1a**, we have designed novel derivatives of **1a**, in which the HPO scaffold has been

Figure 1. Deferiprone (**1a**) in complex with Fe(III).

conjugated, via a linker at N1, to the 4-aminoquinoline ring system present in the known anti-malarial drug Chloroquine. Previously, such a conjugation strategy with Chloroquine has been used successfully with other bioactive moieties.^{27–31} Herein we present the results from the application of this approach to iron chelators of the HPO class. We have synthesized a series of new Deferiprone–Chloroquine hybrids and investigated their activity against *P. falciparum* and, in two cases, also against three other protozoal parasites (*T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania infantum*). Although conjugation to Chloroquine resulted in improved anti-malarial activity relative to the parent **1a**, the new hybrids were less active than Chloroquine alone. Intriguingly, however, one of the new Deferiprone–Chloroquine hybrids showed increased activity against both trypanosome species (*T. brucei* and *T. cruzi*) compared to both **1a** and Chloroquine. Previously, **1a** had never been evaluated against *Trypanosoma*, and these are the first examples for the anti-trypanosomal activity of this class of iron chelator. Additional mode-of-action experiments with *T. brucei* strongly indicate that iron deprivation contributes significantly to the anti-trypanosomal activity of the new Deferiprone–Chloroquine conjugates. Taken together, our results suggest that the conjugation of HPO iron

Scheme 1. Synthesis of HPOs **2a–e** conjugated to Chloroquine and Chloroquine derivatives. Reagents and conditions: (i) 2-(4-bromobutyl)isoindoline-1,3-dione, NaHCO₃, DMF or DMSO or MeCN or EtOH; (ii) **3a**: ethylenediamine (9 equiv), reflux, 12 h; **3b**: 1,3-diaminopropane (7 equiv), reflux, 12 h; **3c**: 1,4-diaminobutane (5 equiv), 160–180 °C, 18 h; (iii) **7**, 2 N NaOH, pH 13, aqueous EtOH (25%), reflux, 12 h; (iv) 6 N HCl, reflux, 2 h; (v) 5% Pd/C, H₂, ethanol, aq HCl; (vi) NaOH (1.1 equiv), BnBr (1.1 equiv), aq MeOH (50%), reflux, 6 h; (vii) 1,4-diaminobutane (1 equiv), 10 N NaOH, pH 13, reflux, 18 h; (viii) **6c**: 4,7-dichloroquinoline (1 equiv), or **6d**: 4-chloroquinoline (1 equiv), DMSO, 100–110 °C, 12 h.

chelators to a second bioactive moiety is a promising strategy against *Trypanosoma* parasites.

2. Chemistry

The new Deferiprone derivatives **2a–e**, which are conjugated via an alkyl linker to various 4-aminoquinolines, were prepared in analogy to our previously reported syntheses for simple N1-substituted HPOs (Scheme 1).³² The central step in this approach is the installation of the N1-substituent via the double Michael addition of a suitable primary amine to the benzyl-protected maltol derivative **7**. In order to prepare the HPO derivatives **2a–e**, we employed two different variations of this general strategy (Scheme 1). For the preparation of HPOs **2a–c**, we followed strategy A, which is characterized by the installation of the linker at the Chloroquine fragment prior to the double Michael addition. For this strategy, the primary amines **3a–c** were required as intermediates. In initial trials, all attempts to alkylate aminoquinoline **4** by reaction with *N*-(4-bromobutyl)phthalimide were unsuccessful, probably due to the limited nucleophilicity of the aromatic amino group. In order to overcome

this reactivity problem, we switched to a S_NAr strategy, as also described recently by Pérez et al.²⁸ Thus, 4,7-dichloroquinoline **5** was reacted in neat solution of different diaminoalkanes to provide the desired amines **3a–c** in moderate yields (48–66%). Conveniently, **3a–c** were afforded as white crystals after re-crystallization from ethanol/ether. In the next step, the primary amines **3a–c** were reacted with benzyl-protected maltol **7** in aqueous ethanol and in the presence of catalytic amounts of sodium hydroxide to give the double Michael addition products **6a–c**. Interestingly, we found that the base-catalyzed Michael addition reaction is pH sensitive. The best yields were achieved at pH 13. Finally, removal of the benzyl protecting group under acidic conditions gave the target HPOs **2a–c**.

HPOs **2d–e** were obtained via synthetic strategy B, in which the N-substituted HPO core was prepared by a double Michael addition of 1,4-diaminobutane to **7** (Scheme 1). The resulting primary amine **8** was then used in an S_N reaction with, respectively, 4,7-dichloroquinoline or 4-chloroquinoline, to provide the benzyl-protected HPOs **6c** and **6d**. Removal of the benzyl protecting group in **6c** under acidic conditions provided an alternative synthetic entry to HPO **2c**, while deprotection of **6c** by catalytic dehydrogenation led to concomitant dehalogenation in position 7, thus affording HPO **2d**. Analogously, deprotection of **6d** by catalytic hydrogenation gave target HPO **2e**.

Finally, we also prepared derivative **10** in which the linker contains an amide functionality (Scheme 2). For the preparation of **10**, **7** was reacted with γ -aminobutyric acid (GABA) to afford the free carboxylic acid **9**. Standard coupling conditions with DCC, DMAP and 4-aminoquinoline gave the desired amide and, after removal of the benzyl protecting group via catalytic hydrogenation, the target HPO **10**.

Scheme 2. Synthesis of HPO **10** containing an amide group in the linker. Reagents and conditions: (i) GABA (1.2 equiv), aq EtOH (50%), 10 N NaOH, pH 13, reflux, 18 h; (ii) 4-aminoquinoline (1 equiv), DCC (1.2 equiv), DMF, 70 °C, 12 h; (iii) Pd/C, H₂, ethanol, pH 1 (HCl).

3. Biological results

We have previously shown that Deferiprone (**1a**) has modest activity against *P. falciparum* (Table 1).²⁵ Conjugation of the HPO

Table 2
Anti-plasmodium activity of HPOs **2a–e** and **10**

Compd	n	R ¹	R ²	GI ₅₀ (μM)		SI ^b
				<i>P. falciparum</i> ^a	K562	
2a	2	Cl	H	7.0	182.2	26
2c	4	Cl	H	2.4	38.2	16
2d	4	H	H	1.6	27.1	17
2e	4	H	CH ₃	9.0	204.2	23
10	n/a	n/a	n/a	6.0	127.7	21

^a Strain ITG2G1.^b Selectivity index.**Table 3**
Anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity of HPOs **1a–d**, **2c**, **2d** and **3c**

Compd	R	GI ₅₀ (μM)			
		<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i> ^a	HL60
1a	CH ₃	>100	>100	>100	>100
1b	C ₈ H ₁₇	3.6 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.2 ± 0.4	11.2 ± 0.4
1c	C ₁₀ H ₂₁	1.4 ± 0.05	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.03	6.3 ± 0.2
1d	C ₂ H ₄ NH ₂	>100	>100	>100	111 ± 2
2c	n.a.	3.8 ± 1.0	6.5 ± 0.1	27.1 ± 7.0	50.3 ± 1.1
2d	n.a.	7.6 ± 0.4	>100	>100	>100
3c	n.a.	15.8 ± 1.3	46.3 ± 13.4	42.4 ± 4.8	>100

^a Promastigote form.

scaffold in **1a** via a linker to different 4-aminoquinolines, the pharmacophore of the known anti-malarial Chloroquine (CQ) significantly improved anti-plasmodial activity (Table 2). All of the new HPO-conjugates **2a–e** and **10** showed enhanced anti-plasmodial activities compared to the parent **1a**, as well as a favorable cytotoxicity profile, with 16- to 26-fold selectivity for *P. falciparum* over a mammalian cell line. However, **2a–e** and **10** were less active than CQ alone. While low micromolar activity against *P. falciparum* was observed with all analogues in this series, irrespective of the nature or length of the linker, the best results were achieved with analogues **2c** and **2d**, both in terms of anti-plasmodium activity and parasite selectivity. We therefore selected these two conjugates for further studies with other parasites.

While Deferiprone (**1a**) and some N1-substituted derivatives have previously been tested against *P. falciparum* and *Plasmodium berghei*,^{21,25,26} the activity of this class of iron chelators against *Trypanosoma* has never been evaluated. To assess the anti-trypanosomal

activity of **1a** and its derivatives **2c** and **2d**, we used established viability assays for these parasites.^{33–35} While the parent compound **1a** (Deferiprone) had moderate activity against *Plasmodium*, it was inactive against *T. brucei* and *T. cruzi* at concentrations up to 100 μM (Table 1). The Deferiprone conjugates **2c** and **2d**, on the other hand, showed activity against *T. brucei* at low micromolar concentrations, similar to their activity against *P. falciparum* (Table 3). Compound **2c**, but not **2d**, was also active against *T. cruzi*. This anti-trypanosomal activity cannot be attributed exclusively to the presence of the Chloroquine fragment, as both CQ itself and the Chloroquine-based synthetic precursor **3c**, which corresponds to the Chloroquine-conjugate **2c**, but without the HPO fragment, were four- to sixfold less active against both trypanosome species than **2c**.

Chloroquine-conjugate **2c**, but not its close structural analogue **2d**, also displayed activity against *L. infantum* promastigotes in our anti-leishmanial assay (Table 3).³⁴ Against this parasite, **2c** was at least four times more active than its parent Deferiprone **1a**, which did not show any activity in our own experiments at concentrations up to 100 μM (Table 1), even though moderate activity against *L. infantum* has previously been reported for **1a**.³⁶ *Leishmania* promastigotes were approximately fourfold more resistant to **2c** than *T. cruzi* trypomastigotes. It has previously been observed that *Leishmania* parasites are less susceptible to drugs than *T. cruzi*.³⁵ The different bioactivities of the new HPO-conjugate **2c** against these two parasites are therefore not entirely unexpected. Compound **2c** was also tested against the intracellular amastigote forms of *L. infantum*, but showed no activity at the highest concentration that was tested (60 μM). This may be due to the different metabolism of amastigotes, which live in the unusual intracellular milieu of macrophages, and/or the limited uptake of **2c** by macrophages. In this context it is interesting to note that the substitution of Cl (**2c**) with H (**2d**) abolished the toxicity to mammalian cells, but also reduced anti-leishmanial activity.

Taken together, these results suggest that conjugation of **1a** to a Chloroquine-like fragment leads to synergistic, anti-parasitic effects, which are particularly pronounced against trypanosomes, but more modest against *Leishmania*. To understand the role of the Chloroquine fragment for the anti-parasitic activity of the new HPO-Chloroquine conjugates, we also investigated the activity of selected Deferiprone derivatives with simple alkyl substituents in position N1 against *T. brucei*, *T. cruzi* and *L. infantum*. Interestingly, the octyl- and decyl-substituted derivatives **1b** and **1c** showed potent activity in the low micromolar range against all three parasites (Table 3). However, both iron chelators were also cytotoxic towards HL-60 cells at only slightly higher concentrations, resulting in a relatively modest selectivity index (Table 4). Previously, partition coefficients (log*P* values) close to 1 have been

Table 4
Selectivity indices and log*P* values of HPOs **1a–c**, **2c** and **2d**

Code	R	X	SI ^a			Log <i>P</i> ^b
			<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	
1a	CH ₃	n/a ^c	n.d. ^d	n.d. ^d	n.d. ^d	0.40
1b	C ₈ H ₁₇	n/a ^c	3	4	4	3.56
1c	C ₁₀ H ₂₁	n/a ^c	5	8	9	4.45
2c	n/a ^c	Cl	13	8	2	1.40
2d	n/a ^c	H	>13	n.d. ^d	n.d. ^d	1.25
CQ	n/a ^c	n/a ^c	8	6	35	n.d. ^d

^a Selectivity index versus HL60 cells.^b Calculated clog*P* values for **1a–1c**, experimentally determined log*P* values for **2c** and **2d**, see Supplementary data for details.^c Not applicable.^d Not determined.

suggested as favorable for both inhibition of iron release and membrane permeability,²⁶ while higher log*P* values have been associated with increased toxicity of Deferiprone derivatives.²⁶ This correlation between lipophilicity and toxicity appears to hold for the new derivatives **1b** and **1c**, which both have clog*P* values greater than 3.5 (Table 4). Experimentally determined log*P* values for Chloroquine-conjugates **2c** and **2d**, on the other hand, were significantly lower, and both **2c** and **2d** had a more favorable selectivity profile than either **1b**, **1c** or Chloroquine alone, at least against *T. brucei* (Table 4). A possible explanation for these results is that Deferiprone analogues with a simple alkyl substituent in position N1 (e.g., **1b**, **1c**) may act non-specifically on iron depletion within the cellular compartment of both parasite and mammalian cells, resulting in their general cytotoxicity. In contrast, Chloroquine-conjugates **2c** and **2d** may have a certain preference for parasite cells, at least in the case of *T. brucei*. An alternative explanation for the non-specific cytotoxicity of **1b** and **1c** may be that molecules with a long *N*-alkyl substituent attached to a hydrophilic fragment can induce membrane disruption.³⁷

To further investigate the anti-parasitic activity of the hybrid molecules, we next carried out mode-of-action studies. First, we determined important physicochemical parameters for the new HPO–Chloroquine conjugates, namely their *pK_a* values and absolute stability constant for Fe(III), *pFe*³⁺. The HPO–Chloroquine conjugates are characterized by three possible protonation states *pK_{a1}* (protonation of the 4-oxo group), *pK_{a2}* (protonation of the quinoline ring nitrogen) and *pK_{a3}* (dissociation of the 3-OH group; Supplementary data). For compounds **2a–2e**, *pK_{a2}* values range from 7.5 to 9.6, indicating that a significant proportion of each compound is protonated at pH 7.4 (Supplementary data). Consequently, the neutral fraction of each HPO–Chloroquine conjugate is relatively small, and only a minor percentage would be expected to readily cross biological membranes through passive diffusion. **2e** with the highest *pK_{a2}* of all compounds has the lowest distribution coefficient *D*_{7.4}, whereas **2c** with an *pK_{a2}* of 8.2 has the highest *D*_{7.4} (Supplementary data). This indicates that in this series, a *pK_{a2}* of ~8 leads to the best distribution profile, in keeping with the superior bioactivity of **2c** and **2d** against *P. falciparum*.

To assess the efficacy of HPO–Chloroquine conjugates as iron chelators we next determined *pFe*³⁺ over a pH range of 2–11. For these experiments, **2e** was selected as the best suited HPO–Chloroquine conjugate due to its relatively good solubility in aqueous

media. Using a spectrophotometric titration method, we determined the *pFe*³⁺ value of **2e** as 21.1 at pH 7.45. Interestingly, this value falls between the *pFe*³⁺ values of **1a** (19.3) and DFO (26.6). This result therefore suggests that conjugation to CQ does not interfere with the iron chelation capacity of HPOs, and that the new HPO–Chloroquine conjugates remain potent iron chelators.

Finally, we investigated the relevance of iron chelation for the anti-trypanosomal activity of the HPO–Chloroquine conjugates in live trypanosomes. For these mode-of-action experiments we focused on *T. brucei*, as relatively straightforward assays exist to investigate the effect of iron depletion with bloodstream forms of this parasite. It has previously been shown that under conditions of iron deprivation, *T. brucei* upregulates the expression of their transferrin receptor (*TbTfR*).³⁸ *TbTfR* expression therefore is an indicator of the parasite's iron status, and we studied the upregulation of *TbTfR* by the parasite in the presence of **2d**. As a measure of *TbTfR* upregulation, we quantified the uptake of fluorescently labeled transferrin by *T. brucei* using FACS analysis. Under these conditions, the parasite showed an increased uptake of transferrin by a factor of 1.6 in the presence of **2d**, compared to control cells incubated with DMSO (Fig. 2). Transferrin uptake was also increased, by a factor of 2.0, by the known iron chelator DFO. These results suggest that the capacity of **2d** to act as an iron chelator under cellular conditions is responsible, at least in part, for its anti-trypanosomal activity. This interpretation is further confirmed by the observation that pre-incubation of **2d** with FeCl₃, and thus saturation of the iron chelator with Fe(III), results in a complete loss of activity against *T. brucei* in our cytotoxicity assay. It should be noted that the iron-saturated compound **2d** is not charged but neutral (Fig. 1) and therefore able to penetrate the parasite plasma membrane and diffuse into the cytosol. However, the excess concentration of free Fe(III) ions in solution most likely scavenges all of the iron chelator, leaving the parasite with enough iron (e.g., from transferrin) to maintain viability.

4. Conclusion

We describe herein the anti-parasitic activity of several derivatives of the known iron chelator Deferiprone (**1a**). Derivatives of HPO **1a** with simple alkyl substituents in position N1 are generally cytotoxic both against parasites and mammalian cells. In contrast, a new class of N1-substituted HPO derivatives conjugated to the known anti-malarial Chloroquine showed preferential activity against parasitic cells, in particular in the case of *P. falciparum* and *T. brucei*. The new HPO derivatives retain their potent iron chelating capacity, which very likely forms the basis for their anti-parasitic activity. Importantly, the activity of the most potent conjugate **2c** against *T. brucei* and *T. cruzi* is clearly improved relative to both parent compounds. Thus, the anti-trypanosomal activity of **2c** was increased >25-fold against *T. brucei* and >15-fold against *T. cruzi* compared to Deferiprone, and about fourfold against both species compared to Chloroquine.

These results represent a promising starting point to revisit the application of iron chelators, in particular of the HPO class, as anti-parasitic agents. Our findings suggest that, at least against trypanosomes, our conjugation strategy leads to synergistic effects between the HPO and Chloroquine fragments, while retaining reasonable selectivity indices. The good anti-trypanosomal activity is particularly remarkable, as neither Deferiprone, nor Chloroquine alone, are potent anti-trypanosomal agents. Results from *pK_a* studies indicate that the neutral, membrane-permeant fraction of even the best HPO–Chloroquine conjugates in this series is relatively small. Modification of their acid/basic properties may therefore represent a promising strategy for further optimisation of the anti-trypanosomal activity of this class of iron chelators.

Figure 2. Accumulation of fluorescein-labeled transferrin in bloodstream forms of *T. brucei* upon incubation with **2d** (CP421) and DFO. Conditions: Trypanosomes (5×10^5 /mL) were incubated with 50 μ M **2d** (CP421), 25 μ M DFO or DMSO (control) in Baltz medium supplemented with 16.7% heat-inactivated FBS. After 24 h incubation, trypanosomes were harvested and washed three times with Baltz medium supplemented with 2% BSA. Then, the cells were incubated with 50 μ g/mL fluorescein-labeled transferrin in Baltz medium/2% BSA for 2 h. After washing twice with PBS/1% glucose, cells were fixed with 2% formaldehyde/0.05% glutaraldehyde, and analyzed by flow cytometry using a DB Accuri C6 flow cytometer.

5. Experimental section

5.1. General

All chemicals were purchased from commercial sources and were used as received, unless otherwise noted. Compounds **1a–d** were prepared as previously reported.³² Dry solvents were obtained commercially or dried under standard procedures. Reactions were carried out under normal atmosphere, unless stated otherwise. Reaction products were purified by flash chromatography and characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS, HRMS-MS, IR and TLC. Flash chromatography columns were packed wet and the separation was carried out at 1 bar. NMR spectra were recorded on a Varian VXR 400S spectrometer at 400 MHz or on a PerkinElmer R32 at 90 MHz. Chemical shifts (δ) are reported in ppm and coupling constants (J) in Hz. Signals are referenced to the residual protons of the respective deuterated solvent. High- and low-resolution mass spectra (LR-MS and HR-MS) were obtained on a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer with electrospray ionization at the EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre, Swansea. IR spectra were recorded on a PerkinElmer 298. Analytical HPLC was carried out on a PerkinElmer Series 200 machine equipped with a SupelcosilTM LC-18-T column (5 μ m, 25 cm $\times$ 4.6 mm), a column oven (set to 35 $^{\circ}$ C), and a diode array detector. Compound purity was determined under the following conditions: 0–100% MeOH over 60 min (flow rate: 1 mL/min); detection wavelengths: 280 and 354 nm. Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated aluminum plates (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck). Compounds were visualized by exposure to UV light (254 nm wavelength) or by staining with ninhydrin, molybdic acid or KMnO₄ solution.

5.2. Synthesis

5.2.1. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[(7-chloro-4-quinolyl)amino]ethyl]pyridinium chloride (**2a**)

To a solution of **7** (1.5 g, 0.0068 mol) in aq ethanol (83% v/v, 36 mL) was added **3a** (2.2 g, 0.010 mol). The pH was adjusted to 13 with aq NaOH (10 N) and the reaction was heated to reflux for 12 h. The solvents were removed and the residue was dissolved in water. The pH was adjusted to 1 with aq HCl, and the aqueous solution was washed with ether. The pH was adjusted to 7, and the aqueous solution was extracted with CHCl₃. The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed in vacuo. To remove the protecting group, the residue was taken up in aqueous HCl (6 N, 30 mL) and heated to reflux for 2 h. The solvents were removed and the resulting solid was recrystallized from methanol to give 1.1 g of the title compound as a white solid (39% yield). Mp: 296–303 $^{\circ}$ C. ¹H NMR (90 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.88 (m, 2H, CH₂NH₂), 4.57 (m, 2H, NHCH₂), 6.70–8.40 (m, 7H, 7 $\times$ ArCH). IR (KBr, cm⁻¹): 2400–3300 (ν_{OH} , ν_{NH}). LR-MS: m/z 330 (100%, [M+H]⁺), 154 (63%).

5.2.2. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[(7-chloro-4-quinolyl)amino]propyl]pyridinium chloride (**2b**)

To a solution of **7** (1.5 g, 0.006 mol) in aq ethanol (83% v/v, 60 mL) was added **3b** (2.07 g, 0.010 mol) followed by aq NaOH (2 N) until pH 12.5 was reached. The reaction mixture was heated to reflux overnight. The solvents were removed and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃:MeOH 9:1 + 0.9% NH₃) to afford 4.3 g of **6b** (62% yield). To remove the protecting group, this material was dissolved in aqueous HCl (12 N, 30 mL) and heated to reflux for 2 h. Recrystallisation from methanol/ether gave the title compound as a white solid. Mp: 253.3–254.8 $^{\circ}$ C. ¹H NMR (90 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 1.90–2.40 (m, 2H, CH₂), 2.40 (s,

3H, CH₃), 3.30–3.60 (m, 2H, CH₂NH), 4.23–4.50 (m, 2H, NCH₂), 6.60–8.78 (m, 7H, 7 $\times$ ArCH). IR (KBr, cm⁻¹): 2400–3300 (ν_{OH} , ν_{NH}). LR-MS: m/z 344 (100%, [M+H]⁺), 219 (42%), 191 (31%).

5.2.3. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[(7-chloro-4-quinolyl)amino]butyl]pyridinium chloride (**2c**)

Strategy A: To a solution of **7** (1.3 g, 0.006 mol) in aq ethanol (83% v/v, 30 mL) was added **3c** (1 g, 0.004 mol) followed by aq NaOH (2 N) until pH 13 was reached. The mixture was refluxed over night, concentrated and extracted with CHCl₃ (3 $\times$ 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated. Purification by flash chromatography (CHCl₃/MeOH 8:2 + 0.25–0.3% aq NH₃) afforded 0.9 g of **6c** as a yellow-orange solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 1.61–1.74 (m, 4H, β , γ -CH₂), 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.38–3.44 (m, 2H, δ -CH₂), 3.94 (t, 2H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, α -CH₂), 5.00 (s, 2H, CH₂), 6.16 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3-HPO-CH), 6.65 (d, 1H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 3-Ar-CH), 7.29–7.39 (m, 5H, 5 $\times$ Ar-CH), 7.56 (dd, 1H, ^{3,4}J_{H,H} = 2.2, 9.0 Hz, 6-Ar-CH), 7.68 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2-HPO-CH), 7.91–7.97 (m, 1H, 8-Ar-CH), 8.45 (d, 1H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 2-Ar-CH), 8.58 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.0 Hz, 5-Ar-CH), 8.69–8.74 (m, 1H, NH). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 11.9 (CH₃), 24.4, 27.7 (β -, γ -CH₂), 42.2 (δ -CH₂), 52.4 (α -CH₂), 71.8 (CH₂), 98.6 (3-Ar-CH), 116.0 (3-HPO-CH), 116.5 (Ar-C), 123.1 (8-Ar-CH), 125.3 (5-Ar-CH), 125.4 (6-Ar-CH), 127.8 (Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 135.7 (Ar-C), 137.7 (Ar-C), 139.6 (2-HPO-CH), 140.8 (Ar-C), 143.7 (Ar-C), 145.3 (Ar-C), 147.1 (2-Ar-CH), 152.8 (Ar-C), 171.8 (C=O). LR-MS: m/z 447.1 (100%); HR-MS: 447.0729 [M]⁺, calculated for C₂₆H₂₆ClN₃O₂: 447.1714. This material was dissolved in aq HCl (6 N, 30 mL) and the solution was heated to reflux for 2 h to remove the protecting group. The reaction mixture was concentrated in vacuo, and the resulting precipitate was recrystallized from ethanol/acetone, to give the title compound **2c** as a white solid. **Strategy B:** A mixture of **8** (2.7 g, 0.0094 mol) and **5** (1.86 g, 0.0094 mol) in DMSO (30 mL) was heated to 100–110 $^{\circ}$ C overnight. The solvent was removed in vacuo and the residue was purified as described in Strategy A, to give 2.1 g of **6c** as a white solid in 50% yield. Deprotection of **6c** and subsequent purification was carried out as described in Strategy A, to give the title compound **2c** as a white solid. Mp: 130.1–131.9 $^{\circ}$ C. HPLC: 20.6 min (99%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 1.68–1.79 (m, 2H, γ -CH₂), 1.83–1.92 (m, 2H, β -CH₂), 2.53 (s, 3H, CH₃), 3.54–3.61 (m, 2H, δ -CH₂), 4.38 (t, 2H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, α -CH₂), 6.89 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 5-HPO-CH), 7.18 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3-Ar-CH), 7.77 (dd, 1H, ^{3,4}J_{H,H} = 2.1, 9.1 Hz, 6-Ar-CH), 8.07 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, 8-Ar-CH), 8.26 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 2-Ar-CH), 8.55 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 6-HPO-CH), 8.77 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 5-Ar-CH), 9.56 (t(br), 1H, ³J_{H,H} = 5.4 Hz), 14.27 (s(br), 1H, OH). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ : 12.5 (CH₃), 24.2 (CH₂), 26.9 (CH₂), 42.5 (CH₂), 55.3 (CH₂), 98.6 (2'-HPO-CH), 110.7 (3-Ar-CH), 115.5 (Ar-C), 119.1 (8-Ar-CH), 125.9 (5-Ar-CH), 126.9 (6-Ar-CH), 138.0 (Ar-C), 138.5 (2-Ar-CH), 142.9 (Ar-C), 143.2 (Ar-C), 155.4 (Ar-C), 166.3 (C=O). IR (KBr, cm⁻¹) 2500–3300 (ν_{OH} , ν_{NH}). LR-MS: m/z 358 (100%, [M+H]⁺), 233 (75%), 154 (38%).

5.2.4. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[(4-quinolyl)amino]butyl]pyridinium chloride (**2d**)

The title compound was prepared from **8** and **5** as described in the synthesis for **9c** (Strategy B), but with a different deprotection procedure. The primary reaction product **6c** was dissolved in ethanol, the pH was adjusted to 1 with aq HCl, and hydrogenation was carried out in the presence of 5% Pd/C to give the title compound **2d** as a white solid. Mp: 216.5–221.0 $^{\circ}$ C. ¹H NMR (400 MHz, D₂O, ppm) δ : 1.80–1.89 (m, 2H, CH₂), 1.98–2.06 (m, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, CH₃), 3.58 (t, 2H, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, CH₂), 4.38 (t, 2H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, CH₂), 6.65 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3-HPO-Ar-CH), 6.93 (d, 1H,

$^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 3-Ar-CH), 7.65 (at, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$, 8.4 Hz, 7-Ar-CH), 7.75 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 5-Ar-CH), 7.90 (at, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$, 8.4 Hz, 6-Ar-CH), 7.99 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, 2-Ar-CH), 8.03 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, 8-Ar-CH), 8.21 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 2-HPO-Ar-CH). ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O , ppm) δ : 15.1 (CH_3), 26.1 (CH_2), 29.3 (CH_2), 45.1 (CH_2), 59.2 (CH_2), 100.8 (3-HPO-Ar-CH), 113.6 (3-Ar-CH), 119.4 (Ar-C), 122.8 (5-Ar-CH), 124.7 (8-Ar-CH), 130.0 (7-Ar-CH), 136.6 (6-Ar-CH), 140.1 (Ar-C), 141.5 (2-Ar-CH), 144.2 (2-HPO-Ar-CH), 145.7 (Ar-C), 158.5 (Ar-C), 161.6 ($\text{C}=\text{O}$). IR (KBr, cm^{-1}): 2500–3500 (ν_{OH} , ν_{NH}). LR-MS: m/z 324 (45%, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 233 (100%).

5.2.5. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[2-methyl-4-quinolyl]amino]butyl]pyridinium chloride (2e)

A solution of **8** (2.5 g, 0.0087 mol) and 4-chloroquinaldine (1.5 g, 0.0087 mol) in DMSO was maintained at 110 °C overnight. The solvent was removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 + 0.5% NH_3) to afford 2.0 g of **6d** (54% yield). To remove the protecting group, this material was dissolved in aqueous HCl (6 N, 50 mL) and heated to reflux for 2 h. The solvent was removed in vacuo. Recrystallization of the residue from methanol/ether afforded the title compound **2e** as a white solid. Mp: 180 °C. ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 1.70 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.54 (s, 3H, CH_3), 3.30–3.55 (m, 2, CH_2NH), 4.10–4.45 (m, 2H, CH_2N), 6.50–8.90 (m, 7H, $7 \times \text{ArCH}$). IR (KBr, cm^{-1}) 2750–3500 (ν_{OH} , ν_{NH}). LR-MS: m/z 338 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 213 (42%).

5.2.6. 7-Chloro-4-(2'-aminoethyl)quinoline (3a)

A mixture of **5** (5 g, 0.025 mol) and ethylene diamine (13.485 g, 0.224 mol) was heated to reflux for 12 h. The crude product was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 + 4% NH_3). The solvents were removed in vacuo and the brown solid was washed with CHCl_3 to give 3.60 g of **3a** as a white solid (66% yield). Mp: 228.5–230.1 °C. ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 2.80–2.97 (m, 2H, CH_2NH_2), 3.25–3.47 (m, 2H, NHCH_2), 6.15–6.80 (m, 3H, NH, NH_2), 7.01–8.24 (m, 5H, $5 \times \text{ArCH}$).

5.2.7. 7-Chloro-4-(3'-aminopropyl)quinolone (3b)

A mixture of **5** (5.0 g, 0.025 mol) and 1,3-diaminopropane (15 mL, 0.176 mol) was heated to reflux for 12 h. The reaction mixture was concentrated and the crude product was washed with CHCl_3 . The residue was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 + 1% NH_3). Subsequent recrystallization from $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$ afforded 4.4 g of **3b** as a pale-yellow solid (74% yield). Mp: 104.5–105.5 °C. ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 1.50–1.82 (m, 2H, CH_2), 2.41–2.65 (m, 2H, CH_2NH_2), 3.03–3.30 (m, 2H, NHCH_2), 6.20–8.30 (m, 5H, $5 \times \text{ArCH}$).

5.2.8. 4-(4'-Aminobutylamino)-7-chloro-quinoline (3c)

A mixture of **5** (5 g, 0.025 mol) and 1,4-diaminobutane (11.02 g, 0.125 mol) was heated to reflux for 18 h at 160–180 °C. To the suspension was added chloroform and the mixture was concentrated in vacuo. Trituration of the resulting solid with DMF followed by filtration and washing with chloroform yielded a white solid. Recrystallization from $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$ gave 3.85 g of **3c** as white crystals (62% yield). Mp: 242.2–244.8 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 1.49–1.57 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.61–1.70 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 3.11–3.16 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 3.24–3.30 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 6.48 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 3-Ar-CH), 7.37 (t(br), 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.1$ Hz, NH), 7.77 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 8-Ar-CH), 7.97–8.05 (m, 2H, NH_2), 8.28 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.0$ Hz, 5-Ar-CH), 8.39 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 2-Ar-CH). ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 25.2 ($\gamma\text{-CH}_2$), 26.7 ($\beta\text{-CH}_2$), 36.8 ($\delta\text{-CH}_2$), 42.0 ($\alpha\text{-CH}_2$), 98.7 (3-Ar-CH), 117.4 (Ar-C), 124.1 (6-Ar-CH), 124.2 (5-Ar-CH), 127.3 (8-Ar-CH), 133.5 (Ar-C), 150.2 (Ar-C), 151.7 (2-Ar-CH), 161.0 (Ar-C).

5.2.9. 2-Methyl-3-benzyloxy-4-(4H)-pyranone (7)

To a solution of maltol (50 g, 0.397 mol) in methanol (450 mL) was added aq sodium hydroxide (8.7 M, 50 mL of) and benzylbromide (74.66 g, 0.437 mol). The reaction mixture was heated to reflux for 6 h. After removal of solvent in vacuo, the oily residue was taken up in DCM (190 mL), washed with aq sodium hydroxide (5%, 2×190 mL) and water (2×190 mL). The organic fraction was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated to yield as an orange oil which solidified upon cooling. Recrystallization from Et_2O gave 69.9 g of **7** as colorless needles (81% yield). Mp: 33–34 °C. ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 1.99 (s, 3H, CH_3), 5.00 (s, 2H, CH_2), 6.14–6.24 (m, 1H, ArCH), 7.20 (s, 5H, $5 \times \text{ArCH}$), 7.39–7.49 (m, 1H, ArCH).

5.2.10. 1-(4'-Aminobutyl)-2-methyl-3-benzyloxy-4-(1H)-pyridone (8)

To a solution of **7** (4.1 g, 0.046 mol) in aq ethanol (50%, 160 mL) was added 1,4-diaminobutane (10 g, 0.046 mol). The pH of the reaction mixture was adjusted to pH 13 with aq sodium hydroxide (10 N). The reaction was heated to reflux for 18 h. The solvents were removed in vacuo and the residue was taken up in CHCl_3 . The organic was washed with water, dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 + 0.5–2% NH_3) to afford 6.34 g of **8** as an orange oil (48% yield). ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 0.7–1.6 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.90 (s, 3H, CH_3), 2.13–2.34 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.68 (s, 2H, NH_2), 3.41–3.66 (m, 2H, NCH_2), 4.70 (s, 2H, CH_2Bn), 5.73–5.88 (m, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$), 7.02 (s, 5H, $5 \times \text{ArCH}$), 7.19–7.31 (m, 1H, CHCHN).

5.2.11. 3,4-Dihydroxy-2-methyl-1-[4-[(2-methyl-4-quinolyl)amino]4-oxo-butyl]pyridinium chloride (10)

To a solution of **7** (5 g, 0.023 mol) in ethanol (60 mL) was added a solution of GABA (2.75 g, 0.276 mol) in water (60 mL). Aq NaOH (10 N) was added to the reaction until pH 13 was attained. The reaction mixture was heated to reflux for 18 h. The solvent was reduced to 200 mL and the pH was adjusted 4 with aq HCl. The aqueous solution was extracted with DCM (3×50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to afford 4.9 g of **9** as a white solid. This material was used in the next step without further purification. A mixture of **9** (6 g, 0.020 mol), 4-aminoquinaldine (3.15 g, 0.020 mol) and DCC (3.55 g, 0.022 mol) in DMF (30 mL) was heated with stirring at 70 °C overnight. The solvent was removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1 + 0.5% NH_3) to afford an orange oil which solidified upon cooling. Recrystallization from $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$ gave 5.4 g of benzylated **10** as white crystals (61% yield). To remove the protecting group, this material was dissolved in ethanol and hydrogenated in the presence of 5% Pd/C to give **10** as a white solid. Mp: 275 °C. ^1H NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm) δ : 1.69–1.90 (m, 2H, CH_2), 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.48 (m, 2H, CH_2), 2.51 (s, 3H, CH_3), 3.45–3.75 (m, 2H, CH_2N), 4.80 (s, 2H, CH_2Bn), 5.90–6.01 (d, 1H, $\text{CHC}=\text{O}$), 6.88–7.80 (m, 5H, $5 \times \text{ArCH}$), 7.00 (s, 5H, $5 \times \text{ArCH}$), 8.16–8.20 (m, 1H, CH-N). IR (KBr, cm^{-1}): 2500–3500 (ν_{OH} , ν_{NH}), 1500 ($\nu_{\text{NH-C}=\text{O}}$). LR-MS: m/z 352 (100%), 227 (51%), 154 (40%).

5.3. Ligand pK_a values and stability constant of iron(III) complexes

Iron chloride (17.906 mM in 1% HCl, atomic absorption standard, Aldrich) was utilized in this study. Analytical grade reagent HCl (37%) and KOH (10 M) ampoules (Fisher), HPLC grade water and methanol (Fisher) were used in the preparation of all solutions. The automatic titration system used in this study comprises of an autoburette (Metrohm Dosimat 765, 1 mL syringe) and Mettler

Toledo MP230 pH meter with Metrohm AgCl electrode (6.0133.100) and a reference electrode (6.0733.100). 0.1 M KCl electrolyte solution was used to maintain the ionic strength. The temperature of the test solutions was maintained at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ by a Techne TE-8J temperature controller. The solution under investigation was stirred vigorously. A Gilson mini-plus3 pump with speed capability (20 mL/min) was used to circulate the test solution into a Hellm quartz flow cuvette.³⁹ For stability constant determinations, a 50 mm path length cuvette was used and for pK_a determinations a cuvette path length of 10 mm was used. Automatic titration and spectral scans adopted the following protocol: the pH value of the solution was increased or decreased by 0.1 pH unit by the addition of KOH or HCl from the autoburette over the pH range of 2–12. When pH readings varied by <0.001 pH unit over a 3 s period, the solution was allowed to reach equilibrium (for stability constant determinations a period of 5 min was adopted, for pK_a determinations a period of 1 min was adopted). The spectrum of the solution was then recorded. The cycle was then repeated automatically, until the defined end point pH value was achieved. Following electrode calibration, samples with an appropriate concentration to give measurable absorbance were titrated in pH range 2–12 for pK_a determination. For affinity studies, the iron:ligand ratio was kept at 5:1 ($[\text{iron}]_{\text{total}} 1 \text{ mM}$). Insoluble iron(III) complexes were measured in 1:1 methanol/water mixtures, the results were converted to those corresponding to aqueous conditions. The titration data were analyzed by pHab.^{39,40} Affinity is expressed as the pM value. pM is defined as the negative logarithm of the metal ion concentration under the following conditions: $[\text{Metal Ion}]_{\text{total}} = 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Ligand}]_{\text{total}} = 10^{-5} \text{ M}$ at pH 7.4.

5.4. Biological assays

The activity of test compounds against *P. falciparum* (strain ITG2G1) was determined as previously described.⁴¹ Other bioassays were carried out as follows:

5.4.1. Cytotoxicity assay

Human myeloid leukemia HL-60 cells were propagated in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine and 16.7% FBS. HL-60 cells were incubated at 37°C and 5% CO_2 and seeded in 24-well plates at an initial density of 10^5 cells/mL. Cell viability in the presence or absence of inhibitors was evaluated using Alamar Blue, as described for the *T. brucei* activity assay.

5.4.2. Anti-trypanosomal activity assay: *T. brucei*

Bloodstream form *T. brucei* TC211 was cultured in Baltz Medium supplemented with 16.7% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells were seeded in 24-well plates containing medium (1 mL) and various concentrations of test compounds dissolved in DMSO. Controls were performed in the presence of DMSO only. The final DMSO concentration was 0.5% and had no effect on cell growth. To maintain the cells in a logarithmic growth phase during the course of the experiment, *T. brucei* was seeded at an initial density of 10^4 cells/mL. After 24 h, Alamar Blue was added. After an incubation period of 48 h, the absorbance at 570 nm was read, using 630 nm as the reference wavelength. Melarsoprol was used as a positive control (GI_{50} 3.8 nM, $\text{CI}_{95\%}$ 3.46–4.14). Each assay was performed in duplicate or triplicate. GI_{50} values were calculated using the function 'log(inhibitor) versus normalized response—Variable slope' in GraphPad Prism 5.0a for Mac OS X.

5.4.3. Anti-trypanosomal activity assay: *T. cruzi*

Trypomastigotes of *T. cruzi* were maintained in LLC-MK2 cells (ATCC CCL 7). Trypomastigotes were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded at 1×10^6 cells per well in 96-well microplates. Compounds were incubated to the highest concentration

of 100 μM for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 -humidified incubator. Benznidazole was used as a positive control (GI_{50} 440.7 μM , $\text{CI}_{95\%}$ 406.2–478.4). The trypomastigote viability was based on the cellular conversion of the soluble tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) into the insoluble formazan by mitochondrial enzymes.^{34,35}

5.4.4. Anti-leishmanial activity assay

The anti-leishmanial activity of compounds was determined against *L. infantum* (MHOM/BR/1972/LD) promastigotes. Parasites were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin at 24°C . Compounds were incubated to the highest concentration of 100 μM for 48 h at 24°C and the viability of parasites was colorimetrically determined by the mitochondrial oxidation of MTT. Amphotericin B was used as a positive control (GI_{50} 0.17 μM , $\text{CI}_{95\%}$ 0.14–0.21). Compounds were also tested against intracellular amastigotes of *L. infantum*, using peritoneal macrophages as host cells. Compounds were incubated for 120 h at 37°C in a 5% CO_2 -humidified incubator, using meglumine antimonate (Glucantime) as a standard drug. The infection rate was determined by light microscopy by the number of infected macrophages out of 500 cells in duplicate.⁴²

Acknowledgement

We thank the Norwich Research Park for a studentship (to S.S.G.), and King's College London (King's Brazil Initiative) and FAPESP Sao Paulo (project 2011/50577–7) for a pump prime award (to G.K.W. and A.T.).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.009>.

References and notes

- Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.-A.; Bendig, M. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2005**, *4*, 727.
- World Health Organization, Malaria Fact Sheet No. 94, April 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.
- Barrett, M. P.; Vincent, I. M.; Burchmore, R. J.; Kazibwe, A. J.; Matovu, E. *Future Microbiol.* **2011**, *6*, 1037.
- Moncayo, Á.; Silveira, A. C. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 17.
- World Health Organization 'Control of the leishmaniasis': Meeting report of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010.
- Steverding, D.; Tyler, K. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 939.
- Croft, S. L.; Olliaro, P. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1478.
- Lescure, F.-X.; Le Loup, G.; Freilij, H.; Develoux, M.; Paris, L.; Brutus, L.; Pialoux, G. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 556.
- Coura, J. R.; de Abreu, L. L.; Pereira, J. B.; Willcox, H. P. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1985**, *80*, 73.
- Brand, S.; Cleghorn, L. A. T.; McElroy, S. P.; Robinson, D. A.; Smith, V. C.; Hallyburton, I.; Harrison, J. R.; Norcross, N. R.; Spinks, D.; Bayliss, T.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Torrie, L. S.; Frearson, J. A.; Brenk, R.; Fairlamb, A. H.; Ferguson, M. A. J.; Read, K. D.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 140.
- Stec, J.; Huang, Q.; Pieroni, M.; Kaiser, M.; Fomovska, A.; Mui, E.; Witola, W. H.; Bettis, S.; McLeod, R.; Brun, R.; Kozikowski, A. P. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3088.
- Martínez, A.; Carreon, T.; Iniguez, E.; Anzellotti, A.; Sánchez, A.; Tyan, M.; Sattler, A.; Herrera, L.; Maldonado, R. A.; Sánchez-Delgado, R. A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3867.
- Davis, R. A.; Buchanan, M. S.; Duffy, S.; Avery, V. M.; Charman, S. A.; Charman, W. N.; White, K. L.; Shackelford, D. M.; Edstein, M. D.; Andrews, K. T.; Camp, D.; Quinn, R. J. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5851.
- Hershko, C.; Peto, T. *J. Exp. Med.* **1988**, *168*, 375.
- Weinberg, E. D. *Rev. Med. Microbiol.* **1998**, *9*, 171.
- Taylor, M. C.; Kelly, J. M. *Parasitology* **2010**, *137*, 899.
- Atkinson, C. T.; Bayne, M. T.; Gordeuk, V. R.; Brittenham, G. M.; Aikawa, M. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *45*, 593.
- Breidbach, T.; Scory, S.; Krauth-Siegel, R. L.; Steverding, D. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 473.
- Merschjohann, K.; Steverding, D. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2006**, *5*, 3.
- Lytton, S. D.; Mester, B.; Libman, J.; Shanzer, A.; Cabantchik, Z. I. *Blood* **2000**, *84*, 910.

21. Hershko, C.; Gordeuk, V. R.; Thuma, P. E.; Theanacho, E. N.; Spira, D. T.; Hider, R. C.; Peto, T. E.; Brittenham, G. M. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *47*, 267.
22. Scott, M. D.; Ranz, A.; Kuypers, F. A.; Lubin, B. H.; Meshnick, S. R. *Br. J. Haematol.* **1990**, *75*, 598.
23. Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 547.
24. Thuma, P. E.; Olivieri, N. F.; Mabeza, G. F.; Biemba, G.; Parry, D.; Zulu, S.; Fassos, F. F.; McClelland, R. A.; Koren, G.; Brittenham, G. M.; Gordeuk, V. R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *58*, 358.
25. Hider, R. C.; Liu, Z. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 59.
26. Hershko, C.; Theanacho, E. N.; Spira, D. T.; Peter, H. H.; Dobbin, P.; Hider, R. C. *Blood* **1991**, *77*, 637.
27. Sashidhara, K. V.; Kumar, M.; Modukuri, R. K.; Srivastava, R. K.; Soni, A.; Srivastava, K.; Singh, S. V.; Saxena, J. K.; Gauniyal, H. M.; Puri, S. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2971.
28. Pérez, B.; Teixeira, C.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Gomes, P. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1537.
29. Pérez, B. C.; Teixeira, C.; Figueiras, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Gomes, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 887.
30. Guantai, E. M.; Ncokazi, K.; Egan, T. J.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Bhampidipati, R.; Kopinathan, A.; Smith, P. J.; Chibale, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3637.
31. Ruiz, F. A. R.; García-Sánchez, R. N.; Estupiñán, S. V.; Gómez-Barrio, A.; Amado, D. F. T.; Pérez-Solórzano, B. M.; Nogal-Ruiz, J. J.; Martínez-Fernández, A. R.; Kouznetsov, V. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4562.
32. Dobbin, P. S.; Hider, R. C.; Hall, A. D.; Taylor, P. D.; Sarpong, P.; Porter, J. B.; Xiao, G.; van der Helm, D. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2448.
33. Mikus, J.; Steverding, D. *Parasitol. Int.* **2000**, *48*, 265.
34. Grecco, S. S.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Sartorelli, P.; Romoff, P.; Ferreira, M. J. P.; Fávero, O. A.; Lago, J. H. G. *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 1245.
35. Reimão, J. Q.; Scotti, M. T.; Tempone, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8044.
36. Soteriadou, K. K.; Papavassiliou, P. P.; Voyiatzaki, C. C.; Boelaert, J. J. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *35*, 23.
37. Mellor, H. R.; Platt, F. M.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 307.
38. Fast, B.; Kremp, K.; Boshart, M.; Steverding, D. *Biochem. J.* **1999**, *342*, 691.
39. Kong, X.; Zhou, T.; Neubert, H.; Liu, Z.; Hider, R. C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3028.
40. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Ann. Chim.* **1999**, *89*, 45.
41. Silfen, J.; Yanai, P.; Cabantchik, Z. I. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 4269.
42. Tempone, A. G.; Taniwaki, N. N.; Reimão, J. Q. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 499.