UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Mariane Pereira Brito

**Análise *in vitro* do efeito da associação da pentamidina com verapamil,
anfotericina B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Medicina Tropical
e Saúde Interacional.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim

São Paulo

2019

Mariane Pereira Brito

Análise *in vitro* do efeito da associação da pentamidina com verapamil, anfotericina
B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicina Tropical e Saúde
Interacional.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Brito, Mariane Pereira

Análise *in vitro* do efeito da associação da pentamidina com verapamil, anfotericina B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Mariane Pereira Brito. - São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Paulo Cesar Cotrim

Descritores: 1. LEISHMANIOSE. 2. TERAPIA COMBINADA. 3. FÁRMACOS - RESISTÊNCIA. 4. FÁRMACOS - INTERAÇÃO.

USP/IMTSP/BIB-02/2019.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e estar ao meu lado e em meu coração em todos os momentos.

A minha mãe Marlene Pereira que é o maior exemplo de mulher e pessoa, e que em toda sua simplicidade me criou e ajudou a me transformar em quem sou hoje.

Ao professor Dr. Paulo Cotrim por sua orientação, por toda confiança, paciência e por me proporcionar a oportunidade de ingressar na vida acadêmica.

A Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro por toda amizade, carinho, broncas e pelos ensinamentos diários sobre pesquisa e sobre a vida.

Ao meu co-orientador Dr. Prof. Adriano Cappellazzo Coelho pelos ensinamentos e colaboração.

Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e ao departamento de Soroepidemiologia e Imunobiologia por disponibilizarem um local para a realização desse estudo.

A CAPES por conceder a bolsa de mestrado e ao LIM-48 e LIM-38 por fornecerem subsídios para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Professor Antônio Sesso, a Dra. Professora Mirian Nakagami Soto e Dra. Professora Marta Heloísa Lopes por me darem a oportunidade de estagiar em diferentes áreas e por toda contribuição e ensinamentos.

Aos meus amigos Naiura Vieira, Mahyumi Fujimori, Christiane Ozaki, Fernanda Narangeira, Flávia Carvalho, Berna e Wilson Rodrigues por todos os bons momentos que vivemos nestes anos de convivência e por toda amizade.

À Mussya Cisoto Rocha por auxiliar no desenvolvimento deste projeto e pela amizade.

Ao meu pai Adalírio Brito da Silva que me fez sonhar, acreditar na minha capacidade e que me ensinou a batalhar pelos meus sonhos.

Às minhas irmãs Glaucia Pereira Brito e Rafaela Pereira de Brito por estarem comigo nos bons e maus momentos.

Aos meus sobrinhos Alex e Lelê pelo simples fato de existirem e por alegrarem minha vida.

A minha cachorrinha Isis pelo amor incondicional.

E por último agradeço ao Thiago Palhares, melhor amigo e namorado, por trilhar essa jornada comigo e me apoiar em todas as decisões.

Agradeço a todos, pelos conselhos e incentivo, por não me deixarem desistir nos momentos em que me senti incapaz e por me fazerem querer seguir sempre em frente em busca da realização deste sonho.

Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.

Hermann Hesse

RESUMO

Brito MP. Análise *in vitro* do efeito da associação da pentamidina com verapamil, anfotericina B e miltefosina contra linhagens suscetíveis e resistentes de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

A leishmaniose é uma protozoonose que apresenta diferentes manifestações clínicas, associadas a fatores relacionados ao parasita, a resposta imune do hospedeiro e epidemiologia da doença. Esses fatores podem influenciar no desfecho da doença e na efetividade da terapia antileishmania que até hoje se baseia no uso de fármacos de alto custo, alta toxicidade e que podem causar diversos efeitos colaterais. A pentamidina é um fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose utilizada em casos específicos de Leishmaniose Tegumentar nas regiões da América do Sul. Por causa dessas limitações, novos fármacos ou novos regimes terapêuticos vêm se mostrando cada vez mais necessários no tratamento contra as leishmanioses devido ao surgimento de falhas terapêutica e resistência aos fármacos existentes. Linhagens de *L. amazonensis* resistentes a PMD superexpressoras ou não do gene PRP1 tiveram o fenótipo de resistência revertido após a associação de pentamidina com verapamil. Deste modo, propomos verificar o efeito da associação de pentamidina com verapamil, anfotericina B e miltefosina contra parasitos de *L. (L.) amazonensis* suscetíveis (La M2269) e resistentes à pentamidina (La PRP1 e La PEN 0,5). O efeito das interações entre a pentamidina e os demais fármacos foi avaliado pelo método modificado de isoblograma e a natureza da interação foi classificada através da análise dos valores de Concentração Inibitória Fracionada (CIF). As associações de pentamidina com o verapamil, anfotericina B e miltefosina contra promastigotas de La M2269 foram classificadas como indiferente a partir da análise dos valores de CIF. Interações indiferentes também foram observadas contra promastigotas de La PRP1 e La PEN 0,5 quando tratadas com as mesmas associações. Macrófagos foram infectados com parasitos de La M2269 e tratados com diferentes concentrações de PMD. Nossos resultados sugerem que altas concentrações de PMD (17,5µM) foram tóxicas contra macrófagos e apresentaram baixa atividade quando utilizada contra amastigotas de La M2269 em até 72 horas de incubação. Observamos que ao prorrogar a incubação para 120 horas, concentrações inferiores a 1µM de PMD reduziram a taxa de infecção para aproximadamente 30%. Já ao analisarmos o efeito das combinações de pentamidina com o verapamil observamos baixas atividades desses fármacos quando combinado, indicando possivelmente uma interação indiferente/ antagônica. A associação de pentamidina com anfotericina B contra amastigotas de La M2269 foi avaliada pelo método de isoblograma e a natureza da interação foi classificada como indiferente por apresentar um valor de CIF = 0,65.

Descritores: Leishmaniose. Terapia combinada. Fármacos - Resistência. Fármacos Interação.

ABSTRACT

Brito MP. *In vitro* analysis of the effect of the combination of pentamidine with verapamil, amphotericin B and miltefosine against susceptible and resistant strains of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. São Paulo: Institute of Tropical Medicine of the University of São Paulo; 2019.

Leishmaniasis is a protozoan disease that presents different clinical manifestations, associated to factors related to the parasite, the host immune response and the epidemiology of the disease. These factors may influence the outcome of the disease and the effectiveness of antileishmania therapy, which is still based on the use of high-cost, high toxicity drugs that can cause several side effects. Pentamidine is a second-choice drug in the treatment of leishmaniasis used in specific cases of cutaneous leishmaniasis in the South American regions. Because of these limitations, new drugs or new therapeutic regimens are proving increasingly necessary in the treatment of leishmaniasis due to the emergence of therapeutic failures and resistance to existing drugs. *L. (L.) amazonensis* strains resistant to PMD overexpressors or not of the PRP1 gene had the resistance phenotype reverted after the association of pentamidine with verapamil. Thus, we propose to verify the effect of the association of pentamidine with verapamil, amphotericin B and miltefosine against parasites of *L. (L.) amazonensis* susceptible (La M2269) and resistant to pentamidine (La PRP1 and La PEN 0,5). The effect of the interactions between pentamidine and other drugs was evaluated by the modified isobologram method and the nature of the interaction was classified through the analysis of the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) values. The associations of pentamidine with verapamil, amphotericin B and miltefosine against La M2269 promastigotes were classified as indifferent from the analysis of FIC values. Indifferent interactions were also observed against La PRP1 and La PEN 0.5 promastigotes when treated with the same associations. Macrophages were infected with parasites of La M2269 and treated with different concentrations of PMD. Our results suggest that high concentrations of PMD (17.5 μ M) were toxic against macrophages and showed low activity when used against La M2269 amastigotes within 72 hours of incubation. We observed that by extending the incubation to 120 hours, concentrations below 1 μ M PMD reduced the infection rate to approximately 30%. When analyzing the effect of the combinations of the pentamidine and the verapamil we observed low activities of these drugs when combined, possibly indicating an indifferent / antagonistic interaction. The association of pentamidine with amphotericin B against amastigotes of La M2269 was evaluated by the isobologram method and the nature of the interaction was classified as indifferent because it presented a FIC = 0.65.

Descriptors: Leishmaniasis. Combined Therapy. Drugs Resistance. Drugs Interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Fêmea infectada inocula formas promastigotas de *Leishmania* spp. na pele do mamífero vertebrado. Células do sistema fagocitário mononuclear fagocitam ou são infectados pelas promastigotas que se diferenciam em amastigotas e se proliferam no interior do vacúolo parasitóforo, até a ruptura da membrana e liberação das amastigotas.....22
- Figura 2-** Morfologia de parasitos de *Leishmania* A- forma amastigota; B) forma promastigota. N - núcleo, K – cinetoplasto, M – mitocôndria, R – retículo endoplasmático, mt - microtubulos; G- aparelho de golgi, F - flagelo, L- lisossoma, Fonte: Rey, ²¹23
- Figura 3-** A - Preparo das combinações entre fármaco A (cinza escuro) e fármaco B (cinza claro); B) Placa de 96 poços após incubação com MTT.....42
- Figura 4-** Representação gráfica de um isoblograma no qual a linha verde representa aditividade; a linha curva em azul representa sinergismo e a linha curva em vermelho representa antagonismo.....44
- Figura 5-** Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a pentamidina. Cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de SFB por 192 horas em estufa B.O.D. a 26° C. As curvas representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.....51
- Figura 6-** Curva de dose-resposta de valores de CE₅₀ de PMD contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. La M2269- cepa de referência de *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L.(L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L.(L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*. Resultado da média e desvio padrão de um experimento representativo de três experimentos realizados em triplicata.....54

Figura 7- Isoblograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* (La M2269). Onde os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, respectivamente.....57

Figura 8- Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* (La M2269)..... 57

Figura 9- Isoblograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectadas (La PRP1). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, respectivamente.....59

Figura 10- Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectada (La PRP1).....59

Figura 11- Isoblograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutante (La PEN 0,5). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4,e 0:5, respectivamente.....61

Figura 12- Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutante (La PEN 0,5).....61

Figura 13- Macrófagos derivados de medula óssea infectados com parasitas das formas amastigotas (setas pretas) de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a pentamidina recuperadas de lesão em pata de camundongos BALB/c La M2269- cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L. (L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L. (L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*.. Infectadas com 10: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 horas a 33°C com 5% de CO₂. Observados em microscópio ZEISS AXIOPHOT com sistema de captação de imagem AxioVision 4.6. Aumento de 1000x.....64

Figura 14- Porcentagem de MDMO infectados por parasitas nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* La M2269- cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L. (L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR - *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L. (L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*.. Infectadas com 5, 10 e 20: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 e 48 horas a 33°C com 5% de CO₂. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....65

Figura 15- Número de amastigotas por 100 MDMO infectados por parasitas nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* La M2269- cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L. (L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L. (L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*.. Infectadas com 5, 10 e 20: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 e 48 horas a 33°C com 5% de CO₂. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....66

Figura 16- MDMO infectados por promastigotas dos parasitas da espécie *L. (L.) amazonensis* cepa La M2269 na proporção 20:1 parasitos/macrófago, incubados em estufa com 5% de CO₂ a 33°C por 24 horas. Controle não tratado; 5µM 7,5µM; 10µM; 15µM de PMD e (G) 17,5µM de PMD. Observados em microscópio luminoso ZEISS AXIOPHOT com sistema de captação de imagem AxioVision 4.6 (aumento de 1000x). Insert: Redução do número de macrófagos por lâmina (aumento de 200x).....68

Figura 17- Porcentagem de MDMO infectados por 20:1 parasitos/macrófago da linhagem La M2269, incubados por 24, 48 e 72 horas a 33°C com 5% de CO₂ e tratados com concentrações crescentes de PMD. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....69

Figura 18- Número de amastigotas por 100/ MDMO infectados com 20:1 parasitos/macrófago da linhagem La M2269 incubados por 24, 48 e 72 horas a 33°C com 5% de CO₂ e tratados com concentrações crescentes de PMD. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....70

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos derivados de medula óssea: A - não tratados e não infectados; B - não infectados e tratados com 7,5µM de pentamidina; C – infectados e não tratados. MDMO infectados com parasitos de La M2269 na proporção 10:1 incubados por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Tamanhos: A-15k; B - 20k; C - 20k. Seta preta tracejada - membrana integra do macrófago, seta branca tracejada - alterações na membrana do macrófago; N - núcleo do macrófago; Seta preta - amastigota; C - cinetoplasto; n - núcleo da amastigota(continuação);.....72

Figura 19- (continuação) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos derivados de medula óssea: D e E - infectados e tratados com 7,5µM de pentamidina; G - infectados e tratados com 15µM de pentamidina. MDMO infectados com parasitos de La M2269 na proporção 10:1 incubados por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Tamanhos: D - 15k; E - 10k e F - 5k. Seta branca tracejada - alterações na membrana do macrófago; seta branca - ruptura de membrana do macrófago; N - núcleo do macrófago; Seta preta - amastigota; C - cinetoplasto; n - núcleo da amastigota; asterisco - amastigota afetada73

Figura 20- Porcentagem de MDMO infectados por 10:1 parasitos/macrófagos das linhagens La M2269, incubados por 120 horas a 33°C com 5% de CO₂ e tratados com concentrações crescentes de PMD e VERA individualmente e PMD e VERA combinados. Resultados da média e desvio padrão de dois experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.....75

Figura 21- Isobolograma obtido a partir dos valores de CIF da combinação entre Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y) no tratamento de amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* (La M2269). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4,e 0:5, respectivamente.....77

Figura 22- Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de pentamidina com anfotericina B no tratamento de amastigotas intracelulares de *L.(L.)amazonensis* (La M2269).....77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Valores de CE_{50} e de intervalo de confiança de 95% (IC95%) obtidos após 72 horas de incubação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com PMD.....53
- Tabela 2-** Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* selvagem (La M2269).....56
- Tabela 3-** Valores de CE_{50} e CIFs da pentamidina combinada com verapamil, anfotericina B ou miltefosina no tratamento de formas promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectada (La PRP1).....58
- Tabela 4-** Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutantes (La PEN 0,5).....60
- Tabela 5-** Valores de média da soma dos CIFs da pentamidina combinada com verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de diferentes linhagens de *L. (L.)amazonensis*.....62
- Tabela 6-** Concentração citotóxica 50% (CC_{50}) e IC 95% em MDMO tratados com pentamidina (PMD) e verapamil (VERA)63
- Tabela 7 -** Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e anfotericina B no tratamento de amastigotas intracelulares de *L.(L.)amazonensis* selvagem (La M2269).....76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Transmissão e Vetor.....	21
1.2 Morfologia do parasito.....	22
1.3 Tratamento das leishmanioses	24
1.3.1 Antimonial pentavalente.....	25
1.3.2 Anfotericina B	26
1.3.3 Miltefosina	26
1.3.4 Pentamidina.....	27
1.4 Reposicionamento de fármacos e terapia combinada	30
1.4.1 Bloqueadores de canais de cálcio	30
1.4.2 Terapia combinada e sua aplicação no tratamento das Leishmanioses.....	31
1.4.2.1 Isoblograma e classificação da natureza da interação	33
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivos Específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Cultivo de parasitos para determinação do perfil de crescimento.....	38
4.2 Manutenção da infectividade de parasitos de <i>L. (L.) amazonensis</i> em camundongos BALB/c.....	39
4.3 Fármacos.....	39
4.4 Determinação da atividade da PMD em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensíveis e resistentes à PMD	40
4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT	41

4.6 Determinação da interação entre fármacos em promastigotas pelo método modificado de Isoblograma.	42
4.6.1 Construção de Isoblograma a partir da Concentração Inibitória Fracionada	43
4.7 Obtenção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea (MDMO) de camundongo BALB/c.....	44
4.8 Determinação da citotoxicidade da PMD e do VERA em macrófagos	45
4.9 Infecção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensíveis e resistentes à PMD	46
4.10 Avaliação da atividade da PMD contra amastigotas intracelulares de La M2269.....	47
4.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de MDMO infectados com amastigotas de La M2269 e tratados com 7 e 15 μ M de PMD	48
4.12 Análise da interação entre a pentamidina combinada com verapamil e pentamidina combinada com anfotericina B em amastigotas intracelulares de La M2269.....	49
4.13 Análises estatísticas	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Determinação do perfil de crescimento dos parasitas	51
5.2 Verificação da infectividade de parasitos de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensíveis e resistentes a PMD em camundongos BALB/c.....	52
5.3 Determinação do CE ₅₀ de pentamidina em formas promastigotas das linhagens de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensíveis e resistentes a PMD.	53
5.4 Análise da Interação entre diferentes fármacos contra promastigotas	54
5.5 Determinação do valor de CC ₅₀ dos fármacos em Macrófagos derivados de medula óssea	62
5.6 Infecção de MDMO por diferentes linhagens de <i>L. (L.) amazonensis</i>	63

5.7 Atividade da pentamidina contra amastigotas intracelulares de La M2269.....	67
5.7.1 Avaliação das alterações morfológicas provocadas pela pentamidina em macrófagos infectados amastigotas	70
5.8 Análise da interação entre a pentamidina combinada com verapamil e pentamidina combinada com anfotericina B em amastigotas intracelulares de La M2269.....	74
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
9 ANEXO	98
Carta de Aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais	98

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas prevalentes em regiões tropicais e subtropicais. São causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*¹. O aumento em sua incidência mundial está associado a fatores socioeconômicos e socioambientais como, por exemplo: falta de saneamento básico e higiene, pobreza extrema, subnutrição, desmatamento florestal, urbanização, ausência de medidas de controle efetivas²⁻⁴. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 97 países foram considerados endêmicos para leishmanioses em 2017⁵. Desta forma, estima-se mais de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo estão em risco de contrair a doença^{6,7}.

Algumas espécies de leishmania apresentam primariamente um caráter zoonótico, acometendo marsupiais, roedores, edentados e canídeos selvagens em zonas rurais, adquirindo um caráter antroponótico à medida que animais domésticos (cães e gatos) se tornam reservatório em regiões urbanas e um caráter antroponótico (restrito a espécie *Leishmania donovani*) quando o homem se torna reservatório no ciclo de transmissão do parasito^{6,8}.

As principais formas clínicas das leishmanioses são a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT) e são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem, tanto do subgênero *Viannia* quanto do subgênero *Leishmania*^{9,10}.

A LV, também conhecida como calazar, é causada por parasitas das espécies *L. (L.) donovani* na Ásia e África e *L. (L.) infantum* no Mediterrâneo e nas Américas Central e do Sul¹¹. É caracterizada pelo tropismo por órgãos como baço,

fígado, rins e medula óssea, causando perda de peso, anemia, febre e hepatoesplenomegalia. É a forma mais grave das leishmanioses levando a óbito na maioria dos casos (cerca de 90%) quando não tratada ^{11, 12}. De acordo com a OMS, o Brasil esteve entre os sete países que reportaram cerca de 90% (aproximadamente 21.000 dos 22.145) dos novos casos de LV no ano de 2017, os demais países foram: Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão ².

A Leishmaniose Tegumentar é um conjunto de manifestações dermatológicas que podem se apresentar como Leishmaniose Cutânea (LC) quando macrófagos residentes da derme são parasitadas ou como Leishmaniose Mucocutânea (LM) quando ocorre a infecção de células fagocíticas do tecido mucoso ¹³. Os principais agentes causadores de LT no Brasil são das espécies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) amazonensis* ^{14, 15}.

Essa diversidade de espécies está relacionada com diferentes regiões geográficas, que associado ao fluxo transitório de pessoas entre áreas endêmicas e não endêmicas no Brasil propicia um aumento não só do número de casos como também da complexidade e variabilidade dos quadros clínicos ^{15, 16}.

Em humanos a LC pode se manifestar em diferentes formas clínicas. A forma mais branda é a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), caracterizada pelo surgimento de uma ou múltiplas lesões (1 a 10) ulceradas ou não na região da picada do flebotomíneo, geralmente são arredondadas ou com formato oval com borda elevada com alta parasitemia ^{13, 14}. Pode apresentar cura espontânea em alguns casos, diante de uma resposta imune eficaz do hospedeiro, no entanto, muitas vezes o uso de uma medida terapêutica adequada é imprescindível para que ocorra cura definitiva das lesões ^{13, 15}.

A Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) é caracterizada pelo surgimento disseminado de pequenas lesões ulceradas sem forma ou tamanho

específico espalhado por várias regiões do corpo ¹⁴. Apresenta uma resposta imune exagerada, poucos parasitas e em alguns casos pode estar associada a lesões mucosas ¹⁵.

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é uma forma rara de LT caracterizada pela ausência de resposta imunológica específica a antígenos de *Leishmania* (forma anérgica) que favorece a multiplicação e permanência parasitária. Evolui lentamente a partir de uma lesão localizada para a formação de múltiplas lesões nodulares ou papulares não ulceradas ¹⁴⁻¹⁷. Das espécies dermatrópicas citadas anteriormente, a única com capacidade imunopatogênica de provocar a LCD é a *L. (L.) amazonensis* ¹⁷.

A Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC) está caracterizada pelo surgimento de lesões vesiculares ou papulares após a cura clínica das lesões ou em regiões próximas as cicatrizes ¹⁵.

A Leishmaniose Mucosa (LM) pode ocorrer concomitantemente à forma cutânea conhecida como Leishmaniose mucocutânea (LMC), é caracterizada pela degeneração ou ulceração de tecidos cartilagosos ou moles das regiões mucosa, afetando inicialmente regiões nasais (nariz, septo nasal) podendo progredir também para região oral (lábios, palato, língua, faringe ou laringe) ^{14, 15}.

De acordo com a OMS ¹⁸, no ano de 2015, 87 países foram considerados endêmicos para LC, 21 deles localizados nas regiões das Américas. Dados mais recentes da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS/OMS), mostraram que 18 países endêmicos para LC e LM estão situados na América do Sul. Destes, 17 foram responsáveis por reportarem 48.915 casos no ano de 2016 ¹⁹. Esses dados indicam um aumento de cerca de 6% em relação ao número de casos reportados no ano anterior (46.082). O mesmo ocorreu em relação ao número de casos reportados no Brasil entre os anos de 2016 e 2017, sugerindo que houve um aumento de cerca de 30% (12.690 – 17.809 casos reportados nos anos de 2016 e 2017,

respectivamente) ²⁰. Esses dados colocaram o Brasil como terceiro país com maior número de casos de LTA reportados em 2017, com 12,5% do total de 142.375 casos reportados por 41 países ²⁰.

1.1 Transmissão e Vetor

A transmissão do parasito (**Figura 1**) ocorre quando o inseto vetor fêmea de flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* (novo mundo) ou gênero *Phlebotomus* (velho mundo) ao picar um mamífero infectado ingere as formas amastigotas que em seu trato digestivo, diferenciam-se em promastigotas as quais são inoculadas em outro hospedeiro durante o repasto sanguíneo do inseto. Uma vez inoculadas, as formas infectantes serão fagocitadas por macrófagos onde dentro de vacúolos parasitóforos se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Esta proliferação provoca a lise da membrana celular e a liberação de amastigotas que podem infectar ou serem fagocitadas por novos macrófagos e/ou eventualmente serem ingeridas por novos flebotomíneos, dando continuidade ao ciclo biológico do parasita ¹.

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Fêmea infectada inocula formas promastigotas de *Leishmania* spp. na pele do mamífero vertebrado. Células do sistema fagocitário mononuclear fagocitam ou são infectados pelas promastigotas que se diferenciam em amastigotas e se proliferam no interior do vacúolo parasitóforo, até a ruptura da membrana e liberação das amastigotas.

1.2 Morfologia do parasito

Os parasitos causadores das leishmanioses apresentam ciclo de vida bifásico, divididos em dois estágios (**Figura 2**): as formas promastigotas flageladas, encontradas no trato digestivo do vetor invertebrado e as formas amastigotas, intracelulares obrigatórias, que se diferenciam e se multiplicam nas células do sistema fagocitário mononuclear de hospedeiros mamíferos vertebrados ¹.

As promastigotas se desenvolvem em diferentes regiões do intestino do inseto vetor flebotomíneo. O local de desenvolvimento das promastigotas possibilita

a distinção entre os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Aqueles parasitos que apresentam desenvolvimento obrigatório no intestino posterior migrando para o intestino médio e intestino anterior do hospedeiro pertence ao subgênero *Viannia*. Quando o desenvolvimento ocorre somente entre o intestino médio e o anterior, os parasitos são classificados como subgênero *Leishmania* ⁹.

Figura 2 - Morfologia de parasitos de *Leishmania* A- forma amastigota; B) forma promastigota. N - núcleo, K - cinetoplasto, M - mitocôndria, R - retículo endoplasmático, mt -microtúbulos; G- aparelho de golgi, F - flagelo, L - lisossoma, Fonte: Rey, ²¹.

As promastigotas são formas alongadas que variam de 15 - 30µm, possuem um núcleo situado na região central e um cinetoplasto localizado próximo à região anterior da qual surge um longo flagelo que possibilita a movimentação do parasito. As amastigotas são encontradas em vacúolos parasitóforos ou livres no citoplasma celular, são pequenas formas arredondadas ou ovais e medem de 2-6 µm de diâmetro, tem um núcleo, um cinetoplasto e um flagelo internalizado ^{1, 21}.

O cinetoplasto é a única mitocôndria existente em Tripanosomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida, tem formato baciliforme e está posicionado junto à base do bolso flagelar ²¹⁻²³. O posicionamento do cinetoplasto em relação ao núcleo possibilita a diferenciação do parasito entre os diferentes estágios de vida ²⁵. O cinetoplasto é responsável por funções vitais para sobrevivência do parasito, como a respiração celular. Essa organela possui DNA próprio conhecido como kDNA ^{21, 24}. O kDNA representa cerca de 30% de todo o DNA celular e vem sendo estudado como potencial alvo de estudos de terapia antileishmaniasis ^{23, 24}.

1.3 Tratamento das leishmanioses

Diversas causas influenciam o prognóstico das leishmanioses, tais como: epidemiologia, virulência da espécie infectante; fatores genéticos presentes no parasito e/ou no hospedeiro; suscetibilidade/resposta imune do hospedeiro; co-infecção; tratamento inadequado; podendo provocar as diferentes manifestações clínicas da LT e exigirem diferentes abordagens terapêuticas ^{4, 15, 25, 26}.

Os fármacos que compõem o arsenal terapêutico contra as leishmanioses são: o antimonial pentavalente (Sb^{5+}), anfotericina B (ANFO B), pentamidina (PMD)

e miltefosina (MILTE) ^{8, 27}. A via de administração (via parenteral exceto a miltefosina), o período de tratamento, bem como os efeitos colaterais e o desenvolvimento de parasitos resistentes a esses fármacos fazem com que novas alternativas terapêuticas se tornem necessárias para o tratamento das leishmanioses.

1.3.1 Antimonial pentavalente

O antimônio na forma pentavalente é o fármaco de primeira escolha no Brasil para o tratamento das leishmanioses, originária da forma trivalente (tártaro emético) descrita no início do século passado por Gaspar Vianna ²⁸. Esse fármaco é comercializado nas formas de estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), sendo a segunda, a forma disponibilizada no Brasil. Seu efeito leishmanicida está relacionado à inibição de processos metabólicos essenciais, interferindo assim, no metabolismo da glicose e na oxidação de ácidos graxos ocasionando a morte do parasito ²⁹⁻³¹. Devido ao seu acúmulo em diferentes tecidos, pode gerar efeitos colaterais que variam de náuseas e artralgias, a alterações cardíacas ou renais ⁸. Esses efeitos colaterais associados às dificuldades relacionadas às formas de administração (via endovenosa ou intramuscular por mais de 10 dias) ocasionam uma baixa adesão ao tratamento favorecendo o surgimento de recidivas e resistência ao Sb⁺⁵ ^{15, 32, 33}.

1.3.2 Anfotericina B

No Brasil a ANFO B nas formas de desoxicolato e lipossomal são utilizados como fármacos de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses, no entanto a forma lipossomal ainda tem seu uso recomendado apenas para o tratamento de LV, não havendo registros na Agência Nacional de Vigilância de Sanitária (ANVISA) devido à ausência de dados que comprovem sua eficácia no tratamento de LT ^{29, 34}. A ANFO B é um antibiótico poliênico com grande afinidade pelo ergosterol presente na membrana de fungos e parasitos, produzindo poros que alteram a permeabilidade da membrana afetando sua viabilidade e provocando a morte desses organismos ³⁵.

1.3.3 Miltefosina

A MILTE é um alquilfosfolípideo que foi empregado inicialmente como fármaco antitumoral sendo posteriormente demonstrada atividade leishmanicida ^{28, 36}. Dentre os fármacos recomendados para o tratamento das leishmanioses a MILTE é o único fármaco administrado por via oral, sendo esse um dos fatores mais interessantes para sua aplicação clínica. Porém, devido ao surgimento de diversos efeitos colaterais e ao potencial teratogênico, seu uso é contraindicado no tratamento de pacientes grávidas ou lactantes ³⁶.

1.3.4 Pentamidina

A PMD é uma diamina aromática que já foi utilizada por mais de 40 anos como fármacos de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses ¹⁵. Porém, devido principalmente aos efeitos adversos como o surgimento diabetes, dor, enduração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia e perda de eficiência para o tratamento da LV na Índia, seu uso atualmente é recomendado apenas para o tratamento de casos específicos de LC e LMC nas Américas ^{26, 36-39}.

Alguns estudos foram realizados com pacientes brasileiros, comparando a eficácia do tratamento com PMD em diferentes doses e períodos e também em relação ao tratamento com Sb⁵⁺ no tratamento de LT. De acordo com Pimentel *et al.* ⁴⁰ 4 mg/Kg de PMD em dias alternados durante 23 dias apresentou um resultado satisfatório no tratamento de LC em um paciente infectado por *L. (V.) braziliensis*, que esteve no Equador entre os anos de 2005 e 2006. Esta foi uma alternativa eficaz, pois após sucessivos tratamentos realizados com Sb⁵⁺ e ANFO B, o paciente mostrou-se refratário ao Sb⁵⁺ e intolerante à ANFO B em baixa concentração e/ou na forma lipossomal apresentando diversos efeitos colaterais.

Neves *et al.* ³³, também constataram após a realização de um estudo clínico com 185 pacientes do estado de Manaus infectados por *L. (V.) guyanensis* que a PMD e o Sb⁵⁺ apresentaram eficácia similar. Entretanto por ser um tratamento de curto período, sem a necessidade de internação ou aplicações diárias e por causar efeitos adversos menos agressivos, o uso da PMD em baixas concentrações mostra-se um tratamento mais vantajoso.

Segundo Gadelha ⁴¹ uma única dose (7mg/kg/dia) de PMD por via intramuscular não causou efeitos adversos significantes em nenhum dos 20 pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* e apresentou eficácia semelhante ao tratamento preconizado pelo Ministério da saúde de 4mg/kg/dia em 3 doses com intervalos de 2 dias ⁴².

Nesses casos, todavia, os resultados obtidos são relativamente surpreendentes. Segundo Tuon *et al.* ⁴³, o tratamento da LC com apenas duas doses de 4mg/kg de PMD pode apresentar eficiência comparável à obtida com o Sb⁵⁺, principalmente quando o agente causador é a *L. (V.) guyanensis*. Resultados similares também foram encontrados na Colômbia, Guiana Francesa e Suriname, onde a administração de PMD em baixas doses e por curtos períodos de tempo apresentou eficácia semelhante, e também causou menos efeitos colaterais (por exemplo, aquele associado ao metabolismo de glicose), quando comparados aos efeitos causados pelo Sb⁵⁺ ^{36, 43, 44}.

1.3.4.1 Mecanismo de ação e resistência a PMD

O mecanismo de ação da PMD ainda é pouco conhecido. Dados da literatura demonstraram que este fármaco se liga ao DNA, principalmente a adeninas e timinas do cinetoplasto conduzindo a desintegração do mesmo ^{45, 46}. Croft e Brazil ⁴⁵ demonstraram que a PMD interferiu no ciclo biológico de parasitas de *Leishmania amazonensis*, retardando o processo de diferenciação de amastigota em promastigotas. Além de causar modificações na ultraestrutura mitocondrial, pode

provocar um colapso no potencial de membrana, além de inibir a biossíntese de poliaminas^{30, 39, 45-47}.

Foi demonstrado que parasitos resistentes apresentam um menor acúmulo mitocondrial da droga quando comparados com parasitos suscetíveis à PMD, assim como também um aumento do efluxo de PMD para fora da célula³⁰. Posteriormente, foi demonstrado pelo nosso grupo que essa atividade de efluxo poderia ser mediada por um transportador ABC PRP1^{48, 49}. Diversos mecanismos de defesa que favorecem o desenvolvimento de resistência a diferentes fármacos com efeito antiparasitário já foram identificados em protozoários, como visto em parasitos do gênero *Leishmania*. Podemos citar, por exemplo: redução de influxo, aumento do efluxo, mecanismos de competição pelo substrato, inativação do composto, alteração do alvo ou aumento do reparo de danos causados pelo fármaco^{31, 50-53}.

Uma importante estratégia que pode ser utilizada para compreender os mecanismos de ação de fármacos contra os parasitos, se dá pela geração de parasitos resistentes por pressão seletiva *in vitro*⁵⁰⁻⁵³. Utilizando uma metodologia de seleção e super expressão gênica em *Leishmania* previamente descrita pelo nosso grupo, foi identificado o gene *PRP1* (Pentamidine Resistance Protein 1) que pertence a superfamília de transportadores ABC (ATP Binding Cassette) e que confere resistência à pentamidina em parasitos selvagens de *Leishmania (L.) major* após transfecção e superexpressão gênica^{48, 49}. Além da caracterização do gene PRP1, mutantes resistentes à pentamidina foram selecionados e caracterizados a partir de passagens sucessivas das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em presença de concentrações crescentes de pentamidina⁵⁴. Nestes estudos, foi observado ainda que concentrações não tóxicas de verapamil, quando associadas à pentamidina revertiam à resistência à PMD das formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* spp. que super expressavam o gene PRP1 tornando-os mais suscetíveis a este fármaco⁵⁵.

1.4 Reposicionamento de fármacos e terapia combinada

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento realizado em várias etapas ⁵⁶. Se compararmos a utilização de um fármaco existente à criação de um fármaco novo, veremos que os fatores econômicos relacionados ao alto custo de investimento em pesquisa e desenvolvimento, bem como as poucas garantias de sucesso e possíveis falhas no tratamento, tornam o reposicionamento de fármacos existentes uma alternativa interessante tanto econômica como clinicamente para o tratamento, não só das leishmanioses, como também de outras doenças ⁵⁶. Fármacos aplicados atualmente na clínica contra as leishmanioses passaram a ser utilizados através dessa estratégia, como foi o caso da ANFO B, da paromomicina e da MILTE ⁵⁷. Essa estratégia se baseia na utilização de fármacos com segurança e eficácia clinicamente aprovados em novos regimes como, por exemplo: no tratamento de outras doenças, bem como no uso de diferentes doses ou concentrações em períodos mais curtos; administração por diferentes vias e também associados a outros fármacos como vistos em terapia combinada ⁵⁷.

1.4.1 Bloqueadores de canais de cálcio

Bloqueadores de Canais de Cálcio (BCC) são fármacos usualmente empregados na terapêutica de doenças cardiovasculares e hipertensivas ⁵⁸. No entanto, Reimão *et al.* ⁵⁹ demonstraram que alguns BCC apresentam efeito leishmanicida tanto em formas promastigotas, como em amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. O verapamil (VERA) é um BCC da família das

fenilalquilaminas que possui a capacidade de reverter parcialmente a multirresistência a determinados fármacos potencializando-os. De acordo com Neal *et al.*⁶⁰ o verapamil reduziu o CE₅₀ de 90mg/L para 25mg/L do estibogluconato de sódio em formas amastigotas de *L. (L.) donovani* resistentes. Resultados similares foram observados em culturas de *Trypanosoma cruzi* resistentes a nifurtimox *in vitro*, entretanto, não foram observados resultados significantes em experimentos *in vivo*. Coelho *et al.*^{48, 54, 55}, reverteram o fenótipo de resistências de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania spp.* resistentes à PMD utilizando baixas concentrações de verapamil.

1.4.2 Terapia combinada e sua aplicação no tratamento das Leishmanioses

A associação de fármacos é uma abordagem que consiste na utilização concomitante de dois ou mais fármacos biologicamente ativos, que tenham potências relativas semelhantes, atuem por mecanismos de ação diferentes e que apresentem efeito aditivo ou sinérgico quando combinados^{27, 61, 62}. Esta estratégia vem sendo aplicada no tratamento de doenças graves como câncer e AIDS, e, atualmente, tem sido recomendada pela OMS para o tratamento das leishmanioses^{10, 27, 63, 64}.

Essa abordagem apresenta diversas vantagens quando comparada à monoterapia, pois propicia a redução do curso do tratamento, bem como da concentração das doses administradas e, por conseguinte, diminui os efeitos colaterais associados à toxicidade dos fármacos. A terapia combinada também favorece a redução de desenvolvimento de parasitas resistentes^{27, 64}.

De acordo com a OMS¹⁰, a combinação de Sb⁵⁺ com paromomicina foi recomendada como primeira escolha no tratamento de LV em países do Leste da

África e no Iêmen. Combinações de anfotericina B com miltefosina em diferentes doses ou paromomicina combinada com miltefosina são recomendadas para o tratamento de LV causada por *L. (L.) donovani*^{10, 27}.

Outras combinações vêm sendo realizadas e têm mostrado bons resultados quando comparadas ao tratamento com o composto individual.

Em um estudo não controlado realizado na Bolívia a taxa de cura (92%) de pacientes infectados com *L. (V.) brasiliensis* que receberam a combinação de MILTE com PMD intralesional em doses inferiores ao recomendado foi superior à taxa de cura obtida para cada fármaco quando ambos os fármacos foram administrados isoladamente⁶⁵. Um relato de caso realizado no Brasil demonstrou melhora no estado de um paciente com LV após tratamento combinado de ANFO B, PMD e Sb⁵⁺⁶⁶.

Seifert *et al.*⁶⁷ apresentaram em 2006 o primeiro estudo sistemático sobre interação entre fármacos em *Leishmania* utilizando o método modificado de isoblograma. Este estudo mostrou que as associações entre miltefosina e anfotericina B, miltefosina e antimonial pentavalente e, miltefosina e paromomicina contra promastigotas de *L. (L.) donovani* resultaram em interações aditivas. Demonstraram em experimentos *in vivo*, que não houve alteração atividade da miltefosina quando combinada com os demais fármacos e que nenhuma das combinações foi tóxica em camundongos Balb/c⁶⁷.

Em outro estudo os autores observaram interações aditivas ao associarem a sitamaquina à anfotericina B, antimonial pentavalente, miltefosina e paromomicina no tratamento de amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*, no entanto, demonstraram que a associação entre a sitamaquina e pentamidina gerou uma interação sinérgica⁶⁸. Interações entre BCC e fármacos leishmanicidas foram analisadas e seus resultados indicaram interações aditivas em todas as combinações terapêuticas propostas no tratamento de promastigota e em amastigotas de *L. (L.)*

*infantum*⁵⁹. Trinconi *et al.*⁶⁹ sugeriu possível efeito sinérgico ao associar tamoxifeno a anfotericina B no tratamento de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis*. Posteriormente, foi observado ausência de interação entre tamoxifeno e miltefosina no tratamento de parasitos de *L. (L.) amazonensis in vitro* e *in vivo*⁷⁰. No entanto, mesmo na ausência de sinergismo a combinação terapêutica entre esses fármacos pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento de parasitos resistentes. Teixeira *et al.*⁷¹ demonstraram sinergismo no tratamento de amastigotas de *L. (L.) infantum* ao combinar paromomicina com anfotericina B e miltefosina com azitromicina. O sinergismo foi observado também, no tratamento de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com paromomicina combinada miltefosina e em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com paromomicina associada com Sb⁵⁺ e com anfotericina B⁷¹.

1.4.2.1 Isoblograma e classificação da natureza da interação

Uma forma de avaliar a interação entre dois ou mais fármacos é o método de isoblograma. O isoblograma foi introduzido por Loewe⁷²⁻⁷⁴ (revisado por Tallarida)⁷⁵ e consiste em um gráfico em coordenadas cartesianas no qual cada eixo representa um fármaco e suas respectivas proporções fixas. Este método permite a análise quantitativa da interação gerada entre dois fármacos quando a potência e a curva de dose-resposta foram pré-estabelecidas para cada um deles. Possibilitando que os valores de CE₅₀ (50% da concentração máxima) sejam determinados e, por conseguinte que a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) seja calculada e a natureza da interação entre os fármacos A e B seja classificada como sinérgica, aditiva (indiferente) ou antagônica⁷⁵.

No método de isoblograma modificado, descrito por Filveman *et al.*⁶³ dois fármacos são combinados em diferentes proporções fixas e posteriormente diluídos seriadamente na base 2, gerando assim, diferentes curvas de dose resposta, valores de CE_{50} e CIF para cada combinação⁶¹⁻⁶⁴. Esses valores são plotados para construção de um isoblograma, que é um gráfico onde cada eixo representa um fármaco e suas respectivas combinações, sendo o eixo das abcissas (fármaco A) e o eixo das ordenadas (fármaco B)⁶¹⁻⁶². Através da análise da posição dos pontos (gerados a partir das CE_{50} e CIF) demonstrados no isoblograma podemos ter uma noção sobre a natureza da interação entre esses fármacos. Deste modo, o efeito esperado (interação indiferente) é representado por uma linha reta (isobole de aditividade) que interliga o eixo x ao eixo y. Quando os pontos estão localizados abaixo da linha de aditividade, estes podem formar uma linha convexa ao eixo x que indicam sinergismo. Quando os pontos estão localizados acima da linha de aditividade, estes podem formar uma linha côncava ao eixo x que indicam antagonismo. Em um único experimento podemos observar diferentes tipos de interações ao analisar os valores de CIF e CE_{50} e suas respectivas posições no isoblograma. Contudo, a natureza da interação entre dois fármacos pode ser definida como sinérgica, como antagônica ou como indiferente de acordo com a média das somas dos valores de CIF^{61, 62, 64}. Uma interação sinérgica ocorre quando ao associar dois fármacos, a atividade de ambos os fármacos ou de apenas um deles, se torna maior do que sua atividade quando utilizado individualmente, indicando que baixas concentrações produzirão o mesmo efeito que uma concentração maior de um dos fármacos isolados^{62, 75}. Ao contrário do sinergismo, o antagonismo é definido quando a associação desses fármacos reduz a atividade de um deles ou de ambos, indicando assim que uma maior quantidade seria necessária para gerar o mesmo efeito. Já uma interação indiferente ou aditiva é

estabelecida quando a combinação apresenta um caráter neutro, sendo assim, o fármaco menos ativo, atuou como uma forma diluída do fármaco mais ativo ⁶¹.

De acordo com Chou ⁶⁴ a natureza da interação pode ser classificada como: sinérgica quando $CIF < 1$; aditiva quando $CIF = 1$ e antagônica quando $CIF > 1$, porque neste caso para a classificação da natureza da interação não é levado em consideração a análise estatística e sim a somatória da média dos valores de CIF. Porém Odds ⁷⁶ apresentou uma interpretação mais conservadora e robusta para a classificação da interação, sendo: Sinérgica quando $CIF < 0,5$; aditiva quando $CIF > 0,5 < 4$ e antagônica quando $CIF > 4$.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços, o tratamento das leishmanioses ainda é um grande desafio de saúde pública, fazendo com que esta doença seja considerada uma das mais prevalentes ao redor mundo. Isso porque, a efetividade da terapia antileishmania não depende somente das características do fármaco, mais sim da relação entre o fármaco, o parasita e o hospedeiro. Deste modo, novas abordagens terapêuticas se fazem necessárias e a terapia combinada pode ser uma alternativa economicamente viável e factível. Pois apresenta como benefícios não somente o reposicionamento de fármacos existentes no mercado, em novos regimes terapêuticos, como também a possível redução de dose e efeitos colaterais e a diminuição da possibilidade de seleção de parasitas resistentes. Que, por conseguinte, resultará em fármacos mais efetivos e em uma maior adesão ao tratamento.

3 OBJETIVOS

Propomos analisar *in vitro* a interação entre a pentamidina e diferentes fármacos aplicados ou não na terapia antileishmania em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes à PMD.

3.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade de pentamidina contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD após a recuperação desses parasitos de camundongo Balb/c;
- b) Avaliar a atividade pentamidina quando combinada com o verapamil, com a anfotericina B e com a miltefosina contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD;
- c) Avaliar se as diferentes linhagens de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD são capazes de infectar Macrófagos Derivados de Medula Óssea (MDMO);
- d) Avaliar a atividade da PMD contra amastigotas intracelulares;
- e) Avaliar o efeito da interação da pentamidina quando combinada com o verapamil e com a anfotericina B contra de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis à PMD.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo de parasitos para determinação do perfil de crescimento

Neste estudo, foram cultivadas 4 linhagens: a cepa de referência de *L. (L.) amazonensis*: (MHOM/BR/1973/M2269) (La M2269), e outras 3 linhagens modificadas a partir de La M2269.

- a) La PEN 0,5 - linhagem mutante resistente à pentamidina obtida por pressão seletiva em presença constante de 0,5µg/mL de PMD;
- b) La pSNBR - linhagem transfectada com o plasmídeo pSNBR vazio sensível à PMD;
- c) La PRP1 - transfectada com o plasmídeo pSNBR/ 8kb *Sma*-A superexpressora do gene PRP1 e resistente à PMD.

Para realização dos experimentos foi necessário determinar o perfil de crescimento de todas as linhagens utilizadas neste estudo. Desta forma, 1×10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio de cultura M199 (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado à 56 °C e demais componentes: HEPES (40 mM) pH7,4; Adenina (100µM); bicarbonato de sódio; Biotina à 1% (4mM); Penicilina (50U/mL) estreptomicina (50µg/mL) e Hemina (10µg/mL). Essas culturas foram mantidas em garrafas plásticas de 25 cm³ e incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C por 120 horas. Alíquotas de cada cultura foram coletadas para contagem em câmara de Neubauer em intervalos de 24 horas. Para a análise final foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

4.2 Manutenção da infectividade de parasitos de *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c

Para manutenção e verificação da infectividade das linhagens La M2269, La PEN 0,5, La pSNBR e La PRP1, 1×10^7 promastigotas no início da fase estacionária foram inoculados na região dorsal da pata posterior direita de camundongos BALB/c fêmeas com 6 semanas de idade e peso médio de 25 gramas. Os camundongos infectados foram eutanasiados por deslocamento cervical e a pata infectada coletada. O tecido foi removido, macerado e lavado com 10 mL de meio de cultura M199. O material suspenso foi centrifugado a 2800 RPM por 10 minutos, ressuspenso em meio de cultura M199 com 10% de SFB, e cultivados em garrafas plásticas 25 cm³ em B.O.D. a 26°C.

Promastigotas da linhagem mutante La PEN 0,5 recuperadas de lesão foram novamente inoculadas em camundongos Balb/c para aumentar a capacidade de infectividade desses parasitos.

4.3 Fármacos

A solução estoque de Anfotericina B (Cristália Ltda.) foi preparada na concentração de 5,4 mM. Os demais fármacos isetionato de pentamidina, cloridrato de verapamil e miltefosina (Sigma-Aldrich), foram preparados na concentração estoque de 10 mM. Todos os fármacos foram diluídos em água ultrapura, esterilizados por filtração com filtro 0,22 µm e estocados a 20 °C.

4.4 Determinação da atividade da PMD em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes à PMD

Para determinação da Concentração Efetiva em 50% (CE₅₀) os fármacos foram preparados conforme descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. Dois métodos foram utilizados para a determinação da CE₅₀.

Foram incubadas 1×10^6 promastigotas/mL em placas de 24 poços em presença de 0,1 a 12,5 μ M de Isetionato de pentamidina (SIGMA) em estufa B.O.D. a 26 °C por 72 horas. Em seguida foram coletadas alíquotas de cada cultura, para contagem em câmara de Neubauer. Os resultados expressos são referentes à média do número de parasitas em comparação com os parasitos controle não tratados calculados para pelo menos três experimentos independentes.

Inicialmente, os fármacos foram preparados a partir das soluções estoque nas seguintes concentrações máximas: 40 μ M de PMD, 100 μ M de VERA, 2 μ M de ANFO B e 100 μ M de MILTE. Em seguida, 100 μ L de meio RPMI-1640 com 5% de SFB e sem fenol foram adicionados nos poços da linha B até os poços da linha H. Posteriormente, os fármacos foram adicionados, sendo 200 μ L de cada fármaco em duplicata ou triplicata nos poços da linha A. Foram feitas diluições seriadas (base 2), transferindo 100 μ L dos fármacos dos poços da linha A até os poços da linha G. Em seguida, promastigotas das linhagens La M2269, La PEN 0,5, La pSNBR e La PRP1 no início da fase estacionária foram ressuspensas na concentração de 1×10^7 promastigota/mL no mesmo meio de cultura e foram distribuídas na placa contendo os fármacos diluídos, totalizando o volume de 200 μ L por poço. Foram considerados como controle de 100% de viabilidade, parasitas cultivados na ausência dos fármacos. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C por 24 horas. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em duplicata ou triplicata.

O valor de CE_{50} foi determinado por curvas de regressão sigmoidal utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0.

4.5 Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de MTT

A citotoxicidade dos fármacos e a viabilidade celular foram avaliadas pelo método colorimétrico de MTT. Este método consiste na adição de reagente de MTT (3-[4,5- dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) após a incubação das células na presença dos fármacos em concentrações crescentes. Quando viáveis, as células emitem coloração azul devido à formação de cristais de formazan resultantes da redução dos anéis de tetrazolol durante a atividade mitocondrial. O reagente de MTT é amarelo, assim quando as células estão mortas a coloração amarela se mantém.

Deste modo, foram adicionados 20µL de MTT (5mg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas em estufa por mais 4 horas a 37°C com 5% CO_2 . Para interromper a reação, foram adicionados em cada poço 80 µL de SDS 20%, seguida de uma incubação de 18 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C para solubilização dos cristais. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (ThermoScientific – Multiskan Go) no comprimento de onda de referência 690nm e no comprimento de onda de 595nm ⁷⁷.

O seguinte cálculo foi utilizado para determinação da densidade ótica final para determinação dos valores de CE_{50} de cada fármaco:

$$D.O \text{ final} = (D.O. 595 \text{ nm} - D.O 690nm - D.O. \text{ branco})$$

4.6 Determinação da interação entre fármacos em promastigotas pelo método modificado de Isoblograma.

As interações entre os fármacos foram determinadas pelo método modificado de Isoblograma ^{59, 63, 67}.

Para a avaliação da interação entre a pentamidina (Fármaco A) e os demais fármacos (Fármaco B), inicialmente foram determinadas as concentrações máximas para cada fármaco com base nos valores os de CE_{50} previamente determinados, de modo que a CE_{50} permanecesse no ponto médio da curva. Foram preparadas 6 combinações diferentes nas proporções de 5:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4 e 0:5 a partir das soluções A e B, respectivamente (**Figura 3 A**). Cada combinação foi plaqueada em duplicata e diluída seriadamente (base 2) para um volume final de 100 μ L/poço. Posteriormente, foram adicionados cerca de 1×10^6 parasitas/100 μ L em cada poço. A placa foi incubada a 26 °C por 24 horas e os valores de CE_{50} para cada combinação foi obtido pela análise da viabilidade determinada pelo método colorimétrico de MTT (**Figura 3B**).

Figura 3 - A - Preparo das combinações entre fármaco A (cinza escuro) e fármaco B(cinza claro); B) Placa de 96 poços após incubação com MTT.

4.6.1 Construção de Isoblograma a partir da Concentração Inibitória Fracionada

Para a construção dos isoblogramas os valores das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIFs) foram calculados, conforme demonstrado abaixo:

$$CIF_{(Pentamidina)} = \frac{CE_{50(Pentamidina)} + CE_{50(Fármaco B)}}{CE_{50(Pentamidina)}}$$

$$CIF_{(Fármaco B)} = \frac{CE_{50(Pentamidina)} + CE_{50(Fármaco B)}}{CE_{50(Fármaco B)}}$$

Os valores de CIF foram somados (Σ CIF) para cada combinação e foram plotados para a construção do Isoblograma (**Figura 4**):

$$\Sigma CIF = CIF_{(Pentamidina)} + CIF_{(Fármaco B)}$$

A CIF das diferentes combinações foram somados e posteriormente divididos por quatro, para obtenção da média da soma de CIF ($x\Sigma$ CIF) e para classificação da natureza da interação:

$$x\Sigma CIF = \frac{\Sigma CIF_{(Comb 2)} + \Sigma CIF_{(Comb 3)} + \Sigma CIF_{(Comb 4)} + \Sigma CIF_{(Comb 5)}}{4}$$

Figura 4: Representação gráfica de um isoblograma no qual a linha verde representa aditividade; a linha curva em azul representa sinergismo e a linha curva em vermelho representa antagonismo.

A natureza da interação entre a pentamidina (fármaco A) e os demais fármacos (fármaco B) foi classificada após a determinação da $x\Sigma$ CIF e de acordo com definição de Odds⁷⁶.

Sendo considerado: Interação sinérgica quando $CIF < 0,5$;

Interação aditiva quando $CIF > 0,5 < 4$

Interação antagônica quando $CIF > 4$.

4.7 Obtenção de Macrófagos Derivados de Medula Óssea (MDMO) de camundongo BALB/c

Seguindo o protocolo descrito por Marim *et al.*⁷⁸ camundongos BALB/c foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e tíbias foram

asépticamente removidos e suas extremidades retiradas para obtenção das células da medula óssea. Em seguida, as células suspensas foram centrifugadas duas vezes a 200 x g por 5 minutos a 4°C em 10 ml de meio de diferenciação R30/20 (30% de sobrenadante da linhagem celular L929 e 20% de SFB) contendo L-glutamina 2 mM e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. No quarto dia de incubação foram adicionados mais 10mL de meio de diferenciação R30/20 contendo L-glutamina 2mM à placa com as células. No sétimo dia os sobrenadantes foram descartados e as placas lavadas com PBS pH 7,2 a 37° C, e em seguida, 10 ml de meio RPMI gelado foi adicionado às placas que foram incubadas a 4°C por 10 minutos. Após esse período, as células foram coletadas das placas e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos, ressuspensas em meio R5/10 (5% de sobrenadante da linhagem celular L929 e 10% de SFB) contendo L-glutamina 2mM e plaqueadas em placas de 24 poços para a realização das infecções e em placas de 96 poços para teste de citotoxicidade por MTT.

4.8 Determinação da citotoxicidade da PMD e do VERA em macrófagos

A Concentração Citotóxica dos fármacos em 50% (CC₅₀) em culturas de macrófago foi determinada pelo método colorimétrico de MTT, descrito anteriormente. Cerca de 1×10^5 macrófagos ressuspensos em meio R 5/10 com 2mM de L- glutamina, foram semeadas em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C para adesão das células ao poço. Os fármacos foram preparados nas concentrações máximas de 150 µM de PMD e 300 µM de VERA e foram diluídos seriadamente (base 2) e em seguida foram transferidos para a placa contendo as células aderidas. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Como

controle de 100% viabilidade, macrófagos foram incubados somente em meio RPMI-1640.

4.9 Infecção de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes à PMD

Após a realização dos testes *in vitro* em promastigotas, iniciamos a padronização da infecção de MDMO com as diferentes linhagens de *L. (L.) amazonensis*. Desta forma, 2×10^5 macrófagos/poço ressuspensos em meio R5/10 contendo L-glutamina 2 mM foram cultivados em lamínulas de vidro estéreis de 13mm de diâmetro dentro de placas de 24 poços. Em seguida as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ para adesão na superfície. Após esse período, o sobrenadante (contendo as células não aderidas) de cada poço foi descartado e os macrófagos foram infectados por 4 horas a 33 °C com 5% de CO₂ com promastigotas das linhagens La M2269, La pSNBR, La PRP1, La PEN 0,5 ressuspensos em meio RPMI com 5% de SFB nas proporções 5, 10 e 20 parasitas por macrófago. As placas foram lavadas com PBS pH 7,2 a 37 °C para a retirada dos parasitos não fagocitados e as células foram ressuspensas em RPMI 1640 com 5% e foram novamente incubadas por 24 e 48 horas, em estufa a 33 °C com 5% de CO₂. Ao fim desta etapa, as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,2 a 37 °C, fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com o corante rápido do Kit Instant Prov (New Prov). Foram contadas 300 células por lamínula para determinação do parasitismo e para determinação da taxa de infecção. As lâminas foram observadas

em microscópio óptico, com aumento de 1000 x. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em triplicata.

Para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ Infecção} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de células infectadas})}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

$$\text{Parasitismo/100 células} = \frac{[(\text{N}^{\circ} \text{ de parasitas}) \times (\text{N}^{\circ} \text{ de células infectadas})]}{\text{N}^{\circ} \text{ de células infectadas} \times \text{N}^{\circ} \text{ total de células}}$$

4.10 Avaliação da atividade da PMD contra amastigotas intracelulares de La M2269

Cerca de 2×10^5 MDMO foram plaqueadas e infectadas conforme descrito anteriormente. As células foram infectadas com promastigotas da linhagem La M2269 no início da fase estacionária na proporção 20:1 parasita/macrófago e foram incubadas em estufa a 33° C com 5 % por 4 horas. Após esse período as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,2 à 37 °C para retirada dos parasitos não fagocitados. Em seguida as células foram incubadas na presença de 5; 7,5; 10; 15 e 17,5 µM de PMD por 24, 48 e 72 horas. Como controle de infecção foram utilizadas células infectadas e não tratadas. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata.

4.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de MDMO infectados com amastigotas de La M2269 e tratados com 7 e 15 μ M de PMD

Para a realização da MET, 4×10^6 MDMO foram cultivados em 5 garrafas de cultura contendo 3 mL de meio R5/10 + L - glutamina por 24h a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período o meio foi descartado e as células foram infectadas com 5:1 parasitas/célula por 4 h a 33 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, as garrafas foram lavadas para retirada dos parasitas não interiorizados, as células foram ressuspensas em meio RPMI -1640 com diferentes concentrações de PMD e foram incubadas a 33 °C com 5% de CO₂ por 24 h conforme demonstrado abaixo:

- a) Amostra 1 – Macrófago;
- b) Amostra 2 - Macrófago + 7,5 μ M de PMD;
- c) Amostra 3 - Macrófago + La M2269;
- d) Amostra 4 - Macrófago + La M2269 + 7,5 μ M de PMD;
- e) Amostra 5 - Macrófago + La M2269 + 15 μ M de PMD.

As garrafas contendo os macrófagos infectados e tratados foram lavados 2 x com PBS pH 7,2. As células foram coletadas e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos. Seguindo o protocolo descrito por Sesso *et. al.* ⁷⁹, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer e cerca 5×10^5 células de cada cultivo foram ressuspensas em 1mL de glutaraldeído 3%. As amostras foram incubadas em banho de gelo por 2 horas, com homogeneização em intervalos de 15 minutos. Após esse período, os microtubos foram centrifugados por 4000 RPM por 4 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 400 μ L de ferrocianeto e 400 μ L de ósmio por 1 h 15 min, com homogeneização de 15 em 15 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 4000 RPM por 4 minutos, os sobrenadantes foram

descartados o pellet foi lavado com 1,2 mL de PBS 0,1 M. As amostras foram processadas e posteriormente incluídas em resina epon no Instituto do Coração (Incor) ⁷⁹. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL no Instituto Adolfo Lutz e posteriormente análises com auxílio do Professor Antônio Sesso (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, departamento de morfologia celular).

4.12 Análise da interação entre a pentamidina combinada com verapamil e pentamidina combinada com anfotericina B em amastigotas intracelulares de La M2269

Cerca de 2×10^5 MDMO foram infectados com formas promastigotas no início da fase estacionária da linhagem La M2269 na proporção 10:1 parasita/macrófago conforme descrito anteriormente. As células infectadas foram incubadas na presença dos fármacos diluídos seriadamente a partir das concentrações máximas pré-definidas de 2,5 μ M de PMD combinada com 80 μ M de VERA e 1,25 μ M de PMD combinada com 0,5 μ M de ANFO B. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 33° C com 5% de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi descartado, as células receberam novamente os fármacos diluídos e foram incubadas por mais 48 horas totalizando 120 horas de incubação ^{59, 67}. A montagem das lâminas e a contagem de células infectadas foram realizadas conforme citado no item 3.9 de Materiais e Métodos.

4.13 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa Graph Pad Prism 5 e (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil de crescimento dos parasitas

Os parasitos de *L. (L.) amazonensis* das linhagens La M2269 e La pSNBR (sensíveis à PMD) e das linhagens La PEN 0,5 e La PRP1 (resistentes à PMD) foram cultivados por um período de 192 horas para determinação do perfil de crescimento e início da fase estacionária do crescimento. Ao analisar a **Figura 5**, notamos que todas as linhagens atingiram a fase estacionária após aproximadamente 120 horas de cultivo, apresentando cerca de 40×10^6 parasitos/mL (La PRP1 e La pSNBR) e cerca de 50×10^6 parasitos/mL (La M2269 e La PEN 0,5). No entanto, notamos uma diminuição no número de parasitos das linhagens resistentes a PMD (La PEN 0,5 e La PRP1) entre 120 e 144 horas. Enquanto o número de parasitos da linhagem La M2269 em 192 horas manteve-se próximo a 50×10^6 promastigotas/mL.

Figura 5 - Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a pentamidina. Cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de SFB por 192 horas em estufa B.O.D. a 26° C. As curvas representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.2 Verificação da infectividade de parasitos de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD em camundongos BALB/c

Camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados na pata posterior direita com promastigotas no início da fase estacionária das linhagens La M2269, La PEN 0,5, La pSNBR e La PRP1. Quarenta e cinco dias após a infecção foi observado o surgimento de lesão na pata apenas dos camundongos inoculados com parasitas das linhagens La M2269 e La PRP1. Nos camundongos infectados com linhagem La M2269, notamos que as lesões eram maiores e ulceradas do que nos camundongos infectados com linhagem La PRP1, onde as lesões eram menores e não ulceradas. Entretanto, nenhuma lesão foi observada nos camundongos inoculados com as linhagens La PEN 0,5 e La pSNBR após esse mesmo período. Depois de constatada a lesão, todos os camundongos (com e sem lesão) foram eutanasiados. As patas foram coletadas e o tecido foi macerado, posteriormente a suspensão residual foi cultivada em meio de cultura M199. Com aproximadamente três dias de incubação foram observadas formas promastigotas das linhagens La M2269 e La PRP1 no meio de cultura. Curiosamente, notamos que os parasitas das linhagens La PEN 0,5 e La pSNBR, foram isolados a partir das patas apesar de não terem gerado lesão após infecção. Os parasitos foram mantidos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de PMD para confirmação dos fenótipos e para determinação do CE₅₀ de PMD.

5.3 Determinação do CE_{50} de pentamidina em formas promastigotas das linhagens de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD.

Parasitos recuperados de lesões de camundongos BALB/c foram cultivados e incubados em meio M199 (suplementado com 10% SFB) contendo diferentes concentrações de pentamidina por 72 horas. Notamos que o fenótipo de resistência à PMD manteve-se tanto em parasitos da linhagem La PEN 0,5 quanto em parasitos transfectados da linhagem La PRP1, apresentando valores de CE_{50} (IC95%) de 4,114 (2,772 a 6,105) μ M e 1,869 (0,868 a 4,025) μ M, respectivamente (**Tabela 1 e Figura 6**). Quando comparados aos parasitos das linhagens suscetíveis a PMD, obtivemos uma razão de resistência de cerca de 6 vezes entre as La PEN 0,5 e La M2269 e cerca de 3 vezes entre La PRP1 e La pSNBR. Notamos que a CE_{50} de PMD contra promastigotas de La M2269 foi de 0,6888 (0,425 a 1,117) μ M e 0,6619 (0,258 a 1,874) μ M para La pSNBR indicando assim, que como esperado, o vetor pSNBR vazio não confere resistência à pentamidina, como descrito anterior por Coelho *et al.* ⁴⁸.

Tabela 1 - Valores de CE_{50} e de intervalo de confiança de 95% (IC95%) obtidos após 72 horas de incubação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com PMD.

Linhagens de <i>L.(L.) amazonensis</i>	CE_{50} (IC95%) PMD (μ M)	Razão da Resistência
La M2269	0,6888 (0,425 a 1,117)	5,97
La PEN 0,5	4,114 (2,772 a 6,105)	
La pSNBR	0,6619 (0,258 a 1,874)	2,82
La PRP1	1,869 (0,868 a 4,025)

Figura 6 - Curva de dose-resposta de valores de CE_{50} de PMD contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. La M2269- cepa de referência de *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L.(L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L.(L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*. Resultado da média e desvio padrão de um experimento representativo de três experimentos realizados em triplicata.

5.4 Análise da Interação entre diferentes fármacos contra promastigotas

Os valores de CE_{50} e CIF resultantes das combinações entre pentamidina e verapamil; pentamidina e anfotericina B e pentamidina e miltefosina estão representados respectivamente nas **Tabelas 2, 3 e 4**. Os valores de CE_{50} de verapamil foram semelhantes entre as três linhagens: 22,48 μM para La M2269, 27,35 μM para La PRP1 e 22,80 μM para La PEN 0,5. Para anfotericina B os valores de CE_{50} foram de 0,034 μM , 0,059 μM e 0,041 μM para La M2669, La PRP1 e La PEN 0,5 respectivamente. Para miltefosina as CE_{50} foram 23,14 μM para La M2269, 8,21 μM para La PRP1 e 14,60 μM para La PEN 0,5. Notamos que a linhagem La

M2269 quando tratada com VERA e ANFO B foi mais suscetível a esses fármacos do que a linhagens resistentes à PMD. No entanto, a La M2269 foi mais tolerante à MILTE do que as linhagens La PRP1 e La PEN 0,5. Ao mesmo tempo, notamos também que mesmo combinada em diferentes proporções, no tratamento de La M2269, a presença de MILTE não provocou a redução no CE_{50} de PMD mantendo próximas a $0,4 \mu\text{M}$ para todas as proporções. O mesmo não foi observado para as demais culturas tratadas com PMD associada à MILTE.

Quando analisamos os valores da média da ΣCIF e a classificação das interações (**Tabela 5**) sugerimos de acordo com a classificação de Odds⁷⁶ que todas as combinações propostas foram indiferentes (aditivas), indicando que mesmo na ausência de sinergismos entre os fármacos combinados, a atividade da PMD não foi inibida por nenhum deles. Os isobogramas foram construídos a partir dos valores de CIF e estão representados nas **Figuras 7, 9 e 11** e as curvas-doses respostas estão disponíveis nas **Figuras 8, 10 e 12**.

Tabela 2 - Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* selvagem (La M2269).

Proporção	CE_{50} ^(a) (IC 95%) ^(b)		CIF ^(c)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	VERA (μ M)	PMD	VERA	
5:0	0,782 (0,671 a 0,910)	...	...	...	...
4:1	0,880 (0,752 a 1,029)	1,100 (0,940 a 1,286)	1,126	0,049	1,175
3:2	0,722 (0,625 a 0,833)	2,405 (2,082 a 2,778)	0,923	0,107	1,030
2:3	0,718 (0,564 a 0,915)	5,388 (4,229 a 6,865)	0,919	0,240	1,159
1:4	0,512 (0,412 a 0,635)	10,24 (8,248 a 12,70)	0,655	0,456	1,110
0:5	...	22,48 (18,80 a 26,88)	...	...	...
Proporção	CE_{50} ^(a) (IC 95%) ^(b)		CIF ^(c)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	ANFO (μ M)	PMD	ANFO	
5:0	0,440 (0,363 a 0,532)	...	...	...	...
4:1	0,452 (0,387 a 0,527)	0,006 (0,005 a 0,007)	1,028	0,164	1,192
3:2	0,362 (0,317 a 0,413)	0,012 (0,011 a 0,014)	0,823	0,356	1,179
2:3	0,266 (0,228 a 0,311)	0,020 (0,017 a 0,023)	0,606	0,589	1,194
1:4	0,142 (0,126 a 0,161)	0,028 (0,025 a 0,032)	0,324	0,840	1,163
0:5	...	0,034 (0,030 a 0,039)	...	...	...
Proporção	CE_{50} ^(a) (IC 95%) ^(b)		CIF ^(c)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	MILTE (μ M)	PMD	MILTE	
5:0	0,451 (0,372 a 0,545)	...	...	...	...
4:1	0,465 (0,397 a 0,544)	0,581 (0,496 a 0,680)	1,032	0,025	1,057
3:2	0,433 (0,360 a 0,521)	1,444 (1,201 a 1,736)	0,962	0,062	1,024
2:3	0,424 (0,352 a 0,511)	3,180 (2,638 a 3,833)	0,941	0,137	1,079
1:4	0,419 (0,332 a 0,518)	8,289 (6,632 a 10,36)	0,929	0,358	1,288
0:5	...	23,14 (19,41 a 27,60)	...	...	...

a) CE_{50} : Concentração efetiva em 50%;

b) IC 95%: Intervalo de confiança de 95%;

c) CIF: Concentração Inibitória Fracionada;

d) Σ CIF.

Figura 7 - Isobolograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* (La M2269). Onde os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, respectivamente.

Figura 8 - Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* (La M2269).

Tabela 3 - Valores de CE_{50} e CIFs da pentamidina combinada com verapamil, anfotericina B ou miltefosina no tratamento de formas promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectada (La PRP1).

Proporção	CE_{50} ^(a) (IC 95%) ^(b)		CIF ^(c)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	VERA (μ M)	PMD	VERA	
5:0	2,010 (1,828 a 2,178)	...	...	...	...
4:1	1,858 (1,640 a 2,327)	2,322 (2,050 a 2,909)	0,924	0,085	1,009
3:2	1,532 (1,521 a 1,869)	5,097 (5,070 a 6,230)	0,762	0,186	0,949
2:3	1,223 (1,124 a 1,600)	9,730 (8,434 a 12,00)	0,608	0,356	0,964
1:4	0,878 (0,934 a 1,029)	17,57 (18,69 a 20,57)	0,437	0,642	1,079
0:5	...	27,35 (26,78 a 33,32)	...	...	...
Proporção	PMD (μ M)		ANFO (μ M)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	ANFO (μ M)	PMD	ANFO	
5:0	1,093 (0,948 a 1,261)	...	...	...	...
4:1	0,795 (0,678 a 0,932)	0,010 (0,009 a 0,012)	0,727	0,170	0,897
3:2	0,701 (0,612 a 0,803)	0,023 (0,020 a 0,027)	0,641	0,398	1,039
2:3	0,500 (0,400 a 0,624)	0,037 (0,030 a 0,047)	0,457	0,638	1,096
1:4	0,269 (0,205 a 0,353)	0,054 (0,041 a 0,071)	0,246	0,921	1,167
0:5	...	0,059 (0,044 a 0,078)	...	...	...
Proporção	PMD (μ M)		MILTE (μ M)		Σ CIF ^(d)
	PMD (μ M)	MILTE (μ M)	PMD	MILTE	
5:0	1,129 (0,955 a 1,335)	...	...	...	...
4:1	1,169 (0,959 a 1,426)	1,461 (1,198 a 1,782)	1,035	0,178	1,213
3:2	0,846 (0,743 a 0,963)	2,820 (2,478 a 3,210)	0,749	0,344	1,093
2:3	0,666 (0,558 a 0,794)	4,992 (4,187 a 5,952)	0,590	0,608	1,198
1:4	0,326 (0,243 a 0,437)	6,512 (4,852 a 8,741)	0,288	0,793	1,082
0:5	...	8,207 (5,414 a 12,44)	...	...	...

a) CE_{50} : Concentração efetiva em 50%;

b) IC 95%: Intervalo de confiança de 95%;

c) CIF: Concentração Inibitória Fracionada;

d) Σ CIF.

Figura 9 - Isobolograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectadas (La PRP1). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, respectivamente.

Figura 10 - Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* transfectada (La PRP1).

Tabela 4 - Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutantes (La PEN 0,5).

Proporção	$CE_{50} \pm IC\ 95\%$		CIF		ΣCIF
	PMD (μM)	VERA(μM)	PMD	VERA	
5:0	2,086 (1,493 a 2,914)	...	...	...	...
4:1	1,507 (1,043 a 2,177)	1,884 (1,304 a 2,722)	0,722	0,083	0,805
3:2	1,347 (0,907 a 2,001)	4,491 (3,023 a 6,672)	0,646	0,197	0,843
2:3	1,059 (0,807 a 1,391)	7,943 (6,048 a 10,43)	0,508	0,348	0,856
1:4	0,922 (0,671 a 1,268)	18,44 (13,41 a 25,35)	0,442	0,809	1,251
0:5	...	22,80 (17,07 a 30,46)	...	...	...
Proporção	PMD (μM)	ANFO (μM)	PMD	ANFO	ΣCIF
5:0	1,925 (1,535 a 2,413)	...	...	...	...
4:1	1,035 (0,843 a 1,271)	0,013 (0,011 a 0,016)	0,538	0,317	0,855
3:2	0,797 (0,668 a 0,950)	0,027 (0,022 a 0,032)	0,414	0,651	1,065
2:3	0,532 (0,400 a 0,707)	0,040 (30,05 a 53,01)	0,276	0,977	1,254
1:4	0,204 (0,164 a 0,254)	0,042 (0,034 a 0,051)	0,106	1,017	1,123
0:5	...	0,041 (0,035 a 0,048)	...	...	...
Proporção	PMD (μM)	MILTE (μM)	PMD	MILTE	ΣCIF
5:0	1,630 (1,091 a 2,437)	...	...	...	...
4:1	1,740 (1,102 a 2,747)	2,175 (1,377 a 3,434)	1,067	0,149	1,216
3:2	1,726 (1,213 a 2,457)	5,753 (4,042 a 8,189)	1,059	0,394	1,453
2:3	1,324 (0,974 a 1,800)	9,928 (7,302 a 13,50)	0,812	0,680	1,492
1:4	0,668 (0,549 a 0,812)	13,35 (10,98 a 16,23)	0,410	0,914	1,324
0:5	...	14,60 (11,72 a 18,19)	...	...	...

- a) CE_{50} : Concentração efetiva em 50%;
b) IC 95%: Intervalo de confiança de 95%;
c) CIF: Concentração Inibitória Fracionada;
d) ΣCIF .

Figura 11 - Isobolograma obtido a partir dos valores de CIF de diferentes combinações entre: A) Pentamidina (eixo x) e Verapamil (eixo y); B) Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y); C) Pentamidina (eixo x) e Miltefosina (eixo y) no tratamento de promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutante (La PEN 0,5). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4,e 0:5, respectivamente

Figura 12 - Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de: A) pentamidina e verapamil; B) pentamidina e anfotericina B e C) pentamidina e miltefosina em promastigotas de *L.(L.)amazonensis* mutante (La PEN 0,5)

Tabela 5 - Valores de média da soma dos CIFs da pentamidina combinada com verapamil, anfotericina B e miltefosina no tratamento de promastigotas de diferentes linhagens de *L.(L.)amazonensis*.

Linhagens	Fármacos combinados	Média da Σ CIF	Natureza da interação
La M2269	pentamidina + verapamil	1,12	Indiferente
	pentamidina + anfotericina B	1,18	
	pentamidina + miltefosina	1,11	
La PRP1	pentamidina + verapamil	1,00	Indiferente
	pentamidina + anfotericina B	1,05	
	pentamidina + miltefosina	1,15	
La PEN 0,5	pentamidina + verapamil	0,94	Indiferente
	pentamidina + anfotericina B	1,07	
	pentamidina + miltefosina	1,37	

5.5 Determinação do valor de CC_{50} dos fármacos em Macrófagos derivados de medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea foram tratados por 24 horas com PMD e VERA, nas concentrações máximas de 150 e 300 μ M diluídos seriadamente para determinação da CC_{50} . Notamos que concentrações cerca de 30 μ M de PMD já foram citotóxicas para 50% da cultura de macrófagos (**Tabela 6**), enquanto a CC_{50} de VERA ficou acima de 200 μ M.

Tabela 6 – Concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e IC 95% em MDMO tratados com pentamidina (PMD) e verapamil (VERA).

Linhagem celular	CC ₅₀ (IC 95%)	
	PMD (μM)	VERA (μM)
MDMO	29,1 (24,83 a 34,12)	> 200

5.6 Infecção de MDMO por diferentes linhagens de *L. (L.) amazonensis*

Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com promastigotas das linhagens das linhagens de *L. (L.) amazonensis* no início da fase estacionária nas proporções 5, 10 e 20 parasitos/macrófago nos tempos de 24 e 48 horas, conforme descrito no item 3.9 de Materiais e Métodos.

Ao observar as imagens na **Figura 13**, notamos a presença de amastigotas das quatro linhagens no interior dos macrófagos, indicando que as linhagens La PEN 0,5, La pSNBR e La PRP1 foram capazes de infectar macrófagos.

Figura 13 - Macrófagos derivados de medula óssea infectados com parasitas das formas amastigotas (setas pretas) de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a pentamidina recuperadas de lesão em pata de camundongos BALB/c La M2269- cepa de referência de *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L.(L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L.(L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*.. Infectadas com 10: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 horas a 33°C com 5% de CO₂. Observados em microscópio ZEISS AXIOPHOT com sistema de captação de imagem AxioVision 4.6. Aumento de 1000x.

Observamos que a porcentagem de macrófagos infectados pelas linhagens modificadas foi igual ou superior a 60% nas três proporções (5:1, 10:1 e 20:1) tanto em 24 como em 48 horas de incubação (**Figura 14**). Notamos também que não houve diferença significativa na porcentagem de macrófagos infectados por La PEN 0,5 e a La M2269 nas proporções de 10 e 20:1 tanto em 24 quanto 48 horas.

Figura 14 - Porcentagem de MDMO infectados por parasitas nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* La M2269- cepa de referência de *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L. (L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR - *L. (L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L. (L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*.. Infectadas com 5, 10 e 20: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 e 48 horas a 33°C com 5% de CO₂. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O mesmo ocorreu em relação ao número de amastigotas/ células, como demonstrado nos gráficos da **Figura 15**, onde há cerca de duas vezes mais

amastigotas de La M2269 por células do que amastigotas de La pSNBR e de La PRP1. O número de amastigotas por células infectadas pelas linhagens La M2269 e La PEN 0,5 foi semelhante nos dois períodos de incubação e nas três proporções utilizadas não havendo diferença significativa entre elas.

Figura 15 - Número de amastigotas por 100 MDMO infectados por parasitas nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* La M2269- cepa de referência de *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD; La PEN 0,5- *L.(L.) amazonensis* mutante resistente a PMD; La pSNBR- *L.(L.) amazonensis* sensível a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR vazio; La PRP1- *L.(L.) amazonensis* resistente a PMD, transfectada com o vetor plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A superexpressora do gene *PRP1*. Infectadas com 5, 10 e 20: 1 parasitos/macrófagos nos tempos de 24 e 48 horas a 33°C com 5% de CO₂. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Com base nos resultados obtidos, definimos que tanto as proporções 10 quanto 20:1 parasitos/macrófagos foram capazes de infectar 60% ou mais macrófagos e assim, optamos inicialmente pela proporção 20:1 com incubação por 24 horas para prosseguirmos com o tratamento.

5.7 Atividade da pentamidina contra amastigotas intracelulares de La M2269

Após definirmos o valor de CC_{50} de PMD em macrófago, realizamos o tratamento de macrófagos infectados com amastigotas de La M2269, com intuito de identificarmos o período ideal de incubação e as concentrações mais eficazes na redução na taxa de infecção. Assim, realizamos três experimentos independentes em triplicata, nos quais os macrófagos foram infectados por promastigotas apenas da linhagem La M2269, na proporção 20:1 parasitas /célula e tratadas com 5; 7,5; 10; 15 e 17,5 μ M de PDM diluídos em meio de cultura RPMI com 5% SFB por 24 e 48 horas a 33° C com 5% de CO_2 . Como controle de infecção foi utilizado células não tratadas.

Figura 16 - MDMO infectados por promastigotas dos parasitas da espécie *L.(L.) amazonensis* cepa La M2269 na proporção 20:1 parasitos/macrófago, incubados em estufa com 5% de CO₂ a 33°C por 24 horas. Controle não tratado; 5µM 7,5µM; 10µM; 15µM de PMD e (G) 17,5µM de PMD. Observados em microscópio luminoso ZEISS AXIOPHOT com sistema de captura de imagem AxioVision 4.6 (aumento de 1000x). Insert: Redução do número de macrófagos por lâmina (aumento de 200x).

Ao analisar as lâminas (**Figura 16**) foi observado que conforme se aumentava a concentração de PMD menor era a quantidade de macrófagos. Verificamos que a concentração de 17,5 μM de PMD provocou a diminuição do número de macrófagos, porém isso não refletiu na redução da porcentagem de células infectadas. A partir da análise dos macrófagos infectados com amastigotas da linhagem La M2269 incubados na presença o de 5, 7,5, 10, 15 e 17,5 μM de PMD, notamos que não houve redução na porcentagem de células infectadas (maior ou igual a 80%) mesmo quando incubadas em altas concentrações de PMD(15 e 17,5 μM) por períodos de até 72 horas(**Figura 17**).

Figura 17 - Porcentagem de MDMO infectados por 20:1 parasitos/macrófago da linhagem La M2269, incubados por 24, 48 e 72 horas a 33°C com 5% de CO_2 e tratados com concentrações crescentes de PMD. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Já ao avaliarmos os gráficos representados na **figura 18**, nota-se um aumento sutil no número de amastigotas nas células infectadas e tratadas por 48 horas quando comparados às células infectadas e tratadas por 24 horas, além de uma redução após 72 horas, indicando mais uma vez que a PMD parece não apresentar efeito leishmanicida sobre a multiplicação das formas amastigotas no interior de macrófagos.

Figura 18 - Número de amastigotas por 100/ MDMO infectados com 20:1 parasitos/macrófago da linhagem La M2269 incubados por 24, 48 e 72 horas a 33°C com 5% de CO₂ e tratados com concentrações crescentes de PMD. Resultado da média e desvio padrão de três experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.7.1 Avaliação das alterações morfológicas provocadas pela pentamidina em macrófagos infectados amastigotas

Com o intuito de compreender melhor o que estava ocorrendo com a célula durante o tratamento com PMD, MDMO infectados com 5:1 parasitos/macrófagos foram tratados com 7,5 e 15 μM de PMD e incubados por 24 horas a 33°C com 5% de CO₂. Essas amostras foram processadas conforme descrito no item 3.11 de Materiais e Métodos e submetidas à análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Quando analisamos as imagens na **Figura 19**, notamos que 7,5 μM de PMD (**Figura 19 B**) provocaram alterações tanto na membrana celular quanto no núcleo do macrófago não infectado. Essas alterações não foram observadas no controle não tratado (**Figura 19 A**) e no macrófago infectado não tratado (**Figura 19 C**). Macrófagos infectados e tratados sofreram ruptura de membrana celular e destruição

citoplasmática na presença de 7,5 e 15 μM de PMD (**Figura 19 D e F**), respectivamente.

Em relação ao dano provocado pela PMD em amastigotas fagocitadas, podemos observar alterações no cinetoplasto, bem como alterações nucleares (**Figura 19 D, E, F**). Notamos na **Figura 19 E** (asterisco) uma amastigota com citoplasma e núcleo destruído e aparente ruptura na membrana mitocondrial.

Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos derivados de medula óssea: A - não tratados e não infectados; B - não infectados e tratados com 7,5µM de pentamidina; C – infectados e não tratados. MDMO infectados com parasitos de La M2269 na proporção 10:1 incubados por 24 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Tamanhos: A-15k; B - 20k; C - 20k. Seta preta tracejada - membrana íntegra do macrófago, seta branca tracejada - alterações na membrana do macrófago; N - núcleo do macrófago; Seta preta - amastigota; C - cinetoplasto; n - núcleo da amastigota(continuação);

Figura 19 - (continuação) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos derivados de medula óssea: D e E - infectados e tratados com 7,5µM de pentamidina; G - infectados e tratados com 15µM de pentamidina. MDMO infectados com parasitos de La M2269 na proporção 10:1 incubados por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Tamanhos: D - 15k; E - 10k e F - 5k. Seta branca tracejada - alterações na membrana do macrófago; seta branca - ruptura de membrana do macrófago; N - núcleo do macrófago; Seta preta - amastigota; asterisco - amastigota afetada .

5.8 Análise da interação entre a pentamidina combinada com verapamil e pentamidina combinada com anfotericina B em amastigotas intracelulares de La M2269

Seguindo o protocolo descrito por Seifert *et al.* ⁶⁷ aumentamos o tempo de tratamento das células infectadas para 120 horas. Assim, as células infectadas foram incubadas por 72 horas em estufa CO₂ a 33 °C na presença de PMD e VERA individualmente (5:0 e 0:5) e combinados em proporções de 4:1, 3:2, 2:3 e 1:4, respectivamente. Após esse período, os sobrenadantes foram retirados e as células novamente tratadas e incubadas por mais 48 horas nas mesmas condições. Ao aumentar o tempo de incubação das células infectadas tratadas com pentamidina, observamos que 0,3 µM de PMD provocou uma diminuição de aproximadamente 40% no total de células infectadas (70%) quando comparado ao controle não tratado. Notamos que ao combinar PMD com VERA a porcentagem de células infectadas era maior do que no tratamento somente com PMD. Observamos também que quando o verapamil estava em maior proporção na combinação (2:3 e 1:4) o resultado era semelhante ao visto nas células tratadas com esse fármaco sozinho. Deste modo, não conseguimos aplicar para essa combinação o método de isoblograma modificado, pela dificuldade em estabelecer os valores de CE₅₀ para cada fármaco, por esse motivo os resultados dessa combinação foram demonstrados em gráficos de barras (**Figura 20**).

Figura 20 - Porcentagem de MDMO infectados por 10:1 parasitos/macrófagos das linhagens La M2269, incubados por 120 horas a 33°C com 5% de CO₂ e tratados com concentrações crescentes de PMD e VERA individualmente e PMD e VERA combinados. Resultados da média e desvio padrão de dois experimentos independentes, analisados pelo teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Considerando a baixa atividade verificada quando a pentamidina foi associada com o verapamil, optamos por combinar a pentamidina com a anfotericina B. Assim, seguindo a mesma metodologia citada anteriormente preparamos soluções com 1,25 μM de PMD e 0,5 μM de ANFO B para o tratamento das células infectadas.

Os valores de CE_{50} , CIF, ΣCIF e média da ΣCIF foram determinados em amastigotas intracelulares de La M2269 e estão descritos na **Tabela 7**. As curvas de dose-respostas e o isoblograma são apresentados nas **Figuras 21 e 22**.

Tabela 7 - Valores de CE_{50} e CIFs das combinações entre pentamidina e anfotericina B no tratamento de amastigotas intracelulares de *L.(L.)amazonensis* selvagem (La M2269).

Relação PMD: ANFO	CE_{50} (IC 95%)		CIF		ΣCIF	Média da ΣCIF
	PMD (μM)	ANFO B(μM)	PMD	ANFO		
5:0	1,096	...	...	...	...	0,65
	(0,642 a 1,871)	...	...	...	...	
4:1	0,168	0,017	0,153	0,313	0,467	
	(0,152 a 0,185)	(0,015 a 0,019)				
3:2	0,093	0,025	0,085	0,464	0,549	
	(0,078 a 0,111)	(0,021 a 0,030)				
2:3	0,054	0,032	0,049	0,604	0,653	
	(0,048 a 0,060)	(0,029 a 0,036)				
1:4	0,030	0,048	0,027	0,890	0,917	
	(0,026 a 0,034)	(0,041 a 0,055)				
0:5	...	0,054 (0,052 a 0,055)	...	...	...	

- a) CE_{50} : Concentração efetiva em 50%;
b) IC 95%: Intervalo de confiança de 95%;
c) CIF: Concentração Inibitória Fracionada;
d) ΣCIF .

Figura 21 - Isobolograma obtido a partir dos valores de CIF da combinação entre Pentamidina (eixo x) e Anfotericina B (eixo y) no tratamento de amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* (La M2269). Os pontos P1, P2, P3, P4, P5 e P6 representam as combinações nas seguintes proporções 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, e 0:5, respectivamente.

Figura 22– Curvas de dose-resposta obtidas pela combinação de pentamidina com anfotericina B no tratamento de amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* (La M2269).

De acordo com a média da ΣCIF (**Tabela 7**) podemos classificar a interação entre PMD e ANFO B como indiferente, entretanto, notamos que na proporção 4:1 (PMD/ANFO B) a interação foi sinérgica e que a ΣCIF foi de 0,54 para proporção de 3:2, valor próximo ao considerado sinérgico.

6 DISCUSSÃO

Falhas terapêuticas e resistência aos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são evidenciadas há várias décadas ^{36, 80}. Mesmo assim, o arsenal de fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses ainda se baseia principalmente no uso de antimonial pentavalente, anfotericina B e pentamidina ^{8, 27, 36}. Desde então, novas abordagens vêm sendo estudadas e com isso, diversos mecanismos de resistências foram identificados em *Leishmania* ^{30, 52, 53}. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que parasitas resistentes a pentamidina poderiam apresentar esse fenótipo associado ou não à amplificação e superexpressão do gene PRP1 ^{48, 54}. O gene PRP1 (Pentamidine Resistance Protein 1) é um transportador de membrana da família ABC que está associado ao efluxo de fármacos. Em parasitos transfectados superexpressores desse gene foi identificado o aumento do efluxo da pentamidina para fora da mitocôndria, local alvo da ação desse fármaco. Foi demonstrado por Coelho *et al.* ^{48, 54, 55}, que a resistência à PMD poderia ser revertida em parasitos de La PRP1 após a associação de PMD a 20µL de verapamil, diminuindo a CE₅₀ de PMD de 2,46 ± 0,34µg/mL para 0,63 ± 0,07 µg/mL. Parasitos mutantes da linhagem La PEN 0,5 obtidos por pressão seletiva com PMD não expressores do gene PRP1 também tiveram seu fenótipo de resistência revertido quando tratados com a associação desses fármacos apresentando uma diminuição dos valores de CE₅₀ de 3,3±1,25µg/mL para 1,54±0,11µg/mL de PMD. Esses dados indicaram maior atividade da pentamidina quando associada ao verapamil do que quando aplicada individualmente.

Com base nesses dados, descrevemos no presente estudo a análise *in vitro* da interação da pentamidina combinada com verapamil e com outros fármacos com atividade leishmanicida contra parasitos sensíveis e resistentes a pentamidina,

visando um melhor entendimento do efeito da interação desses fármacos em associação, para prospectiva utilização no tratamento das leishmanioses.

Inicialmente, parasitos resistentes a pentamidina da linhagem transfectada La PRP1 e parasitos mutantes da linhagem La PEN 0,5 foram infectados em camundongos Balb/c e recuperados após 45 dias de infecção. As formas promastigotas foram submetidas ao tratamento com concentrações crescentes de PMD. Verificamos que os valores de CE_{50} determinados aqui (**Tabela 1**), foram inferiores aos valores descritos por Coelho *et al.* ⁴⁸ para essas linhagens, no entanto as razões de resistências foram semelhantes. Uma das possíveis justificativas para essa diminuição é a ausência da pressão seletiva. Em ambos os casos, tanto em parasitos transfectados com o gene PRP1, quanto parasitos mutantes, a exposição constante ao fármaco permite maior estabilidade do fenótipo de resistência. No caso da linhagem transfectada com o gene PRP1 (que confere resistência a PMD) inserido no plasmídeo pSNBR/8kb *SmaI*-A, , apresenta marcadores de resistência à ampicilina e à neomicina, que possibilitam a seleção dos parasitos transfectados, promovendo a amplificação e superexpressão do gene que codifica a proteína de resistência a PMD sem a exposição ao fármaco original. Já no caso de parasitos mutantes, não sabemos ao certo por qual mecanismo ocorre à resistência à PMD, apesar de ter sido demonstrado que a ausência de estímulo por períodos longos provoca a diminuição da resistência ⁵⁴.

Deste modo, depois de confirmada a resistência à PMD, tanto parasitos selvagens quanto parasitos resistentes, foram submetidos às análises de interação com os fármacos. Para isso, utilizamos neste estudo o método de isoblograma modificado para analisar os possíveis efeitos gerados pelas interações entre as combinações terapêuticas propostas ^{62, 75}. O método de isoblograma descrito por Loewe ⁷²⁻⁷⁴ está bem estabelecido no estudo de combinações terapêuticas. Com ele

podemos definir os possíveis efeitos gerados ao se combinar diferentes fármacos, porém não podemos definir por quais mecanismos de ação esses efeitos ocorrem ⁶¹.

Para avaliar os tipos de interações resultantes para todas as combinações nos baseamos na definição descrita por Odds⁷⁶. Com base nessas definições, ao analisarmos os valores de CIF, consideramos que a interação gerada pela combinação de pentamidina com verapamil nos experimentos realizados com as linhagens La M2269, La PRP1 e La PEN 0,5 (**Tabela 5**) foi indiferente. Utilizando esta mesma abordagem, Reimão *et al.*⁵⁹ demonstraram que a associação de pentamidina com diferentes bloqueadores de canais de cálcio contra promastigotas de *L. (L.) infantum* também geraram interações indiferentes, o que corrobora os resultados aqui apresentados.

Diante deste fato, decidimos ampliar um pouco nossos dados e combinar a pentamidina com a anfotericina B e com a miltefosina. A escolha da ANFO B se baseou nas baixas concentrações utilizadas em experimentos *in vitro* descritos na literatura para diversas espécies de *Leishmania*, tanto na forma de promastigota, quanto na forma amastigota ^{59, 67- 69}. Já a utilização da miltefosina, foi embasada no fato deste fármaco ter se mostrado promissor contra leishmaniose e por ser o único fármaco atualmente administrado por via oral, bem como pelo fato de já existirem alguns estudos clínicos que utilizam essa combinação ^{27, 65}.

Assim, quando associamos pentamidina com anfotericina B, vimos que as interações também foram classificadas como indiferentes a partir da análise da média da Σ CIF, sendo: 1,18 para La M226, 1,05 para La PRP1 e 1,07 para La PEN 0,5 (**Tabela 5**).

Quando associamos PMD/MILTE contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes a PMD, notamos mais uma vez ausência de interação, como observado ao associar a PMD a outros fármacos (**Tabela 5**).

A combinação de pentamidina com miltefosina *in vitro*, mesmo não sendo sinérgica contra promastigotas, não implica em um impedimento para seu uso. Tanto que, já tem sido aplicada na clínica médica, e alguns estudos relataram bons resultados. Soto *et al.* ⁶⁵, por exemplo, mostraram que ao associar miltefosina por via oral com pentamidina intralesional no tratamento de pacientes com LC causada por *L. (V.) brasiliensis* um aumento na taxa de cura (92%), foi verificada quando comparada à taxa de cura de 70% e 81% para monoterapia com PMD e MILTE, respectivamente.

Embora não tenhamos encontrado sinergismo entre as combinações de pentamidina em associação com os demais fármacos no tratamento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* notamos que a natureza da interação entre os fármacos combinados para esse estudo não foi influenciada pelos diferentes níveis de suscetibilidades expressos pelos valores de CE_{50} de PMD (**Tabela 2, 3 4**) definidos para as linhagens analisadas. Além disso, de acordo com Tallarida ⁸¹ quando a combinação entre dois fármacos resulta em uma interação indiferente, significa que baixas concentrações de ambos os fármacos produzirão efeito semelhante aos obtidos quando estão isolados. A análise das associações entre fármacos contra formas promastigotas é o primeiro passo no estudo em busca de novas alternativas terapêuticas. A ausência de sinergismo, não anula que essa combinação possa ser avaliada em amastigotas, em outras linhagens ou espécies de *Leishmania*.

Seguindo essa premissa, decidimos então determinar o efeito da interação da pentamidina associada ao verapamil e a anfotericina B contra amastigotas intracelulares, para isso, inicialmente precisávamos saber: 1) se MDMO seriam tolerantes a diferentes concentrações de PMD, 2) se as linhagens modificadas seriam capazes de infectar os MDMO e 3) se a PMD seria ativa isoladamente nessas culturas de *Leishmania*.

Deste modo, macrófagos derivados de medula óssea foram expostos a concentrações crescentes de PMD por 24 horas para determinação da citotoxicidade. Após esse período, vimos que a CC_{50} de PMD em macrófagos não infectados foi de 29,1 μ M, sugerindo assim, que macrófagos quando não infectados apresentam maior tolerância a pentamidina do que quando infectados. Nossos resultados concordam com os dados apresentados por Mbongo *et al.*⁸² que mostram que macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c não infectados toleraram maior concentração de PMD (30 μ M) que macrófagos infectados (20 μ M). Em um estudo realizado na Etiópia, imagens de microscopia eletrônica foram obtidos de biópsia de dois pacientes infectados com parasitos de *Leishmania* tratados com pentamidina, e mostraram que apesar da pentamidina ser parcialmente ativa contra os parasitos, a toxicidade desta, afetava tanto as células infectadas quanto as não infectadas, o que justificaria os efeitos colaterais aos quais este fármaco é associado⁸³.

Mostramos ainda que apesar de todas as linhagens de *L. (L.) amazonensis* terem sido capazes de infectar os macrófagos (**Figura 13**), a porcentagem de macrófagos infectados, bem como o número de parasitos por macrófagos foi maior em células infectadas por parasitos selvagens (La M2269) do que em células infectadas por parasitos das linhagens modificadas (La PRP1, La pSNBR e La PEN 0,5) (**Figura 14 e 15**). Resultados semelhantes foram citados anteriormente por Kaur e Rajput³¹, que observaram que a diminuição da infectividade em parasitos resistentes a antimônio pode estar relacionada ao número de passagens e aos processos aos quais os parasitos foram submetidos para obtenção da resistência *in vitro*. No entanto, neste mesmo estudo, foi observado que os parasitos resistentes isolados de paciente eram mais virulentos do que as linhagens obtidas em laboratório, o que pode estar associado a presença de proteínas de membrana presentes nestes parasitos que são derivadas de células hospedeiras que quando

isolados, se perdem ao longo do tempo, devido as manipulações as quais são submetidos sob cultivo.

Após determinarmos a CC_{50} da PMD em macrófagos e padronizarmos a proporção de parasitos/célula iniciamos o tratamento das células infectadas. Assim, amastigotas intracelulares de La M2269 foram tratadas com concentrações de 5 a 17,5 μ M de PMD por até 72 horas. Através da análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão, vimos que macrófagos não infectados e expostos a 7,5 μ M de pentamidina por 24 horas (**Figura 19 B**) apresentaram alterações na membrana celular e no núcleo. Quando infectados e tratados com 7,5 e 15 μ M (**Figura 19 D e F**), o efeito citotóxico da PMD foi evidente, provocando a destruição citoplasmática e lise da membrana celular, diferentemente do que foi demonstrado por Langreth *et al.* ⁸⁴, que não observou alterações em macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com amastigotas de *L. tropica* e expostos a 0,03 μ g/mL de PMD por 3 dias. Entretanto nesse mesmo estudo foi demonstrado que, amastigotas apresentaram alterações ultraestruturais após serem expostos à PMD, com citoplasma e organelas afetadas, o que é similar ao que vimos quando expusemos macrófagos infectados a 7,5 μ M de PMD. Observamos também, que houve desintegração do DNA do cinetoplasto e inchaço da mitocôndria semelhante ao observado por Croft e Brazil ⁴³ em amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e tratados com 10 μ M por 24 horas.

Quanto a sua atividade, foi observada baixa atividade da PMD em concentrações próximas a tolerada pelo macrófago, mantendo a porcentagem de células infectadas superior a 80% para todas as concentrações usadas em períodos de incubação de até 72 horas (**Figura 17 e 18**). Berman e Wyler ⁸⁵ mostraram que concentrações de 0,05 - 0,5 μ g/mL de PMD, foram capazes de eliminar cerca de 80-95% das amastigotas de *L. (L.) tropica* e *L. (L.) donovani*, respectivamente, em 6 dias de exposição. Sugerindo então, que diferente do que tínhamos observado, que ao

aumentar tempo de exposição, baixas concentrações de PMD poderiam se tornar mais ativas.

Deste modo, prorrogamos o tempo de incubação para 120 horas e posteriormente avaliamos o efeito da associação da PMD com o verapamil e também com anfotericina B. Seguindo o protocolo descrito por Seifert *et al.* ⁶⁷, combinamos PMD com VERA no tratamento de macrófagos infectados com parasitos de La M2269 com incubação por 120 horas. Percebemos, após analisar os dados obtidos, que não era possível estabelecer os valores de CE₅₀ de PMD e VERA contra amastigotas intracelulares para essa combinação, pois ambos os fármacos apresentaram baixa atividade contra os parasitos. Segundo Chou ⁶⁴, quando um dos fármacos não é ativo, os valores de CE₅₀ não podem ser determinados e, por conseguinte os valores de CIF também não. Por esse motivo, não conseguimos estabelecer a natureza da interação entre a pentamidina e o verapamil pelo método de isoblograma, já que o verapamil mostrou-se pouco ativo contra amastigotas intracelulares. Então, para tentar compreender o possível efeito da interação da PMD com o VERA construímos gráficos de barras (**Figura 20**) para cada combinação e por meio destes notamos que quando comparados aos resultados apresentados na **Figura 17**, que ao prorrogar o tempo de exposição a PMD para 120 horas, que concentrações inferiores a 1µM de PMD foram mais ativas contra amastigotas intracelulares (**Figura 20 – Comb 1**). Em macrófagos infectados e tratados com VERA, notamos que verapamil não mostrou atividade contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em concentrações não tóxicas aos macrófagos (**Figura 20 – Comb 6**) e que, quando combinados, a associação de PMD/VERA (**Figura 20 – Comb 2, Comb 3, Comb 4 e Comb 5**) mostrou menos atividade do que PMD quando utilizada isoladamente (**Figura 20 – Comb 1**), sugerindo assim um possível efeito indiferente/ antagônico. Contudo é importante ressaltar que o aspecto dos macrófagos infectados bem como não infectados, após a exposição a baixas concentrações dos fármacos quando

combinados foi melhor do que o aspecto das células quando tratadas apenas com PMD.

Por último, decidimos associar baixas concentrações de pentamidina a baixas concentrações de anfotericina B, visto que em promastigotas de La M2269, mesmo resultando em uma interação indiferente, a adição de anfotericina B propiciou a redução nos valores de CE_{50} de PMD quando combinadas em diferentes proporções. Também optamos por essa combinação por não termos encontrado nenhum dado na literatura que descrevesse essa associação em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*. Um dos poucos dados encontrados na literatura relatando a associação entre PMD e ANFO B são os estudos de Afeltra *et al.*⁸⁶ e Brilhante *et al.*⁸⁷ que demonstraram que associação entre pentamidina e anfotericina B contra fungos *Scedosporium prolificans* e *Sporothrix* spp. produziram efeito sinérgico. No entanto, ressaltam que essa associação *in vivo* necessita de acompanhamento, devido à toxicidade de ambos os fármacos. Diferentemente, dos dados apresentados em ambos estudos, contra amastigotas de La M2269 a associação de PMD com ANFO B, resultou em uma interação indiferente.

Outras combinações terapêuticas contra amastigotas intracelulares já foram realizadas anteriormente e demonstraram sinergismo. No estudo realizado por Seifert *et al.*⁶⁸ foi demonstrado que a associação de sitamaquina e pentamidina foi sinérgica contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani*. Teixeira *et al.*⁷¹ observou sinergismo ao associar paromomicina com miltefosina e com anfotericina B contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*.

Há uma infinidade de fatores que podem estar relacionados ao desfecho de uma boa resposta terapêutica, tais como: aptidão do parasito e a eficiência da resposta imune do hospedeiro. Existem também fatores relacionados à efetividade e a toxicidade dos fármacos empregados, que podem propiciar uma baixa adesão e o surgimento de parasito resistente. Embora tenhamos mostrado aqui que a PMD se

apresentou pouco ativa contra amastigotas intracelulares, ainda existem grupos de pesquisa que a empregam em estudos clínicos, visto que economicamente, a utilização deste fármaco seria mais viável do que dos demais fármacos empregados contra leishmanioses ^{33, 40-42, 65, 66}. Então, os benefícios relacionados combinação terapêutica podem ser uma possibilidade para aumentar a atividade da PMD e, por conseguinte o seu uso na clínica médica.

Mesmo que as associações aqui propostas tenham gerado interações indiferentes, tanto contra promastigotas, quanto contra amastigotas, esses resultados não impossibilitam que essas combinações possam ser avaliadas em outras espécies de *Leishmania*. Interações indiferentes resultantes da associação de dois ou mais fármacos não necessariamente refletem em uma maior atividade desses fármacos quando combinados. Essas associações podem apresentar menor capacidade de seleção de parasitos resistentes bem como aumentar a vida útil dos fármacos. Podem também gerar regimes de tratamento menos evasivos aos pacientes, além de ser uma alternativa para o reposicionamento de fármacos disponíveis no mercado, diminuindo assim, o tempo e o custo gerado com a produção de novos fármacos. Desta maneira, os benefícios relacionados à terapia combinada podem claramente causar um grande impacto social e econômico em um país e gerar novas perspectivas para o melhoramento da política de tratamento para as doenças infecciosas como um todo.

7 CONCLUSÕES

- a) Os parasitos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* resistentes a pentamidina mantiveram o fenótipo de resistência após serem recuperadas de lesão de camundongos Balb/c;
- b) Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* suscetíveis e resistentes a PMD quando tratados com pentamidina em associação ao verapamil, a anfotericina B e miltefosina geraram interações indiferentes quando analisadas pelo método de isoblograma;
- c) A classificação da natureza da interação resultante das combinações terapêuticas propostas foi independente ao grau de suscetibilidade a pentamidina entre os parasitos das diferentes linhagens;
- d) Promastigotas das linhagens transfectadas (La pSNBR e La PRP1) apresentaram menor capacidade de infecção em macrófagos quando comparados aos parasitos da linhagem mutante La PEN 0,5 e linhagem selvagem La M2269;
- e) A pentamidina apresentou baixa atividade contra amastigotas intracelulares de La M2269 em períodos de até 72 horas e essa atividade aumentou após 120 horas de incubação;

- f) A combinação de baixas concentrações de pentamidina com baixas concentrações verapamil geraram um efeito indiferente/ antagônico contra amastigotas intracelulares de La M2269, no entanto melhoraram os aspectos das células hospedeiras;
- g) A associação da pentamidina com a anfotericina produziu uma interação indiferente contra amastigotas intracelulares de La M2269.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dedet JP. Current status of epidemiology of Leishmaniasis. In: Farrel PJ. Leishmania. World Class Parasites. Springer. 2002;4:1-10.
2. World Health Organization. Epidemiology situation. [citado 2019 jan 7] Geneva: WHO; 2017 Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
3. Center for Disease Control and Prevention. Neglected Tropical Diseases. Which diseases are considered Neglected Tropical Diseases? [citado 2018 mar 7] Disponível em: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>
4. Gil EC, Cunha LC, Paula JR, Bezerra JCB, Aguiar FA. Leishmaníase: Arsenal terapêutico e alvos moleculares. Rev Elet Vita et Sanitas (FUG. Online). 2007;1:90-115.
5. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data - Leishmaniasis - Situation and trends. [citado 2019 jan 7] Disponível em: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
6. den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect. 2011;17(10):1471-7.
7. Alvar 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
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde: 2017.
9. Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude 2010;1(2):13-32.

10. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. [citado 2019 jan 7] Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
11. Sundar S, Chakravarty J. Visceral Leishmaniasis. In: Ponte-Sucre A, Padrón-Nieves M. Drug resistance in *Leishmania* parasites: Consequences, molecular mechanisms and possible treatments. 2nd ed. Venezuela: Springs; 2018.159-76.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. [citado 2019 jan1] Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>.
13. Laurenti, M. D. Patologia e patogenia das leishmanioses. [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial /Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
15. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(4): 419-33.
16. Goto H, Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):293-307.
17. Teixeira FS. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. Gaz Med Bahia 2009;79 (Supl.3):25-9.
18. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Control of visceral leishmaniasis in Somalia: achievements in a challenging scenario, 2013–2015. 2017; 38(92): 557–572. [Citado 2018 jan 7] Disponível em: <http://www.who.int/wer/2017/wer9238/en/>
19. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 [Citado 2019 jan 7] Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

20. World Health Organization - Global Health Observatory data repository - Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported. Data by country [Citado 2018 out 24] Disponível em:
<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>.
21. Rey L. *Leishmania* e Leishmanioses: Os Parasitos. In: Rey L. Parasitologia. 2º ed. Rio de Janeiro. Guanábana Koogan; 1991.1983-191.
22. de Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):2069-80.
23. Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharm Res*. 2011;28(11):2758-70.
24. Cavalcanti DP, Souza W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning* 2018; 2018:9603051.
25. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496): 1561-77.
26. Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy- challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1478- 83.
27. Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 2018;145(4):464-80.
28. Pittella JEH. The remarkable pioneering contribution of Gaspar Vianna to the study of the neuropathology of Chagas disease. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2018;76(12):853-6.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. [citado 2018 abr 1] Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf
30. Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(2):167-76.

31. Kaur G, Rajput B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. J Parasitol Res. 2014;2014:726328.
32. Demicheli C, Frezard F. Pentavalent antimonials: from chemistry to the design of news drugs. Drug Design Reviews. 2005;2(3):243-9.
33. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Junior RMS, Guerra JAO, Ferreira LCL, *et al.* Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*, Manaus. An Bras Dermatol. 2011;86(6): 1092-101.
34. Brajtburg J, Bolard J. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. Clin Microbiol Rev. 1996;9(4):512-31.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: Brasília: Ministério da Saúde, 2016. [2018 abril 1] Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf
36. Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis. 2002;15(6):593-8.
37. Papadopolou B, Kündig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. Drug Resist Updat. 1998;1(4):266-78.
38. Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. J Assoc Physicians India. 1991;39(4):314-6.
39. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):111-26.
40. Pimentel MI, Baptista C, Rubin EF, Ferreira e Vasconcellos CE, Lyra MR, Salgueiro MM, *et al.* American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44(2):254-6.

41. Gadelha EPN. Estudo piloto para avaliar a eficácia e segurança da pentamidina em aplicação única, de 07 mg/kg, no tratamento da leishmaniose cutânea. [dissertação] Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Viera Dourado; 2012.
42. Gadelha EPN, Ramasawmy R, da Costa Oliveira B, Morais Rocha N, de Oliveira Guerra JA, Allan Villa Rouco da Silva G *et al.* An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006850.
43. Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis - a systematic review with a meta-analysis. Int J Dermatol. 2008;47(2):109-24.
44. Lai A Fat EJSK, Vrede MA, Soetosenojo RM, Lai A Fat RFM. Pentamidine, the drug of choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Surinam. Int J Dermatol. 2002;41(11):796-800.
45. Croft SL, Brazil RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. Ann Trop Med Parasitol. 1982;76(1):37-43.
46. Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett PM. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(12):3731-38.
47. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barret MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol. 2006;145(1):1-10.
48. Coelho AC. Papel do transportador ABC PRP1 na resistência à pentamidina em *Leishmania spp.* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas; 2007.
49. Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. Isolation of genes mediating resistance inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. J Bio Chem. 1999;274(53):37723-30.
50. Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Grondin K, Dou D, et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. Mol Biochem Parasitol. 1994;67(1):49-57.

51. Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA in an intracellular metal-thiol transporter ATPase. J Biol Chem. 2001;276(28):26301-7.
52. Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drugs resistance in parasites. Trop Med Int Health. 2001;6(11):874-82.
53. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resist Updat. 2004;7(4-5):257-66.
54. Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol. 2003;130(2):83-90.
55. Coelho AC, Gentil LG, Silveira JF, Cotrim PC. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. Exp Parasitol. 2008;120(1):98-102.
56. Charlton RL, Rossi-Bergmann B, Denny PW, Steel PG. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. Parasitology. 2018;145(2):219-236.
57. Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2014;4(2):95-111.
58. Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. N Engl J Med 1999;341(19):1447-57.
59. Reimão JQ, Tempone AG. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(8):1032-8.
60. Neal RA, van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83(2):197- 8.
61. Berenbaum MC. What is synergy? Pharmacol Rev. 1989;41(2):93-141.
62. Tallarida RJ. Drug Synergism: Its Detection and Applications. J Pharmacol Exp Ther. 2001;298(3):865-72.

63. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4097-102.
64. Chou TC. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-6.
65. Soto J, Soto P, Ajata A, Rivero D, Luque C, Tintaya C, *et al*. Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for *Leishmania braziliensis* - Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(5):1153-5.
66. Gomes MAF, Medeiros LLC, Lobo FPD, Wanderley NRS, Matos APR, Jácome TDN, *et al*. Combination therapy with liposomal amphotericin b (ambisome), n-methylglucamine antimoniate (glucantime), and pentamidine isethionate in a refractory visceral leishmaniasis case. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(3):393-6.
67. Seifert K, Croft SL. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):73-9.
68. Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(4):850-4.
69. Trinconi CT, Reimão JQ, Yokoyama-Yasunaka JK, Miguel DC, Uliana SR. Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2608-13.
70. Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC, Uliana SR. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(5):1314-22.
71. de Moraes-Teixeira E, Gallupo MK, Rodrigues LF, Romanha AJ, Rabello A. *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(1):150-4.
72. Loewe S. Die mischiamei. *Klin Wochenschr*. 1927;6:1077-85.

73. Loewe S. Die quantitativen probleme der pharmakologie. *Ergebn Physiol.* 1928;27:47-187.
74. Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung.* 1953;3:285-90.
75. Tallarida RJ. Revisiting the Isobole and Related Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(1):2-8.
76. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1.
77. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010;15(1):68-76.
78. Marim FM, Silveira TN, Lima DS, Zamboni DS. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. *PLoS One.* 2010;5(12):e15263.
79. Sesso A, Yamashiro-Kanashiro EH, Arruda LB, Kawakami J, Higuchi ML, Orii NM, et al. Bacteria arise at the border of mycoplasma-infected HeLa cells, containing cytoplasm with either malformed cytosol, mitochondria and endoplasmic reticulum or tightly adjoined smooth vacuoles. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2017;59:e84.
80. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006052.
81. Tallarida RJ. Drug Combinations: Tests and Analysis with Isoboles. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016;72:9.19.1-19.
82. Mbongo N, Loiseau PM, Craciunescu DG, Robert-Gero M. Synergistic effect of Ir-(COT)-pentamidine alizarin red and pentamidine, amphotericin B, and paromomycin on *Leishmania donovani*. *Acta Trop.* 1998;70(2):239-45.
83. Zaar K, Wunderlich F, Belehü A. Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The diffuse form and its treatment with pentamidine. *Ann Trop Med Parasitol.* 1982;76(6):595-605.

84. Langreth SG, Berman JD, Riordan GP, Lee LS. Fine-structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs *in vitro*. J Protozool. 1983;30(3):555-61.
85. Berman JD, Wyler DJ. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. J Infect Dis. 1980;142(1):83-6.
86. Afeltra J, Dannaoui E, Meis JF, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. *In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(10):3323-6.
87. Brilhante RS, Pereira VS, Oliveira JS, Lopes RG, Rodrigues AM, Camargo ZP, *et al.* Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. Future Microbiol. 2018;13:1129-40.

9 ANEXO

Carta de Aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

Ilmo(a)
Dr(a). Paulo Cesar Cotrim
 (aos cuidados de Mariane Pereira Brito)

São Paulo, 06 de Maio de 2016

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da eficácia da associação Pentamidina - Verapamil no tratamento da infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis in vitro e in vivo.**", protocolo nº 000334A, sob a responsabilidade de **Paulo Cesar Cotrim** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 01/06/2016 a 01/06/2018							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	BALB/c	6 a 8 semanas	25 gramas	a ser Coletado	50	0	50
Origem: Biotério - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo					TOTAL	50	

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
 Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Mellores Jaguaribe Ekman
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP