

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento de uma metodologia semi-
automatizada para busca de novas drogas utilizando
Leishmania amazonensis fluorescente**

por

Marcele Neves Rocha

**Belo Horizonte
Fevereiro/2013**

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento de uma metodologia semi-
automatizada para busca de novas drogas utilizando
Leishmania amazonensis fluorescente**

por

Marcele Neves Rocha

**Tese apresentada com vistas à obtenção do Título
de Doutor em Ciências da Saúde na área de
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

**Belo Horizonte
Fevereiro/2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R672d 2013	Rocha, Marcele Neves. Desenvolvimento de uma metodologia semi-automatizada para busca de novas drogas utilizando <i>Leishmania amazonensis</i> fluorescente / Marcele Neves Rocha. – Belo Horizonte, 2013. XVI, 88 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: 83 - 104 Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. Leishmaniose/quimioterapia 2. <i>Leishmania</i> /parasitologia 3. Transfecção/instrumentação 4. Fluorimetria/métodos I. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação). CDD – 22. ed. – 616.936 4
---------------	--

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Desenvolvimento de uma metodologia semi-automatizada para busca de novas drogas
utilizando *Leishmania amazonensis* fluorescentes**

por

Marcele Neves Rocha

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (Presidente)

Profa. Dra Silvane Maria Fonseca Murta

Profa. Dra. Luzia Helena Carvalho

Profa. Dra. Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva

Suplente: Profa. Dra. Juliana Alves da Silva

Tese defendida e aprovada em: 21/02/2013

Agradecimentos

À Deus, por permitir viver e desenvolver este trabalho que possa, em algum momento, melhorar a vida das pessoas que sofrem com a Leishmaniose.

À minha família, que sempre esteve presente em todos os momentos dando apoio incondicional. À minha mãe Maria Rosalina que é o pilar da família. Aos meus irmãos, Michel, Marcel e Michela pelo amor e carinho. Sempre apoiando e incentivando para seguir em frente.

Ao meu namorado Eduardo que motivou, incentivou, cuidou, e sua família que me aceitou com grande carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr^o. Rodrigo pela competência profissional e valiosa orientação. Por compartilhar conosco todo o seu conhecimento além de todo apoio frente aos resultados obtidos com este trabalho. Contribuiu enormemente para o meu amadurecimento científico. Minha gratidão, admiração e respeito.

Aos laboratórios por onde andei pelos empréstimos, trocas e convivência nesta jornada.

Aos amigos de pós-graduação pelo apoio (Alessandra, Bruno, Carol Cunha, Fabiana, Izabela, Junara, Rafael, Paula, Vanessa) que sempre estiveram presentes, e me suportaram em todos os momentos. E com certeza fizeram a diferença nas reuniões no CDF proporcionando momentos de descontração.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) que me acolheu com muito carinho. À Dra Tania Alves que abriu as portas deste laboratório para que eu pudesse finalizar meus ensaios. Em especial à Dra Caryne pelas discussões e trocas de experiências. A todos os membros do laboratório peço desculpas por não ter ajudado como eu gostaria, mas obrigado pelo convívio e eterno aprendizado.

Em especial a Dr^a Carina e Ana Paula pela amizade, apoio, partilha de vida e principalmente aconselhamentos. E por acreditar que tudo seria possível.

Aos colaboradores que nos enviaram as substâncias para testar. Sem elas nosso trabalho não teria ganho a proporção que ganhou. A querida professora Maria Norma de Melo pelas reuniões e por compartilhar sua enorme experiência no mundo das Leishmanioses.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pelo apoio estrutural e financeiro.

À Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pela disponibilidade deste curso.

As agências financiadoras: FAPEMIG – PRONEX e CNPq pela minha bolsa.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À Dr^a Ana Paula Madureira pela ajuda nas análises estatísticas e ao Dr^o Olindo Assis no citômetro de fluxo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me acompanharam durante a realização deste trabalho, por proporcionarem um ambiente de estímulo, amor, partilha, respeito e seriedade. Por me ajudarem a converter toda a grandiosidade de cada minuto, cada pensar e agir, nesta tese que guarda muito mais do que sua valiosa contribuição científica, a minha realização profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURA E SIMBOLOS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 As Leishmanioses.....	17
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	18
1.3 Leishmaniose Visceral.....	21
1.4 Controle das Leishmanioses.....	22
1.5 Fármacos disponíveis para o Tratamento.....	25
1.5.1 Antimoniais Pentavalentes.....	27
1.5.2 Anfotericina B.....	29
1.5.3 Miltefosina (hexadecilfosfocolina).....	32
1.6 Descoberta de novas drogas contra <i>Leishmania</i>	35
1.7 Teste microscópico clássico.....	37
1.8 Genes Repórteres.....	38
1.8.1 Sistemas colorimétricos.....	38
1.8.2 Sistema luminescentes e fluorescentes.....	39
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivo geral.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Cultura de <i>Leishmania</i> e manutenção.....	45
3.2. Transfecção dos parasitos.....	45
3.2.1. Plasmídeos B5793 e B5947.....	45
3.2.2. Clonagem e produção dos plasmídeos.....	46
3.2.3. Transfecção.....	47
3.2.4. Clonagem de <i>Leishmania</i>	47
3.3. Avaliação da produção de fluorescência por Microscopia.....	47
3.4. Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo.....	48
3.5. Métodos de Triagem de drogas.....	48
	vii

3.5.1. Método clássico por contagem microscópica.....	48
3.5.2. Método fluorimétrico.....	50
3.5.3. Teste de citotoxicidade.....	50
3.6. Síntese dos derivados da diamina.....	51
3.7. Síntese dos derivados do propranolol.....	52
3.8. Síntese dos complexos de lapachol com Antimônio, Bismuto e Estanho.....	53
3.9. Análise estatística.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1. ARTIGO 1.....	56
4.2. ARTIGO 2.....	66
4.3. ARTIGO 3.....	72
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Tipos morfológicos principais encontrados no ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> A) Forma Promastigota e B) Forma Amastigota.....	17
Figura 2:	Distribuição Geográfica das Leishmanioses no Novo Mundo. A) Leishmanioses Cutânea e Mucocutânea. B) Leishmaniose Visceral.....	18
Figura 3:	Esquema dos mecanismos de ação e resistência para o antimônio. A) Mutante resistente ao Sb(III) gerado em laboratório. B) Cepa naturalmente resistente ao Sb(V) de isolado clínico. A entrada do Sb(V) no parasito ocorre por um transportador desconhecido, e Sb(III) através da aquagliceroforina (AQP1). Em A) o nível de tripanotona (TSH) é aumentado devido ao aumento da atividade da ornitina descarboxilase (ODC) e γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS), enzimas limitantes para a biossíntese de tiol. A via de desintoxicação inclui formação de complexos de Sb(III) com o sequestro de TSH e subsequente sequestro via MRPA amplificado e ou por bombas de efluxo desconhecidas. Em B) uma menor expressão de ODC levaria a uma menor biossíntese de tiol, inibindo a ativação de Sb(V). A diminuição da expressão de AQP1 também restringe a entrada de Sb(III) para o parasito. Sb(III) intracelular pode estar envolvida quer por sequestro ou por efluxo conjugados Sb(III)-Tiol. Enquanto que nos macrófagos são conjugados com GSH eliminado por transportadores ABC.....	28
Figura 4:	Mecanismo de ação e resistência da Anfotericina B (A), Miltefosina (B) e Pentamidina (C). Legenda: ATP- adenosina trifosfato, ADP- adenosina difosfato.....	28
Figura 5:	Compostos anti- <i>Leishmania</i> . Os antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metilglucamina (A) e estibogluconato de sódio (B) vêm sendo usados desde a década de 1940. A pentamidina (C) é uma diamina aromática utilizada como segunda linha no combate a LV. A anfotericina B (D) foi originalmente desenvolvida como composto anti-fúngico e é usado no combate a LV por mais de 20 anos. Um análogo éter-lipídico sintético, a miltefosina (E) é uma droga anti- <i>Leishmania</i> com administração oral. A paromomicina (F) é um antibiótico aminoglicosídeo e é usado tanto na LV	

	quanto LC.....	32
Figura 6:	Mapa dos Plasmídeos. A) B5793 piR1Phleo-GFP+(a)(sense) (Rocha, 2009); B) piR1SAT-LUC(a) DsRed2(b) B5947.....	46
Figura 7:	Síntese dos derivados da diamina. A) Estrutura de 9 moléculas sintetizadas. B) Transformação das 9 moléculas protegidas pelo mono- <i>t</i> -butiloxicarbonil (BOC).....	52
Figura 8:	Propranolol e seus derivados. A) Estrutura base para 5 moléculas sintetizadas a partir do propranolol e cada radical inserido no R da estrutura. B) Estrutura base para o restante das moléculas transformado em cloridrato.....	53
Figura 9:	Complexos metálicos com o lapachol. A) Complexo Lapachol e antimônio, B) Complexo Lapachol e bismuto, C) Complexo Lapachol e estanho, D) Complexo cloreto de bismuto, E) Complexo cloreto de antimônio e F) Complexo cloreto de estanho	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses	26
Tabela 2: Outras drogas utilizadas no tratamento	34
Tabela 3: Expressão dos genes repórteres em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> e suas aplicações.....	41
Tabela 4: Resumo dos recentes protocolos para triagens de drogas contra <i>Leishmania</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	= Microgramas
ADP	= Difosfato de adenosina
AmB	= Anfotericina B
ACR2	= Enzima antimônio redutase
AQP1	= Aquagliceroforina
ATP	= Trifosfato de adenosina
Balb/C	= Linhagem de camundongo albino
BCG	= Bacilo de Calmette-Guérin
CAT	= Cloranfenicol acetiltransferase
CEUA	= Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CFP	= Proteína ciano fluorescente (cyan fluorescent protein)
DNA	= Ácido desoxiribonucléico
DsRed	= Proteína oriunda de <i>Discosoma striata</i> vermelha
DsRed2	= Proteína oriunda de <i>Discosoma striata</i> vermelha segunda geração
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
eGFP	= Proteína verde fluorescente melhorada (enhanced)
FACS	= Citometria de Fluxo (Fluorescence-activated cell sorter)
FSC-H	= Parâmetro de tamanho (forward scatter)
FL1	= Canal de fluorescência 1
FL2	= Canal de fluorescência 2
FU	= Unidade de fluorescência
GFP	= Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
GSH	= Glutathione
HepG2	= Linhagem celular de hepatoma humano
HGPT	= Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HIV	= Vírus da imunodeficiência humana
HTS	= Triagem de alto rendimento (high throughput screenig)
IC₅₀	= Concentração inibitória de 50 %
kDNA	= Ácido desoxiribonucléico cinetoplasmático
LC	= Leishmaniose cutânea
LCD	= Leishmaniose cutâneo difusa

LMC= Leishmaniose muco-cutânea
LT= Leishmaniose tegumentar
LTA= Leishmaniose tegumentar americana
LV= Leishmaniose visceral
LV-HIV= Leishmaniose visceral- vírus da imunodeficiência humana
M199= Meio 199
MDR1= Resistência múltipla a drogas
ml= Mililitro
mM= Milimolar
 μM = Micromolar
MLD₅₀= Dose letal média de 50%
MØ= Macrófago
MRP= Proteína de resistência múltipla a drogas.
MTT= Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm= Nanômetro
NMG= Antimoniato de N-metilglucamina
ODC= Ornitina descarboxilase
OMS= Organização Mundial de Saúde
PBS= Tampão fosfato/salina (“Phosphate Buffer Saline”)
P-gp= Glicoproteína P
PH8= identificação da cepa de referência de *L. amazonensis* isolada de *Lutzomyia flaviscutellata*
PKDL= Leishmaniose dérmica pós calazar (“Post-kala-azar dermal leishmaniasis”)
QSAR= Estudos quantitativos de relação estrutura atividade
RFP= Proteína vermelha fluorescente (red fluorescent protein)
RNA= Ácido ribonucleico
RPMI= Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
rRNA= Ácido ribonucleico ribossomal
SAMDC= S-adenosilmetionina descarboxilase
SbIII= Antimonial trivalente
SbV= Antimonial pentavalente
SEAP= Fosfatase alcalina secretada
SFB= Soro Fetal Bovino
SGS= Estibogluconato de sódio

SI= Índice de seletividade

Sin=sinonímia

SSC-H= Parâmetro de granulosidade (*side scatter*)

SSU'= Subunidade pequena do gene RNA no locus do DNA ribossomal (*small subunit RNA gene in rDNA locus*)

SUS = Sistema Único de Saúde

Transportador ABC= Grande família de proteínas de transporte de membrana caracterizada por um domínio de ligação ATP altamente conservado

TDR1= Tripanotiona redutase

THP1= Linhagem celular de leucemia monocítica humana

TSH= Tripanotiona

U= Unidade

WT= Tipo selvagem (*wild-type*)

γ -GCS= γ -glutamilcisteína sintetase

YRP= Proteína amarela fluorescente (*yellow fluorescent protein*)

RESUMO

As Leishmanioses são doenças negligenciadas. O tratamento dos pacientes é a principal medida de controle, porém a quimioterapia das Leishmanioses apresenta dificuldades incluindo: toxicidade dos medicamentos disponíveis, via de administração parenteral e resistência natural de algumas cepas. O método de teste de drogas clássico *in vitro* baseado na contagem microscópica de macrófagos infectados apresenta limitações por ser laborioso, não automatizado e sujeito a variações do observador. Deste modo, a busca por novos métodos de triagem de drogas faz-se necessário. O estabelecimento de métodos semi-automatizados contribuiria para aumentar a eficiência da busca de novas drogas contra *Leishmania*. Neste trabalho, a cepa de *Leishmania amazonensis* (PH8) foi transfectada com a proteína vermelha fluorescente (RFP). Os parasitos transfectados foram avaliados segundo parâmetros celulares e de susceptibilidade aos fármacos leishmanicidas tradicionais e derivados do propranolol. Os parasitos selvagens (WT) e transfectados (RFP) foram analisados pela Citometria de Fluxo e Microscopia de Fluorescência sendo facilmente discriminados por estas técnicas. Em geral, não foram observadas diferenças na susceptibilidade entre as cepas WT e RFP frente às moléculas testadas. Os parasitos RFPs foram submetidos ao teste de drogas com posterior leitura no fluorímetro para a padronização do método fluorimétrico. O método fluorimétrico se mostrou bastante reprodutível em relação ao método clássico. Entretanto, durante a padronização do método, mudanças na concentração das drogas foram necessárias bem como a determinação de um ponto de corte nos valores de IC₅₀. Este trabalho também avaliou a atividade leishmanicida dos derivados das poliaminas e complexos metálicos de lapachol utilizando-se o método clássico. Não só os derivados do propranolol, mas também os das poliaminas e lapachol se mostraram tóxicos para células de Hepatoma humano (HepG2). Este trabalho possibilitou pela primeira vez a utilização de parasitos RFPs como modelo de um teste de drogas semi-automatizado.

ABSTRACT

The leishmaniasis are neglected diseases. Patient treatment is the main control measure, however leishmaniasis chemotherapy faces several problems including: drug toxicity, the administration route and natural drug resistance. Also, the classical *in vitro* drug testing method, which is based on microscopically counting the number of infected macrophages is rather limited, laborious cannot be automated and is subjected to variations due to observer. For this reason, the search for new methods and establishment of semi-automated methods is necessary to improve the efficiency of new drugs discovery. In this present work, *Leishmania amazonensis* strain PH8 was transfected with the red fluorescent protein (RFP). Transfected parasites were evaluated for their cellular parameters and susceptibility against traditional drugs and novel propranolol derivatives. Wild type (WT) and transfected (RFP) parasites were analyzed by flow cytometry and fluorescent microscopy. Overall we did not observe any difference in drug susceptibility between WT and RFP parasites. RFP parasites were then submitted to drug susceptibility test and analyzed by fluorimeter. The fluorimetric method showed a comparable reproducibility to the standard method. However, during experimentation, some adjustments on drug concentrations were necessary to determine IC₅₀ threshold values. Additionally, in this work, we evaluated the activity of polyamine derivatives and (metallic lapachol complexes) against leishmania by the classical method. Propranolol derivatives, polymaine and metallic lapachol complexes were shown to be cytotoxic as shown by HepG2 cell cultures. This work was the first to show the use of RFP parasites as a model for drug screening in a semi-automated method.

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) (Gontijo & Carvalho, 2003). Elas podem ser transmitidas ao homem através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Killick-Kendrick, 1990). Esses protozoários são organismos unicelulares flagelados, cuja característica principal é a presença do cinetoplasto, uma organela junto à base do flagelo que contém sequências repetidas de DNA (kDNA) (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). As *Leishmanias* apresentam-se sob duas formas morfológicas principais: a promastigota (Figura 1A), que apresenta flagelo, é móvel e está presente nos insetos vetores e a amastigota (Figura 1B), que não apresenta flagelo, é imóvel e é encontrada nos macrófagos do hospedeiro vertebrado.

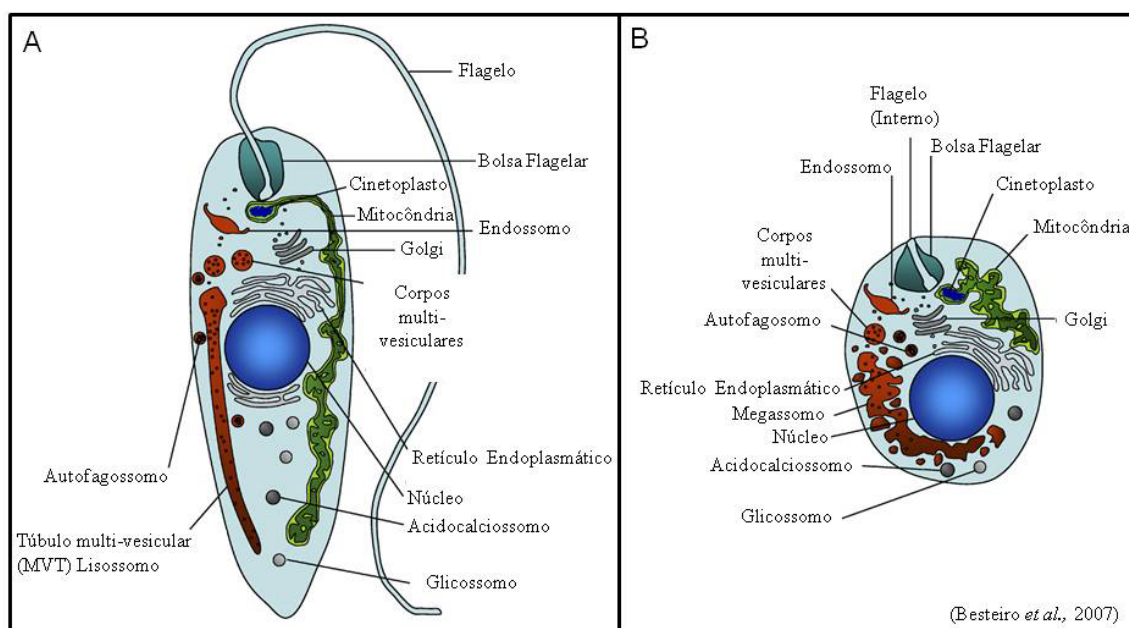


Figura 1: Tipos morfológicos principais encontrados no ciclo evolutivo da *Leishmania*
A) Forma Promastigota e B) Forma Amastigota.

As Leishmanioses são classificadas como doenças negligenciadas que impactam a saúde pública e a economia dos países em desenvolvimento (Desjeux, 2004; Nussbaum *et al.*, 2010). A população mais afetada por essas doenças vive em áreas remotas, rurais, periferias urbanas e zonas de conflito (Yamey & Torreele, 2002). Nas últimas décadas, elas têm se estabelecido nas áreas urbanas e peri-urbanas das grandes cidades, através da adaptação de seus vetores e reservatórios a estes ambientes (Ashford, 2000).

As Leishmanioses possuem ampla distribuição mundial. Estima-se que a doença afete 12 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões vivem em áreas de risco tanto no Novo quanto no Velho Mundo. É dividida em duas formas: a Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). A incidência anual é de aproximadamente 2 milhões de casos, dos quais 500.000 desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhão a forma tegumentar (Alvar *et al.*, 2012; Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005; Nussbaum *et al.*, 2010; WHO, 2011).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

As LTA têm ampla distribuição mundial e são responsáveis por 70-75% dos casos nos países: Afeganistão, Algéria, Colômbia, Costa Rica, Brasil, Etiópia, Irã, Síria, Peru e Sudão Norte (Alvar *et al.*, 2012). No continente americano há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Figura 2A). No Brasil, foram registrados cerca de 15.731 casos no ano de 2011 pelo Sistema de Informação de agravos de Notificação da Sistema de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SINAN/SVS/MS). O coeficiente de incidência foi de 11,1 casos/100.000 habitantes. A região Norte apresenta o maior coeficiente (53,5 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (16 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (14,9 casos/100.000 habitantes) (Brasil, 2012; SUS, 2012 a).

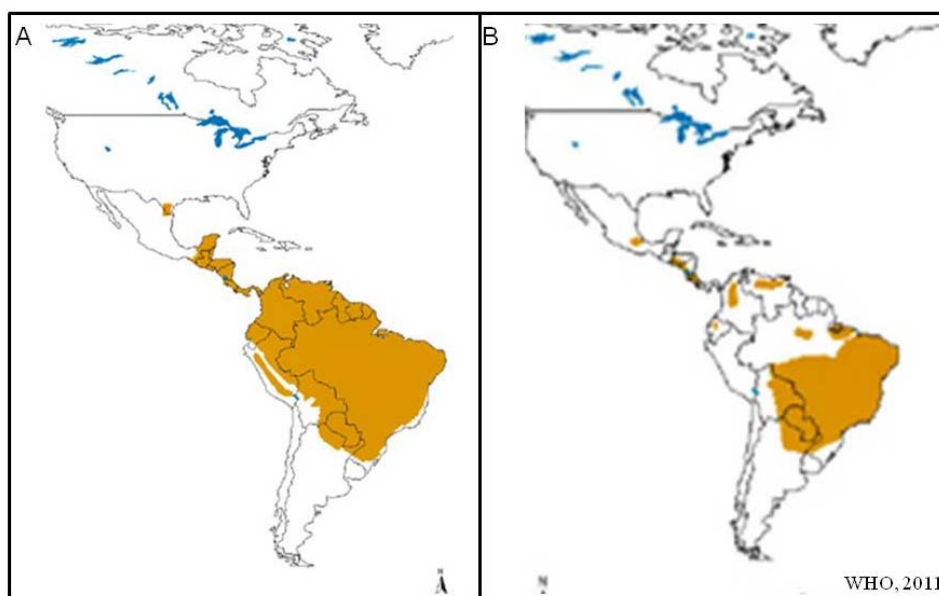


Figura 2: Distribuição Geográfica das Leishmanioses no Novo Mundo.

A) Leishmanioses Cutânea e Mucocutânea. B) Leishmaniose Visceral.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada pelo comprometimento dérmico de caráter polimórfico e espectral da pele e mucosa manifestando

diferentes formas clínicas descritas a seguir: a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM). Outros tipos de manifestação de importância são: a forma disseminada e a forma difusa (Herwaldt, 1999; Ministério da Saúde, 2006a).

A Leishmaniose Cutânea clássica (LC) apresenta úlcera típica indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado. A Leishmaniose Cutânea mucosa (LCM) representa 3 a 5% dos casos de LC que progredirão para a lesão mucosa. Geralmente, a lesão é indolor e destrutiva inicia no septo nasal anterior, que é cartilaginoso e de fácil visualização. A forma clássica de LCM é secundária à lesão cutânea. Acredita-se que a disseminação metastática ocorra por via hematogênica ou linfática. Normalmente, surge após a cura clínica da LC. Tem início insidioso e pouca sintomatologia, a lesão pode curar com ou sem tratamento. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa. Acomete com mais frequência o sexo masculino e faixas etárias mais altas do que a LC. As lesões de pele, próximas aos orifícios naturais, também podem, por contiguidade, invadir as mucosas. Cerca de 15% dos casos também ocorrem sem lesão primária da pele. Em 1% dos casos de forma mucosa, a manifestação pode ser só na laringe. As evidências sugerem que, entre os pacientes com LC que evoluem para LCM, 90% o fazem nos primeiros 10 anos. Desses, 50% ocorrem nos primeiros 2 anos após a cicatrização das lesões cutâneas. O agente etiológico causador da LCM, no Brasil, é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Ministério da Saúde, 2007; Herwaldt, 1999).

A Leishmaniose Difusa é rara, porém grave e desencadeada por infecções causadas por *L. (L.) amazonensis*. Ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento, evolui de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas. Cerca de 350 casos foram descritos na literatura mundial (Barral *et al.*, 1995; Castes *et al.*, 1983; Convit *et al.*, 1972; Costa, 1995; Okelo *et al.*, 1991; Ministério da Saúde, 2006a).

A Leishmaniose Disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme, que acometem vários segmentos corporais, principalmente a face e o tronco. A *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* são as duas espécies reconhecidas como causadoras deste tipo de manifestação. A forma disseminada é relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos. O número de lesões pode alcançar centenas. Posteriormente ao desenvolvimento das lesões primárias, acontece um

fenômeno de disseminação do parasito por via hemática ou via linfática que se estabelece em poucos dias, causando lesões distantes do local da picada. Outros aspectos a serem destacados nessa forma clínica são: o acometimento mucoso concomitante, que tem sido observado em até 30% dos pacientes, e as manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros. A resposta ao tratamento específico apresenta resultados satisfatórios com o uso de antimoniato de meglumina, embora a maioria dos pacientes requeira uma ou mais séries adicionais de tratamento para alcançar a cura clínica (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, já foram identificadas 7 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras da LTA, sendo 6 delas do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*. As 3 principais espécies são:

➤ *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver a Leishmaniose Difusa (Gontijo & Carvalho, 2003). A forma cutânea clássica apresenta distribuição pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Evidências indicam que roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* seriam os reservatórios desta espécie. Os flebotomíneos vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia) (Silveira *et al.*, 1997). Estas espécies são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana, estando associada com atividades ocupacionais ligadas à mata. Seu principal vetor, *L. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes *habitats* de países fronteiriços ao Brasil e nos estados onde estão ocorrendo os casos da doença, principalmente em regiões de matas úmidas em densidades elevadas (Lainson, 1997).

➤ *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi à primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina. Esta espécie está amplamente distribuída em todo país (SUS, 2012a). É caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, e cerca de 3-5% dos casos podem evoluir para a principal complicação que é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos, por isso é classificada como Leishmaniose Mucocutânea (Bittencourt & Barral, 1991; Ministério da Saúde, 2011; Herwaldt, 1999). A frequência desta complicação vem sendo reduzida, provavelmente devido ao diagnóstico e tratamento precoces. Muitos aspectos da eco-epidemiologia desta espécie ainda são

desconhecidos. Seus reservatórios principais incluem roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*). Seus principais vetores incluem *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* dependendo da região (Lainson & Shaw, 1978).

➤ *Leishmania (Viannia) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas como consequência de várias picadas ou metástases linfáticas (Gontijo & Carvalho, 2003). Aparentemente limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas. É encontrada principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas (SUS, 2012 a). É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie, atingindo principalmente indivíduos do sexo masculino em fase produtiva. É de natureza ocupacional relacionada ao desmatamento, penetração em áreas de florestas e exercícios militares. Em áreas endêmicas pode haver percentuais expressivos de crianças acometidas pela doença. Esta espécie já foi isolada de mamíferos silvestres, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*D. albiventris*), tendo sido encontrada na pele e vísceras. Embora o papel desempenhado por estes animais ainda não tenha sido definido, as evidências encontradas indicam que estes seriam os reservatórios. O principal vetor seria *Lutzomyia umbratilis* distribuída nos países fronteiriços ao Brasil e também nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia (Lainson & Shaw, 1978).

1.3 Leishmaniose Visceral

A *Leishmania (L.) infantum* (sin. *L. (L.) chagasi*), é a espécie responsável pela Leishmaniose Visceral (LV) no novo mundo. É a forma mais grave da doença porque se não tratada pode evoluir para o óbito. Na literatura, também já foi relatada a existência de manifestações viscerais causadas por *L. (L.) amazonensis* (Murray *et al.*, 2005). Estima-se que 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clássica desta manifestação e que a grande maioria dos infectados permanecerão assistomáticos pelo resto da vida (Ministério da Saúde, 2011). É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada inicialmente por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia discreta, perda de peso, anemia, e se não tratado o paciente evolui para hepatoesplenomegalia volumosa, persistência de febre, piora da palidez cutâneo-mucosa e emagrecimento progressivo (Chappuis *et al.*, 2007). Os fatores que determinam a gravidade das manifestações clínicas variam de acordo com o tempo de evolução da doença. O período de incubação é em média de três meses. O período final da doença associa-se com infecções bacterianas, desnutrição proteico-energética grave, epistaxe, sangramentos cutâneos

ou digestivos, sendo as infecções bacterianas responsáveis pela maioria dos óbitos (Ministério da Saúde, 2007).

A LV é considerada endêmica em 62 países, sendo prevalente em Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Sudão Sul e Brasil. Anualmente acomete cerca de 0,2 a 0,4 milhões de casos no mundo (Alvar *et al.*, 2012). No continente Americano é encontrada desde o México até Argentina (Figura 2B) e cuja distribuição coincide com a do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Grimaldi *et al.*, 1989; Soares & Turco, 2003). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção, enquanto as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e gambás (*Didelphis albiventris*) são os reservatórios silvestres (Sherlock *et al.*, 1984). Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em áreas rurais e suburbanas economicamente desfavorecidas, particularmente no subcontinente da Índia, Leste da África e Américas Central e do Sul, com o Brasil contribuindo para maior parte dos casos do Novo Mundo (Alvar *et al.*, 2012).

A LV era uma doença restrita às áreas rurais principalmente no nordeste brasileiro. Porém, nos últimos 20 anos, ela avançou para outras regiões e alcançou grandes centros urbanos (Ashford, 2000; Costa *et al.*, 2007; Gontijo & Melo, 2004; Michalsky *et al.*, 2007). Esse processo de periurbanização e urbanização da LV para os municípios de médio e grande porte, não só no Brasil como em outras partes do mundo resultaram em vários surtos como, por exemplo: no Rio de Janeiro (RJ) (Marzochi *et al.*, 2009), Belo Horizonte (MG) (Silva *et al.*, 2001), Araçatuba (SP) (Camargo-Neves *et al.*, 2001), Santarém (PA), Corumbá, Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas, Campo Grande e Palmas (TO) (Brasil, 2011; Gontijo & Melo, 2004).

No Brasil, no ano de 2011 foram registrados 3.894 casos de LV e incidência de 2/100.000 habitantes. Atualmente, a LV ocorre em 21 dos 27 estados brasileiros destacando-se os da região Nordeste, onde ocorrem 47% dos casos notificados. O principal problema da LV é a alta letalidade com 262 (6,7%) óbitos ocorridos no último ano (SUS, 2012 b). Um dos piores índices de letalidade foi registrado no município de Belo Horizonte. Foram notificados 37 casos em 2012, e 9 destes progrediram para óbito, o que resultou uma letalidade de 24% (PBH, 2012).

1.4 Controle das Leishmanioses

O controle das Leishmanioses é bastante complexo em função da diversidade de agentes, reservatórios, vetores e situação epidemiológica, aliadas ao conhecimento insuficiente sobre vários destes aspectos (Ministério da Saúde, 2006a, 2007). Outros fatores

importantes incluem: modificações ambientais ocorridas nas últimas décadas, adaptação dos vetores e reservatórios aos ambientes modificados pelo homem (Gontijo & Carvalho, 2003; Gontijo & Melo, 2004), ausência de uma vacina eficaz (Fernandes *et al.*, 2008), aos medicamentos utilizados no tratamento serem tóxicos (Ouellette *et al.*, 2004) e o surgimento de cepas resistentes ao tratamento como por exemplo: *L. (L.) amazonensis* (Agnew *et al.*, 2001); (do Monte-Neto *et al.*, 2011), *L. (V.) braziliensis* (Souza *et al.*, 2010), *L. (L.) infantum* (sin, *L. (L.) chagasi*) (Inocencio da Luz *et al.*, 2011; Sereno *et al.*, 2001), *L. (L.) donovani* (Kumar *et al.*, 2009). Desta forma, as medidas de prevenção e de controle estão diretamente relacionadas ao diagnóstico precoce e tratamento adequado dos pacientes, bem como a redução do contato homem-vetor, com medidas de proteção individual, controle de reservatórios e aplicação de inseticida, quando indicados (Alvar *et al.*, 2012; Marzochi & Marzochi, 1997).

De acordo com a literatura sabe-se que a transmissão das Leishmanioses é mantida em um complexo sistema biológico que envolve o reservatório animal, o parasito, o vetor flebotomíneo e em algumas situações o hospedeiro humano. Portanto, medidas integradas de controle dos vetores e dos reservatórios bem como tratamento dos casos devem ser adaptadas a cada contexto (WHO, 2010). Por exemplo, as LCs geralmente são transmitidas no ambiente silvestre quando o homem entra na mata para trabalhar. Neste caso a aplicação de inseticidas torna-se inviável sendo a proteção individual mais adequada com o uso de repelentes (Gontijo & Carvalho, 2003; Marzochi & Marzochi, 1997). Já para a LV, que tem aumentado nas grandes cidades, a borrifação tanto do intra como do peridomicílio é necessária principalmente nos canis e galinheiros, que são ambientes propícios à proliferação do vetor (Gontijo & Melo, 2004). Outra medida aplicável, a de eliminação do reservatório doméstico (cão), resulta em desconforto afetivo para as famílias. Esta medida é necessária devido ao fato do animal não responder ao tratamento convencional e ainda, pode tornar-se um foco de transmissão importante. Mesmo com estas medidas a expansão das Leishmanioses, principalmente nas grandes cidades, têm tornado discutível a medida de sacrifício dos cães (Dietze *et al.*, 1997).

Outra medida de controle seria através da administração de vacinas. As vacinas humanas de primeira geração foram desenvolvidas a partir de parasitos mortos ou extratos. Inúmeras tentativas para desenvolver tal vacina foram feitas no Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela e República Islâmica do Irã contra Leishmaniose cutânea e no Sudão contra Leishmaniose visceral. Três candidatos foram testados: vacina de *L. (L.) amazonensis* baseada em derivados de uma versão anterior cinco valente conhecida como vacina Mayrink e depois de parasito único de *L. (L.) mexicana* produzidos na Venezuela e administrado como a BCG

(vacina Convit) (Kohli *et al.*, 1991) e outra produzida na República do Irã, também administrada como BCG (Instituto Razi de Vacina) (Sharifi *et al.*, 1998). Os resultados foram inconclusivos ou negativos para profilaxia, mas tem sido promissores para as indicações terapêuticas (WHO, 2010).

A segunda geração de vacinas consiste em proteínas recombinantes e vacinas genéticas. Muitos antígenos definidos podem proteger os animais experimentais quando usados com adjuvantes, mas até agora apenas uma vacina chamada Leish-111f+MPL-SE chegou a ensaios clínicos. Ela está sendo avaliada para a imunoterapia da Leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL) no Sudão, em ensaios de fases I e II no Peru e em fase de teste I na Índia. (Coler *et al.*, 2007; WHO, 2010).

Com o avanço da biotecnologia novos processos de inovação estão surgindo. Como é o caso da produção de parasitos geneticamente modificados que causariam menor infecção ou doença mais branda. Eles têm mostrado indução da resposta imune quando desafiados em modelos de camundongos. No entanto, é pouco provável que uma vacina profilática esteja disponível dentro dos próximos cinco anos para qualquer forma de Leishmaniose.

Vacinas caninas contra a LV encontram-se em desenvolvimento. No Brasil, atualmente existem duas vacinas sendo comercializadas: a Leishmune®, desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro juntamente com o laboratório Fort Dogde Saúde Animal (Borja-Cabrera *et al.*, 2002) e a Leishtec®, recentemente desenvolvida por grupo da Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com a Hertape Calier Saúde Animal (Fernandes *et al.*, 2008). Essas duas vacinas foram liberadas apenas pelo Ministério da Agricultura após mostrarem uma diminuição promissora da gravidade da doença nos cães. Entretanto, o Ministério da Saúde não recomenda o uso para fins de saúde pública, porque ainda não foram feitos os estudos conclusivos mostrando os potenciais efeitos na diminuição das taxas de transmissão. Os estudos de campo (Fase III e IV) estão em curso para determinar a real eficácia destas vacinas (Evans & Kedzierski, 2012).

Atualmente um agravante para o controle das Leishmanioses são os casos de coinfeção HIV-*Leishmania*. Essa coinfeção é considerada doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Ela já foi relatada em 35 países nos continentes: Africano, Asiático, Europeu e Sul Americano e pode ocorrer tanto na LTA quanto na LV. No sul da Europa, 70% dos casos de Leishmaniose em adultos estão associadas ao HIV e principalmente em usuários de drogas injetáveis, diferentemente do Brasil que apenas 3,6% dos casos apresentam essa associação (Brasil, 2011; Croft & Olliaro, 2011). Nas últimas décadas vem sendo observado o aumento do número de casos de coinfeção e ainda é esperado seu crescimento contínuo, devido à superposição geográfica das duas infecções,

como consequência da urbanização das leishmanioses e da interiorização da infecção por HIV. O Brasil surge como o país que mais requer atenção devido ao grande número de casos das duas infecções (Jarvis & Lockwood, 2013; Saúde., 2006).

1.5 Fármacos disponíveis para o Tratamento

Diante do que foi descrito até momento, é possível concluir que existem inúmeros desafios no controle das Leishmanioses. A ausência, na prática, de uma vacina eficaz e a dificuldade em controlar os vetores e reservatórios ainda constitui um problema geral. Desta forma, o tratamento dos casos humanos ainda constitui a principal ferramenta no controle desta doença. Sabe-se que o arsenal terapêutico para o tratamento das Leishmanioses é extremamente limitado e consiste nos antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), anfotericina B (e suas formulações lipídicas), miltefosina e paramomicina (Alvar *et al.*, 2006). Estas drogas têm grandes desvantagens com relação ao tempo de tratamento necessário que é longo, a injeção é dolorosa, a toxicidade é grave, pode acontecer resistência ao tratamento, é difícil o limite entre a dose eficaz e nefrotóxica, os fármacos apresentam instabilidade térmica, custo elevado do tratamento e baixa adesão dos pacientes (van Griensven *et al.*, 2010). Na tabela 1 foram listados os principais fármacos utilizados no tratamento das Leishmanioses e suas principais características como via de administração e custo. Outras substâncias estão em fase de teste como a sitamaquina na fase II para administração oral, imiquimod que é um imunomodulador tópico está na fase II e antifúngicos azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol) (Croft *et al.*, 2006b).

Tabela 1: Drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses e suas características (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

Droga	Via administração	Esquema de tratamento	Eficácia*	Resistência	Toxicidade	Custo em dólar (\$)
Antimoniais pentavalente	IV, IM, IL	20mg/kg/dia 30 dias	35 a 95% dependendo da área	Comum. Na Índia >60%	Cardiotoxicidade, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade	50 – 70
Anfotericina B desoxicolato	IV	1mg/kg/dia 30 dias (máxima 15mg/kg)	90%	Observadas em cepas de laboratório	Nefrotoxicidade	~100
Anfotericina B liposomal	IV	5-20mg/kg 4-10 doses 10-20 dias	97%	Não documentado	Tremores e calafrios durante a infusão	280
Miltefosina	Oral	1,5 – 2,5mg/dia 28 dias	94-97% na Índia	Observadas em cepas de laboratório	Gastrointestinal, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogênico	~70
Paramomicina	IM	15mg/kg/dia 21 dias	46-85% na África depende da dose	Observadas em cepas de laboratório	Nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade	~10

IV - Intravenoso

IM - Intramuscular

IL – Intralinfático

* Cura definitiva em 6 meses

1.5.1 Antimoniais Pentavalentes

O antimônio trivalente (SbIII) foi o primeiro agente farmacológico utilizado no tratamento da LV, em 1915 na Itália e Índia. Após a década de 40, novas formulações dos antimoniais pentavalentes (SbV) foram introduzidos na terapêutica, o que diminuiu o tempo de tratamento (Murray *et al.*, 2005). São eles: o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam®) (Figura 6B) e o antimoníato de N-metilmeaglucamina (NMG) (Glucantime®Aventis) (Figura 6A), que continuam em uso até hoje (Soto *et al.*, 2004). Ambos compostos são derivados do ácido estibônico no qual está ligado o antimônio ao agrupamento de átomos de carbono, oxigênio e glicose.

No Brasil, a droga de primeira escolha é o Glucantime®, que é de distribuição gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O esquema terapêutico é de 20 mg/kg/dia administrado por via endovenosa com soro glicosado durante 30 dias. Quando o insucesso terapêutico ocorre opta-se pela anfotericina B desoxicolato (AmB). O Glucantime® é administrado por via parenteral requerendo atendimento ambulatorial. Ele é rapidamente excretado pelos rins, impedindo seu acúmulo a níveis tóxicos (Goodwin & Page, 1943). Embora os antimoniais pentavalentes sejam os mais seguros para o tratamento convencional das Leishmanioses, efeitos adversos aparecem tais como náuseas, vômitos e convulsões (Costa *et al.*, 2003) cardiotoxicidade (Sundar *et al.*, 1998), pancreatite (Shahian & Alborzi, 2009) e nefrotoxicidade (Zaghloul & Al-Jasser, 2004). Apesar de sua comprovada eficácia, o período de terapia longo e insucessos terapêuticos são observados (Ashutosh *et al.*, 2005). Alguns estudos vêm buscando reduzir a toxicidade das drogas com o uso da nanotecnologia através do melhoramento da absorção das drogas com sistemas de entrega dos antimoniais (Frezard *et al.*, 2009), incluindo formulações baseadas em liposomas (Schettini *et al.*, 2005) e formulações baseadas na ciclodextrina para administração oral (Demicheli *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está completamente elucidado. As primeiras hipóteses sugeriam que a ação do antimônio seria através da interferência da glicólise e β -oxidação dos ácidos graxos nas amastigotas. Consequentemente o efeito anti-*Leishmania* é parcial devido ao esgotamento dos níveis intracelulares de ATP (Berman *et al.*, 1987; Berman *et al.*, 1985). No entanto, essas vias não foram identificadas. Trabalhos mais recentes relacionam o mecanismo à interferência no metabolismo da tripanotona por dois mecanismos distintos (Wyllie *et al.*, 2004). O antimônio pentavalente (SbV) que é uma pró-droga que entra no macrófago e pode agir diretamente sobre a forma amastigota no vacúolo ou ser reduzido à forma trivalente (SbIII) no citosol. A entrada de SbV dá-se através de um transportador desconhecido, enquanto que a de SbIII faz-se através da aquagliceroforina

(AQP1). A redução de SbV a SbIII pode ser catalisada pelas enzimas antimônio redutase (ACR2) (Mukhopadhyay *et al.*, 2000) e tiol redutase dependente (TDR1) (Denton *et al.*, 2004) ou ocorrer quimicamente pela ação de tióis. O SbIII provavelmente interage com componentes celulares ou pode ser conjugado com tióis (cisteína, glutatona e tripanotiona), porém não se sabe se esta conjugação é enzimática. O metal conjugado com o tiol pode ser sequestrado em uma organela pelo transportador ABC MRPA ou ser excretado para fora da célula por outro transportador provavelmente também ABC. Porém, estes mecanismos variam dependendo se a cepa de *Leishmania* foi naturalmente resistente ou foi obtida por resistência induzida (Figura 3A e B).

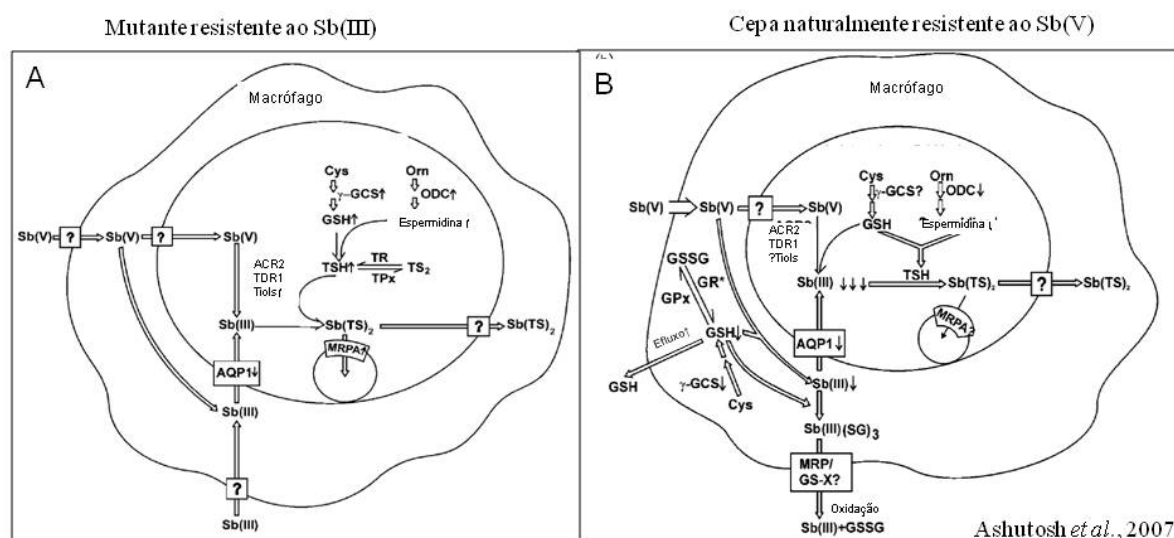


Figura 3: Esquema dos mecanismos de ação e resistência para o antimônio. A) Mutante resistente ao Sb(III) gerado em laboratório. B) Cepa naturalmente resistente ao Sb(V) de isolamento clínico. A entrada do Sb(V) no parasito ocorre por um transportador desconhecido, e Sb(III) através da aquagliceroforina (AQP1). Em A) o nível de tripanotiona (TSH) é aumentado devido ao aumento da atividade da ornitina descarboxilase (ODC) e γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS), enzimas limitantes para a biossíntese de tiol. A via de desintoxicação inclui formação de complexos de Sb(III) com o sequestro de TSH e subsequente sequestro via MRPA amplificado e ou por bombas de efluxo desconhecidas. Em B) uma menor expressão de ODC levaria a uma menor biossíntese de tiol, inibindo a ativação de Sb(V). A diminuição da expressão de AQP1 também restringe a entrada de Sb(III) para o parasito. Sb(III) intracelular pode estar envolvida quer por sequestro ou por efluxo conjugados Sb(III)-Tiol. Enquanto que nos macrófagos são conjugados com GSH e eliminado por transportadores ABC.

A resistência observada em *Leishmania* parece seguir o que já vem sendo descrito para outros organismos. Esta resistência deve-se principalmente ao gene conhecido por MDR (resistência a múltiplas drogas) que confere resistência a drogas hidrofóbicas através das proteínas como a glicoproteína P (P-gp) e proteína multi-droga (MRP). Em *Leishmania* o MRP também confere MDR, embora isso não possa ser revertido por moduladores convencionais, a proteína responsável é conhecida como MRP1.

A existência de efeitos colaterais e o fenômeno de resistência tanto natural quanto adquirida (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1990; Lira *et al.*, 1998) têm-se tornado um desafio cada vez maior. Cepas de *Leishmania* com diversos graus de resistência têm sido isoladas no Novo Mundo, sendo que *L. (V.) braziliensis* frequentemente apresenta resistência a tratamentos de curta duração ou em doses baixas (Moreira *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 1995). No Velho Mundo, cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao glucantime têm sido isoladas no campo principalmente na Índia (Sundar, 2001). As principais causas para o aparecimento desta resistência incluem: uso indiscriminado do glucantime nestas áreas, tratamento médico inadequado com doses baixas e descontínuas (Sundar *et al.*, 1994).

1.5.2 Anfotericina B

O Anfotericina B (AmB) (Figura 5D) é um antibiótico polieno produzido por diferentes espécies de *Streptomyces* e inicialmente utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, mas também apresenta atividade contra *Leishmania*. A anfotericina é encontrada sob duas formas: A e B, sendo a B mais ativa e a única usada clinicamente (Vandeputte *et al.*, 1956). É um fármaco insolúvel em água e com pH neutro, e a formulação licenciada para uso na rotina clínica é uma mistura de anfotericina B com o detergente desoxicolato em tampão fosfato promovendo a solubilidade da substância (Brajtburg & Bolard, 1996). O Fungizon é o produto produzido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb. Este fármaco tem induzido altas taxas de cura em pacientes infectados por *L. (L.) donovani*, particularmente quando administradas em crianças e gestantes e nos casos de resistência do parasito aos antimoniais (Lira *et al.*, 1998; Singh & Sivakumar, 2004). A anfotericina B não sofre acumulação plasmática com a utilização em doses diárias. É uma droga extremamente tóxica que exige internação e monitoramento de funções vitais, sendo uma terapia de alto custo (Kafetzis *et al.*, 2005). No Brasil, alguns estudos vêm sendo realizados para determinar o melhor esquema terapêutico. A dose recomendada é de 0,5 mg/kg/dia com aumento gradativo até 1 mg/kg/dia conforme a tolerância do paciente. Deve ser administrado via endovenosa com soro glicosado em dias alternados respeitando o limite

máximo de 50 mg por aplicação até a dose total de 1 a 1,5 g para LC e de 2,5 a 3 g para LMC. Os efeitos colaterais apresentados ocorrem principalmente durante a infusão venosa que leva de 4 a 6 horas, sendo febre, náusea, vômito, calafrios, hipotensão ou hipertensão, comprometimento da função renal e redução dos níveis séricos de potássio (Brajtburg & Bolard, 1996). O tempo total de tratamento é de 14-20 dias.

A atividade leishmanicida da anfotericina B foi demonstrada no final da década de 50, quando passou a ser utilizada para o tratamento da Leishmaniose, sendo considerada uma alternativa para o tratamento das leishmanioses mucocutânea e visceral. (Saha *et al.*, 1986). Atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular de fungos e *Leishmania* (Figura 4A), porém, não apresenta afinidade pelo colesterol da membrana plasmática de mamíferos (Singh & Sivakumar, 2004). A AmB interage com os ergosteróis de membrana, principalmente o ergosta-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol (Figura 4A – seta à direita) induzindo a formação de poros na membrana promovendo a vazamento de íons causando a perda da permeabilidade da membrana levando a parasito a morte (Roberts *et al.*, 2003). A toxicidade e efeitos colaterais observados ocorrem devido a ligação da AmB, em pequenas quantidades, ao colesterol da membrana plasmática das células dos mamíferos (Olliaro & Bryceson, 1993). A resistência ocorre quando a célula utiliza precursores de ergosterol tais como colest-5,7,24(24¹)-trieno-3 β -ol (Figura 4A – seta à esquerda) pelo qual a droga tem pouca afinidade (Mbongo *et al.*, 1998).

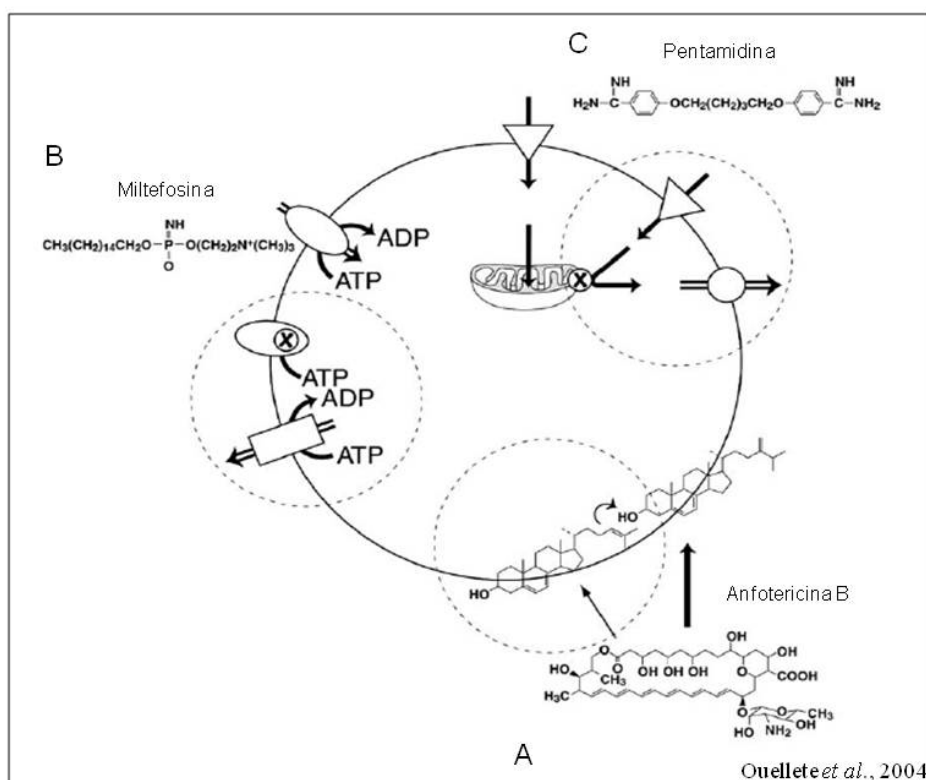


Figura 4: Mecanismo de ação e resistência da Anfotericina B (A), Miltefosina (B) e Pentamidina (C). Legenda: ATP- adenosina trifosfato, ADP- adenosina difosfato.

Com o aparecimento de resistência aos antimoniais pentavalentes, a Anfotericina B se tornou a primeira linha de tratamento em muitas regiões como em Bihar na Índia, onde mais de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral não respondem ao tratamento com Sb(V) (Chappuis *et al.*, 2007). Além disso, a Anfotericina B é recomendada para gestantes, casos graves de leishmaniose, casos de falha terapêutica ou presença de efeitos adversos intensos com o uso de antimoniais e em situações de risco de morte. Estudos para diminuir a toxicidade da anfotericina B foram realizados no final da década de 1990 e novas formulações lipídicas foram desenvolvidas. Nas novas formulações, o desoxicolato foi substituído por outros lipídios: Anfotericina B lipossomal - Ambisome® (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA), colesterol sulfato de Anfotericina B - Amphotec® (Sequoia, MentoPark, CA/EUA) e complexo lipídico de Anfotericina B - Albecet (Liposome Co, Princeton, NJ/EUA). Essas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, sendo pouco absorvido pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do fármaco.

A Anfotericina B lipossomal é considerada o melhor fármaco disponível para o tratamento da leishmaniose visceral e em muitos países da Europa e Estados Unidos é utilizada como a primeira linha de tratamento. No Brasil, o Ministério da Saúde indica o

desoxicolato de Anfotericina B como terapia de segunda escolha. É empregado em situações de toxicidade ou refratariedade ao tratamento com antimonial, contra-indicação formal ao tratamento com antimonial pentavalente, incluindo gestação e em casos de leishmaniose visceral grave (Saúde, 2006 b).

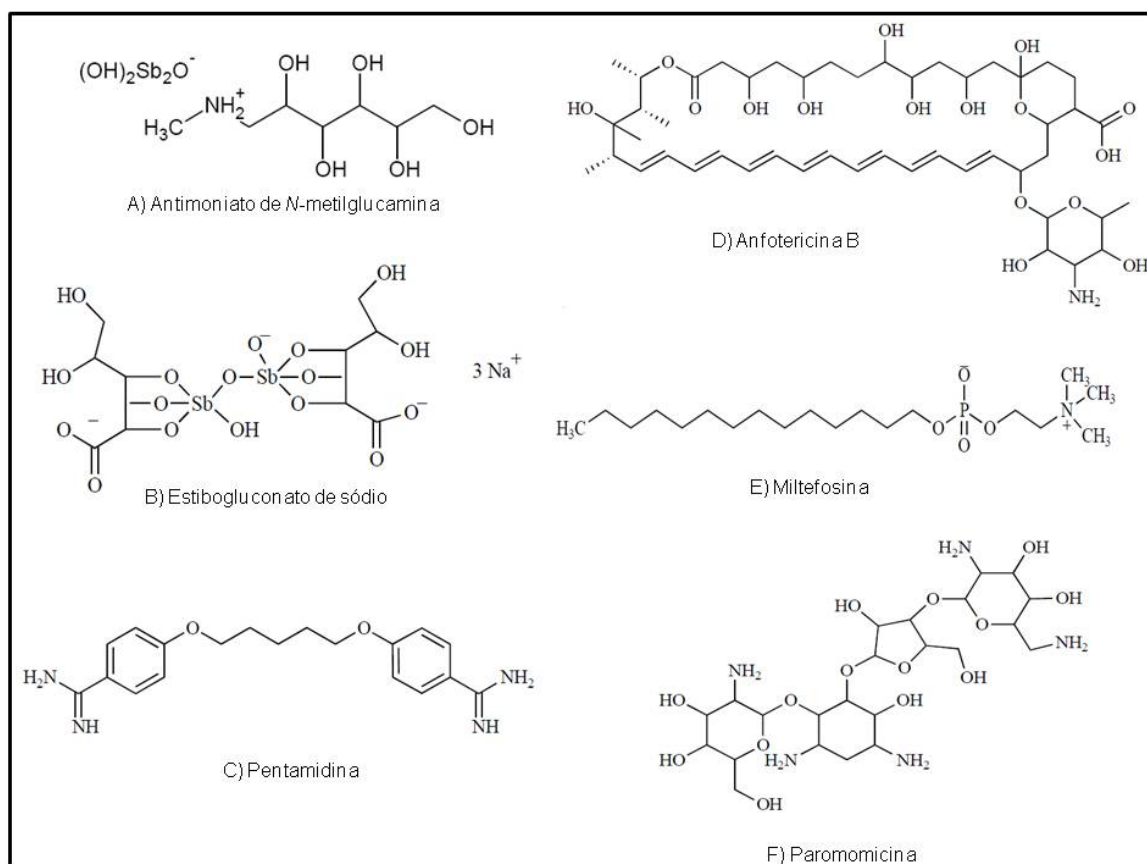


Figura 5: Compostos anti-*Leishmania*. Os antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metilglucamina (A) e estibogluconato de sódio (B) vêm sendo usados desde a década de 1940. A pentamidina (C) é uma diamina aromática utilizada como segunda linha no combate a LV. A anfotericina B (D) foi originalmente desenvolvida como composto anti-fúngico e é usado no combate a LV por mais de 20 anos. Um análogo éter-lipídico sintético, a miltefosina (E) é uma droga anti-*Leishmania* com administração oral. A paromomicina (F) é um antibiótico aminoglicosídeo e é usado tanto na LV quanto LC.

1.5.3 Miltefosina (hexadecilfosfocolina)

A OMS vem investindo na busca de novos fármacos à partir de moléculas já existentes. Isto resultou na identificação da primeira droga oral contra *Leishmania*, a miltefosina (Figura 5E). A busca por medicamentos eficazes com administração via oral é o principal objetivo nas pesquisas de medicamentos contra as Leishmanioses. Este é o principal benefício que a miltefosina (Impavido) agregou ao tratamento da doença desde a descoberta

dos antimoniais na década de 40 (Ouellette *et al.*, 2004). A miltefosina é uma alquilfosfocolina originalmente desenvolvida como uma droga anti-tumoral. Ela possui um tempo de meia-vida longo (150 h) e potencial teratogênico o que ainda exige cuidado em sua administração (Lira *et al.*, 2001; Urbina, 2006). Os níveis plasmáticos deste fármaco podem permanecer constantes após 26 dias de administração contínua (Berman *et al.*, 2006). Em baixas doses atua sobre os parasitos, mostrando atividade contra *L. (L.) donovani in vitro* (Croft *et al.*, 1987) e *in vivo* (Croft *et al.*, 1996). Um ensaio recente de Fase III mostrou que esta droga foi ativa contra a LV na Índia (Sundar *et al.*, 2002). Porém, a mesma tem demonstrado baixa eficácia *in vitro* e *in vivo* contra espécies do Novo Mundo (Moraes-Teixeira *et al.*, 2011). Devido ao seu uso recente, ainda não se sabe até que ponto o uso desta droga em larga escala pode levar ao desenvolvimento de resistência, sendo necessários mais estudos para determinar seu potencial terapêutico (Ganguly *et al.*, 2001; Sundar, 2001).

O mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas em células tumorais ela induz apoptose e altera as vias de sinalização celular mediada por lipídios (Arthur & Bittman, 1998). Um estudo demonstrou a indução de apoptose celular em promastigotas de *L. (L.) donovani* (Verma & Dey, 2004) e *L. (L.) amazonensis* (Marinho *et al.*, 2011). Em outros estudos é sugerido que a miltefosina apresenta propriedades imunomoduladoras (Eue *et al.*, 1995; Hochhuth *et al.*, 1992; Vehmeyer *et al.*, 1991). Outra hipótese seria a atuação sobre o metabolismo de lipídios alquil e na biossíntese de fosfolípidos (Figura 4B) (Lux *et al.*, 2000). Esta droga seria captada pela célula através de uma ATPase aminofosfolipídica do tipo P, sendo que mutações pontuais neste transportador levariam a um decréscimo no acúmulo da droga dentro da célula e a um mecanismo de resistência (Perez-Victoria *et al.*, 2003). Estudos em laboratório indicam que seus prováveis mecanismos de resistência incluiriam: permeabilidade diferencial da membrana plasmática à droga, diminuição de sua captação, aumento do seu metabolismo e do seu efluxo (Figura 4B). Em *Leishmania* resistente ao agente antitumoral daunomicina foi observada a superexpressão do gene da glicoproteína P (*MDR1*), que são transportadores do tipo ABC envolvidos na multi resistência a drogas em células tumorais (Perez-Victoria *et al.*, 2001).

Mesmo sendo promissora, a miltefosina também apresenta efeitos colaterais incluindo vômitos, diarreia (Kaminsky, 2002) e aumento dos níveis séricos de transaminase, uréia e creatinina (Fischer *et al.*, 2001). Em *L. (L.) donovani* também foi demonstrada resistência induzida ao fármaco em linhagens de promastigotas *in vitro* (Seifert *et al.*, 2003). Contudo, até o momento, a maior limitação do uso da miltefosina é o uso em pacientes do sexo feminino em idade fértil uma vez que este fármaco apresentou efeitos teratogênicos em animais (Kaminsky, 2002).

Tabela 2: Outras drogas utilizadas no tratamento

Substância	Nome comercial ou princípio	Tipo de atuação	Efeito	Referências
Pentamidina	Lomidina® diamidinas aromáticas (Figura 5C)	O mecanismo de ação desse composto (Figura 4C) atue no DNA do cinetoplasto inibindo suas funções bloqueando a topoisomerase mitocondrial. Outra hipótese, diz respeito à interferência de diamidinas aromáticas sobre sistemas de transporte poliamínicos, biomoléculas de importância em vários processos bioquímicos da fisiologia celular	A alta toxicidade desta droga, com relatos de morte súbita, é um fator limitante de seu emprego terapêutico.	(Singh & Sivakumar, 2004)
Paromomicina	Um antibiótico aminoglicosídeo, também chamado aminosidina (Figura 5F)	Inibição da síntese de proteínas relacionadas às subunidades do RNA ribossomal (rRNA)	Ainda é desconhecida sua eficácia sobre os parasitos, mas a combinação paromocinina e estibogluconato de sódio elevou a taxa de cura acima de 82%	(Maarouf <i>et al.</i> , 1997)
Azitromicina	É um antibiótico azalídeo bacteriostático da família dos macrolídeos	Interferem com a síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossomal 50S de organismos susceptíveis	Essa atividade foi inferior à do antimoníato de meglumina para o controle da lesão e ambos os fármacos (azitromicina e antimoníato de meglumina) não promoveram a esterilização dos parasitos da lesão	(Sinagra <i>et al.</i> , 2007)
Alopurinol	análogo da hipoxantina, inibe o catabolismo das purinas em mamíferos através do bloqueio da enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPT) e o anabolismo em patógenos do gênero <i>Leishmania</i>	é um substrato para enzimas da via das purinas e incorpora-se ao ácido nucléico do parasito. Inibe a xantina oxidase e a produção de reativos do oxigênio úteis na eliminação dos parasitos	embora seja pouco eficaz como terapia isolada, quando utilizado em combinação com outras drogas aumenta a eficácia do tratamento	(Sampaio & Marsden, 1997)
Compostos azóis	cetaconazol, triazol, itraconazol, fluconazol e alilaminas (terbinafina)	bloqueio da síntese do ergosterol mediada pela citocromo P ₄₅₀ oxidase	Contudo, nenhum desses azóis foi considerado mais efetivo que a terapia com o antimonito de N-metilglumina	(Alrajhi <i>et al.</i> , 2002; Croft & Yardley, 2002)

1.6 Descoberta de novas drogas anti-*Leishmania*

O uso empírico de plantas medicinais pela população tem demonstrado que caule, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas apresentam eficácia na cura para diversos males, suscitando assim grande interesse no estudo científico. Nos últimos anos, as plantas tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de fármacos semi-sintético (Rossi-Bergmann *et al.*, 1997).

A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos compostos ativos de várias espécies vegetais, metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides considerados no passado como inativos, são ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica. Compostos que estimulam o sistema imune são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários, como na leishmaniose. Neste caso, estudos químicos e imunofarmacológicos tem sido realizado com intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta à resistência do parasito aos fármacos (Rossi-Bergmann *et al.*, 1997).

Os avanços na bioinformática, associados ao sequenciamento do genoma dos parasitos, permitem identificar novas moléculas e vias bioquímicas e distinguir diferenças moleculares entre parasito e hospedeiro (Croft, 1997; Davis *et al.*, 2004).

Um dos grandes problemas para o desenvolvimento de novos fármacos ocorre no momento da interpretação das diferenças e identificação do alvo que se tornará válido para a ação do fármaco. Por exemplo, os estudos têm buscado fármacos de ação antiparasitária que possam se acumular no interior das células. Além disso, deve ser dada atenção às características físico-químicas do fármaco, pois são estas que irão interferir diretamente na sua biodisponibilidade (Croft, 1997).

Na procura por drogas contra *Leishmania*, compostos que foram testados com sucesso contra outros protozoários podem propiciar uma atividade leishmanicida. Este é o caso da buparvaquona, uma hidroxinaftoquinona que é comumente utilizada no tratamento contra a *Theileria* em bovinos (Garnier *et al.*, 2007). Esta molécula apresentou uma atividade leishmanicida marcante quando aplicada topicamente nas lesões cutâneas e também quando administrada parenteralmente para controlar a forma visceral. Outra classe de compostos recentes os cis-DDP (ou cisplatina), com atividade antitumoral, foram recentemente testados contra *L. (L.) infantum* apresentando atividade tanto contra formas promastigotas quanto amastigotas por mecanismo semelhante a apoptose (Tavares *et al.*, 2007). Similarmente, (Sen

et al., 2007) utilizando o antimalárico artemisinina também observaram o desencadeamento de apoptose em *L. (L.) donovani*. Estes trabalhos demonstram a importância atual da procura de drogas anti-*Leishmania* a partir de fármacos já existentes.

Neste trabalho, dentro da busca de novos fármacos, pretendemos testar moléculas derivadas do propranolol que apresentaram atividade prévia contra *T. cruzi* (Croft, 1988). As drogas sintéticas catiônicas, os bloqueadores β -adrenérgicos, como por exemplo, pindolol, acebutalol, alprenolol e o propranolol que apresentam a cadeia oxipropanolamínica, mostraram atividade contra formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Hammond *et al.*, 1984). O β -bloqueador adrenérgico propranolol apresentou atividade esterilizante *in vitro* contra as formas tripomastigotas das cepas Peru, Sonya e Y do *T. cruzi* e foi escolhido como protótipo para obtenção dos derivados.

Outras moléculas que foram testadas neste trabalho incluem os compostos análogos da diamina, também denominadas de poliaminas. Nas últimas décadas, análogos das poliaminas ou conjugadas tem mostrado grande interesse nas mais diferentes áreas da pesquisa (Karigiannis & Papaoiannou, 2000). As poliaminas como a putrescina 1, espermidina 2 e espermina 3 tem sido encontradas em altos níveis em *Leishmania* por serem essenciais para o crescimento celular e diferenciação entre as células eucarióticas e procarióticas (Vannier-Santos *et al.*, 2008). Em geral, as poliaminas apresentam as propriedades anti-inflamatória e antioxidante (Lagishetty & Naik, 2008). Alguns estudos indicam que o mecanismo de ação da espermina pode incluir a inibição do citocromo C, inibição do Fe III/xantina oxidase e inibição da polimerização do ácido hialurônico por indução de Fe II (Lovaas & Carlin, 1991). Tem sido sugerido que as poliaminas exercem pelo menos 2 diferentes mecanismos anti-inflamatório: o primeiro é mediado pela síntese da proteína vasoregulina (Oyanagui, 1984) e a segunda pela ação direta sobre leucócitos com modulação do processo imune cálcio-dependente (Theoharides, 1980). Além disso, em *Leishmania*, a via do metabolismo das poliaminas podem aumentar as chances de maior seletividade em células mamíferas, tornando-se uma grande preocupação em relação ao abandono do tratamento pelo paciente que pode ocorrer em função dos efeitos colaterais grave (Croft *et al.*, 2006a).

Além destes compostos, foram também testados os complexos metálicos do Lapachol. O Lapachol, [2-hidroxi-3-(3'-metil-2-butenil) -1,4-naftoquinona], é produto natural obtido a partir do cerne de diversas árvores da família Bignoniaceae. Esta naftoquinona natural é conhecida desde 1858, e é facilmente extraída da serragem da madeira de espécies desses ipês. Apesar de ainda não ser um fármaco é uma substância importante, pois existe um grande número de estudos que demonstraram sua atividade contra vários microorganismos como

bactérias (Nagata *et al.*, 1998), *Plasmodium* (de Andrade-Neto *et al.*, 2004), *T. cruzi* (Pinto *et al.*, 2000), *Leishmania* (Lima *et al.*, 2004) e células tumorais (Eyong *et al.*, 2008).

Complexos metálicos de bismuto e antimônio têm sido utilizados no tratamento de *Helicobacter pylori* e *Leishmania* respectivamente. Assim como complexo com estanho também foi utilizado em testes contra *L. (L.) donovani* (Murray *et al.*, 2005; Raychaudhury *et al.*, 2005). Esta abordagem de complexação de metais tem sido utilizada no intuito de melhorar a ação farmacológica e reduzir seus efeitos colaterais. Neste trabalho também foi realizada a complexação de metais como o antimônio, bismuto e estanho ao lapachol.

1.7 Teste Microscópico Clássico

Vários ensaios são realizados para a avaliação da susceptibilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp a fármacos. Porém, nem sempre ocorre correlação na susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* para estas duas formas (Croft *et al.*, 2006a). Alguns trabalhos questionam a utilização das promastigotas e amastigotas axênicas como modelos de teste de droga, uma vez que as mesmas não representam as condições enfrentadas pelo parasito no hospedeiro vertebrado (Gupta, 2011). Experimentos realizados com amastigotas intracelulares se correlacionam melhor com a resposta *in vivo* (Fumarola *et al.*, 2004) e por esta razão foram adotados neste projeto. No caso de *Leishmania*, existe um método clássico não automatizado, muito laborioso e já utilizado há muitos anos. Ele consiste na avaliação do crescimento intracelular das amastigotas em macrófagos após a exposição às drogas. Estes macrófagos podem ser tanto obtidos da cavidade peritoneal de camundongos ou oriundos de linhagens celulares contínuas. Posteriormente, eles são infectados com o parasito antes da exposição às drogas teste. A atividade é medida através da contagem da porcentagem de células infectadas e do número de amastigotas por 50-300 macrófagos (Berman & Lee, 1984; Morais-Teixeira *et al.*, 2008; Neal & Croft, 1984; Sereno *et al.*, 2005). Este método envolve a contagem de um grande número de células e exige um profissional bem treinado. Entretanto, a variação individual do experimento poderia ser minimizada com o desenvolvimento de métodos semi-automatizados.

Em malária, também existe um teste tradicional que se baseia na contagem de eritrócitos contendo o *Plasmodium falciparum* (Rieckmann *et al.*, 1978). Este método foi semi-automatizado utilizando um marcador radioativo, a hipoxantina tritiada. Este precursor de ácido nucléico incorpora-se no DNA dos trofozoítos, uma vez que estes parasitos encontram-se em hemácias que não possuem núcleo (Desjardins *et al.*, 1979). Este teste é bastante eficaz e têm auxiliado a triagem inicial de várias moléculas, permitindo um

direcionamento para os testes *in vivo* em camundongos. Contudo, o método da hipoxantina não pode ser usado em *Leishmania*, pois este precursor também seria incorporado ao DNA dos macrófagos. Além disso, este método apresenta a desvantagem de produzir rejeito radioativo. (Sanchez *et al.*, 2007) desenvolveram uma metodologia que utiliza *P. falciparum* transfectados com a GFP para substituir tanto o método da hipoxantina quanto o tradicional. Para viabilizar a semi-automatização do teste de drogas em *Leishmania* no futuro, a produção de cepas de *Leishmania* RFPs é um dos principais objetivos de nosso trabalho. Com o advento da biotecnologia, desenvolvimento de ferramentas moleculares e de aparelhos mais sensíveis, esta possibilidade torna-se mais viável. Uma delas seria a aplicação da tecnologia do gene repórter.

1.8 Genes Repórteres

O gene repórter consiste em uma sequência de nucleotídeos, que introduzida em um sistema biológico, produz a expressão de um fenótipo que possa ser detectado. É um parâmetro conveniente que correlaciona eventos moleculares com a expressão genética (Wood, 1995). Embora novos genes repórteres sejam introduzidos a cada ano, são poucos os utilizados rotineiramente. Sua escolha deve ser criteriosa, pois dependerá da linhagem celular, da natureza do experimento, e da adaptação do ensaio para sua detecção, levando-se em conta a conveniência, sensibilidade, linearidade, simplicidade e dinâmica (Naylor, 1999).

1.8.1 Sistemas colorimétricos

A cloranfenicol acetiltransferase (CAT) foi o primeiro gene repórter utilizado no monitoramento da atividade celular transcricional. É uma enzima bacteriana que catalisa a transferência do grupo acetil da acetil-coenzima A, para o substrato, o cloranfenicol. A principal vantagem do sistema que emprega CAT decorre do fato de se tratar de uma enzima procariótica que apresenta uma atividade endógena mínima em células de mamíferos (Lin & Barbosa, 2002). Além disso, CAT apresenta uma meia-vida de cerca de 50 horas em células de mamíferos e essa estabilidade pode ser satisfatória para experimentos de transfecção transitória. Por outro lado, os ensaios são trabalhosos e longos, o substrato radioativo necessário para a maioria dos experimentos é caro e a sensibilidade do método é inferior àquela de outros sistemas repórteres mais recentes (Naylor, 1999).

A enzima β -galactosidase é uma enzima bacteriana bem caracterizada e representa um dos sistemas repórteres mais versáteis. Sua atividade pode ser mensurada por métodos

colorimétricos ou quimioluminescentes. A clivagem do substrato (várias formas de galactosídeos) pela enzima produz uma solução de coloração amarela, detectada a 420 nm no espectrofotômetro. No ensaio quimioluminescente, mediante substratos específicos, a atividade da enzima é refletida pela quantidade de emissão luminosa registrada por um luminômetro. Esse ensaio chega a ser 50.000 vezes mais sensível que o colorimétrico. A expressão da β -galactosidase é usada como um sistema repórter para caracterizar sequências regulatórias, mas é também frequentemente adotada como um controle interno para normalizar a variabilidade de outros ensaios repórter, notadamente CAT e luciferase (Hollon & Yoshimura, 1989).

O gene da fosfatase alcalina secretada (SEAP) codifica uma forma da enzima cujo domínio de ancoragem à membrana está ausente. Isso confere a propriedade de ser secretada pelas células e a vantagem de ser quantificada a partir de alíquotas do meio de cultura de células previamente transfectadas. O emprego da SEAP oferece inúmeras vantagens: múltiplos tratamentos podem ser aplicados às células, uma vez que elas permanecem intactas após as medidas da atividade do gene repórter, pode-se acompanhar a cinética de expressão gênica a partir de uma mesma cultura e não é necessário preparar lisados de células (Naylor, 1999). Porém, o ensaio não deve ser realizado em tipos de células que expressam baixos níveis de fosfatase alcalina placentária (pulmão, testículo, epitélio do colo uterino). Ainda, espera-se que o desenho experimental não altere a capacidade secretora das células-alvo.

1.8.2 Sistemas luminescentes e fluorescentes

Além dos sistemas colorimétricos, existem também os luminescentes e fluorescentes. Os genes repórteres mais empregados nesta modalidade incluem: luciferase e a proteína verde fluorescente (GFP). A luciferase refere-se à família de enzimas que catalisam uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 . Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase das células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina (i e ii) com emissão de um *flash* de luz que decai rapidamente que pode ser detectado por um luminômetro (Wood, 1995). A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra em estudo. Este sistema tem algumas vantagens quando comparado ao sistema CAT usualmente empregado: apresenta uma sensibilidade 10 a 100 vezes superior (Pazzagli *et al.*, 1992), o processamento das amostras é bem mais rápido, não requer o uso de isótopos, é relativamente mais barato e, apresenta atividade endógena baixa em células de mamíferos. Por ser sensível à degradação por proteases, a meia-vida da enzima luciferase é de cerca de 3 horas em células de mamíferos. Essa característica favorece o

emprego desse sistema quando pretende estudar sistemas indutíveis, em que os aumentos observados em relação aos níveis de expressão basal necessitam ser maximizados. Os ensaios de luciferase aplicam-se a estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A atividade da enzima pode ser detectada em células vivas, *in situ*, quando se usam substratos de luciferase solúveis (ésteres de luciferina) capazes de atravessar a membrana plasmática. (Thompson *et al.*, 1991).

A descoberta e clonagem do gene GFP em 1991 da água-viva *Aequorea victoria* possibilitou a expressão desta proteína em sistemas heterólogos (Chalfie, 1995). A proteína GFP, quando expressa em células procarióticas ou eucarióticas, produz uma fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou UV (Misteli & Spector, 1997). Essa propriedade intrínseca da proteína permite que esse sistema seja bastante apreciado para avaliar a expressão de genes. GFP tem como característica principal ser uma proteína autofluorescente, propriedade que não requer a presença de nenhum co-fator ou substrato para a geração de luz. A grande vantagem da GFP é que há ausência de lise celular, possibilitando o monitoramento não invasivo da expressão do gene em tecidos vivos.

Tabela 3: Expressão dos genes repórteres em diferentes espécies de *Leishmania* e suas aplicações

Espécie	Gene Repórter	Tipo de expressão	Aplicação	Tipo de Leitor	Referência
<i>L. amazonensis</i> / <i>L. major</i>	β-lactamase	Episomal	Promastigota	Espectrofotômetro	(Buckner & Wilson, 2005)
<i>L. donovani</i>	β-lactamase	Integrado	Amastigota intracelular	Espectrofotômetro	(Mandal <i>et al.</i> , 2010)
<i>L. major</i> / <i>L. donovani</i>	Luciferase firefly	Integrado	Amastigota intracelular	Luminômetro	(Roy <i>et al.</i> , 2000)
<i>L. infantum</i> / <i>L. infantum</i> R SbIII	Luciferase firefly	Episomal	Amastigota axênica	Luminômetro	(Sereno <i>et al.</i> , 2001)
<i>L. donovani</i> / <i>L. donovani</i> R	Luciferase firefly	Episomal	Amastigota intracelular	Espectrofluorímetro	(Ashutosh <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. amazonensis</i>	Luciferase firefly	Integrado	Promastigota	Luminômetro	(Lang <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. panamensis</i>	Luciferase firefly	Integrado	Amastigota intracelular	Luminômetro	(Romero <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. infantum</i>	Luciferase firefly	Integrado	Amastigota intracelular (U937)	Luminômetro	(Michel <i>et al.</i> , 2011)
<i>L. donovani</i>	Luciferase firefly	Episomal	Promastigota	Espectrofluorímetro	(Ravinder <i>et al.</i> , 2012)
			Amastigota axênica		
			Amastigota intracelular (J774)		
<i>L. major</i>	Luciferase firefly	não mencionado	Promastigota	Luminômetro	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. major</i> / <i>L. donovani</i>	GFP	Integrado	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Ha <i>et al.</i> , 1996)
<i>L. infantum</i>	GFP	Episomal	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Kamau <i>et al.</i> , 2001)
<i>L. amazonensis</i>	GFP multimérica	Episomal	Promastigota	Espectrofluorímetro	(Chan <i>et al.</i> , 2003)
<i>L. amazonensis</i>	eGFP	Episomal	Promastigota	Espectrofluorímetro	(Okuno <i>et al.</i> , 2003)
	β –galactosidase				
<i>L. donovani</i>	GFP	Episomal	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Singh & Dube, 2004)
			Amastigota intracelular	Microscopia confocal	
<i>L. amazonensis</i>	eGFP	Integrado	Amastigota intracelular	Fluorímetro	(Dutta <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. donovani</i>	GFP	Integrado	Amastigota intracelular	Citômetro de fluxo	(Dube <i>et al.</i> , 2005)
<i>L. amazonensis</i>	GFP	Episomal	Promastigota	Espectrofluorímetro	(Boeck <i>et al.</i> , 2006)
			Amastigota		
<i>L. major</i>	GFP	Episomal	Amastigota intracelular	Citômetro de fluxo	(Kram <i>et al.</i> , 2008)
<i>L. donovani</i> / <i>L. donovani</i> R	GFP	Integrado	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Singh <i>et al.</i> , 2009)
			Amastigota intracelular		
<i>L. panamensis</i>	eGFP	Integrado	Amastigota intracelular	Citômetro de fluxo	(Varela <i>et al.</i> , 2009)
<i>L. amazonensis</i>	eGFP	Episomal	Amastigota intracelular	Citômetro de fluxo	(Mehta <i>et al.</i> , 2010)
<i>L. donovani</i>	GFP	Episomal	Amastigota intracelular	Citômetro de fluxo	(Kaur <i>et al.</i> , 2010)
<i>L. tarentolae</i> / <i>L. major</i> / <i>L. infantum</i>	eGFP	Integrado	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Bolhassani <i>et al.</i> , 2010)
			Amastigota intracelular		
<i>L. amazonensis</i>	GFP	Episomal	Promastigota	Citômetro de fluxo	(Costa S. dos <i>et al.</i> , 2011; Costa <i>et al.</i> , 2011)
			Amastigota	Espectrofluorímetro	
<i>L. amazonensis</i>	GFP e RFP	Integrado	Amastigota intracelular (MO peritoneal)	Espectrofluorímetro	(Rocha <i>et al.</i> , 2013)

R- resistente, R SbIII – resistente ao antimônio trivalente, GFP – proteína verde fluorescente, eGFP – enhanced = melhorada MO - macrófago

Conforme os dados da Tabela 2 é possível notar que a produção de clones de *Leishmania* expressando genes repórteres inclui, em sua maioria, espécies do Velho Mundo. Apenas *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* episomais estão disponíveis dentre as cepas do Novo Mundo. É possível notar ainda que são várias as possibilidades de empregos para os parasitos fluorescentes como na Citometria de fluxo (Kram *et al.*, 2008; Mehta *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2009). Porém, são poucos os genes fluorescentes que empregaram a espectrofluorimetria como ferramenta de leitura. A principal vantagem da metodologia de transfecção de integração genômica é que ela se baseia na incorporação do gene repórter no DNA genômico do parasito, sendo, portanto, estável. Na transfecção episomal, a célula tende a expulsar o vetor, sendo necessária a manutenção do parasito sob constante pressão do antibiótico (Cruz *et al.*, 1991). Com a integração no genoma, isto não seria mais necessário o que é uma vantagem importante considerando a possibilidade de haver similaridade de moléculas a serem testadas com o antibiótico seletivo levando a resistência cruzada. Neste trabalho, utilizaremos uma metodologia de transfecção de integração genômica (Beverley & Clayton, 1993).

Embora a GFP produza significativa fluorescência e ser estável, a excitação máxima está numa faixa crítica, muito próxima ao ultravioleta, requerendo cuidados especiais para não danificar células vivas, portanto não é o melhor repórter para sistemas de ensaios vivos. Recentemente, várias modificações e melhoramento na sequência da GFP foram realizados gerando mutantes com espectro de emissão diferentes e melhores como a eGFP (enhanced = melhorada). Outros genes repórteres fluorescentes foram sendo identificados e clonados. Dentre eles estão YFP (amarela), RFP (vermelha), CFP (ciano). Estes novos genes fluorescentes vêm sendo utilizado para transfectar muitos parasitos com as mais diversas finalidades como, por exemplo: *Toxoplasma gondii* com YFP para screening de alto rendimento (HTS) (Gubbels *et al.*, 2003), *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* com DsRed para estudos de interação com o vetor (Guevara *et al.*, 2005) e *L. (L.) major* com RFP para estudo de migração de células dendríticas (Ng *et al.*, 2008).

A busca de um método semi-automatizada tem se intensificado nos últimos anos. Recentemente dois trabalhos vêm propor o uso de métodos de screening de alto rendimento (HTS). O primeiro utiliza *L. (L.) major* ou *L. (L.) donovani* e linhagem celular THP-1 e a tecnologia de análise de imagem (Siqueira-Neto *et al.*, 2010) e o segundo *L. (L.) donovani* e linhagem THP-1 sistema de análise de imagem (De Muylder *et al.*, 2011).

Até o presente momento não havia sido utilizada *Leishmania* RFP para fins de triagem de drogas. A proteína RFP apresenta vantagens em relação à GFP. A fluorescência vermelha sofre menor interferência da auto-fluorescência celular e do espectro do comprimento de onda

de fluorescência típica de diversos compostos químicos (Dube *et al.*, 2009). Esta proteína foi descoberta em corais da espécie *Discosoma striata*, por isso usa-se a nomenclatura DsRed (Shaner *et al.*, 2004). Inicialmente ocorreram vários problemas na clonagem desta proteína: a maturação era lenta, ocorria uma sobreposição espectral com a fluorescência verde e podem formar grandes agregados protéicos nas células vivas sendo, portanto tóxicos. Esses obstáculos foram superados com a mutagênese através da criação da segunda geração conhecida como DsRed2. Foram realizadas várias mutações no terminal aminopeptídeo que impede a formação de agregados de proteínas reduzindo a toxicidade. Além disso, as modificações diminuíram o tempo de maturação do fluoróforo e aumentaram o nível de fluorescência emitida (Shaner *et al.*, 2008; Strongin *et al.*, 2007).

Este trabalho vem sendo realizado desde 2007 com a produção e caracterização biológica da cepa de *L. (L.) amazonensis* GFP. Com o início do Doutorado em 2009, este projeto continuou com padronização da técnica fluorimétrica com os parasitos GFPs. Estes, por sua vez não foram detectados no fluorímetro, razão pela qual, os experimentos foram repetidos com a proteína RFP. Alguns resultados com as proteínas GFPs do mestrado, foram incluídos neste trabalho para comparação e também na redação do artigo para publicação envolvendo as leishmanias tanto GFPs quanto RFPs (Rocha *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Padronizar um novo método de triagem de drogas semi-automatizado utilizando *Leishmania (Leishmania) amazonensis* transfectadas com o gene da proteína vermelha fluorescente e avaliar a atividade leishmanicida dos derivados do propranolol, das poliaminas e de complexos metálicos de lapachol.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Transfectar *L. (L.) amazonensis* com o gene da proteína vermelha fluorescente (RFP);

2.2.2. Realizar avaliação do crescimento celular da *L. (L.) amazonensis* selvagem e transfectada com o gene da proteína vermelha fluorescente (RFP) e a infecção em macrófagos peritoneais murinos;

2.2.3. Avaliar a morfologia, produção de fluorescência e susceptibilidade às moléculas comparando *L. (L.) amazonensis* RFP, em relação aos parasitos selvagens (WT) através da microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e teste de droga;

2.2.4. Avaliar a atividade leishmanicida e avaliação de toxicidade de moléculas derivadas do propranolol;

2.2.5. Padronizar o método semi-automatizado de triagem de drogas no Fluorímetro (**ARTIGO 1**);

2.2.6. Avaliar o potencial Leishmanicida *in vitro* dos derivados das poliaminas utilizando o método tradicional (**ARTIGO 2**);

2.2.7. Avaliar a atividade leishmanicida e avaliação de toxicidade dos complexos metálicos com lapachol (**ARTIGO 3**).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de *Leishmania* e manutenção

O parasito utilizado nesse trabalho foi a cepa de referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) da Organização Mundial de Saúde cedida pelo CLIOC FIOCRUZ RJ. Esta cepa foi tipada previamente como descrito por (Rocha *et al.*, 2010). Esta cepa também foi passada periodicamente em camundongos Balb/C (*Mus musculus*) para manter a infectividade *in vitro*.

Os parasitos foram cultivados em Meio M199 (Sigma, St. Louis, MO), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina (100U/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA), streptomycin (100 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA), glutamina (12,5 mM) (Sigma, St. Louis, MO), Hepes (40 mM) (Amresco, Solon, OH), adenina (0,1 mM) (Sigma, St. Louis, MO) e 2,5 µg/ml hemina (Sigma, St. Louis, MO). Os parasitos foram mantidos em garrafas para cultivo de células em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 ml, estéril (Sartstedt) em estufa BOD (FANEM, modelo 347CD) a 25° C (Pinheiro *et al.*, 2011). Para a manutenção dos parasitos foram realizados repiques semanais.

3.2. Transfecção dos parasitos

3.2.1. Plasmídeos B5793 e B5947

Os plasmídeos contendo o gene da GFP B5793 (piR1Phleo-GFP+(a)(sense) (Figura 6A) e o gene RFP B5947 piR1SAT-LUC(a) DsRed2(b) (Figura 6B) foram cedidos pelo Dr. Stephen M. Beverley da Washington University, St. Louis (USA). O plasmídeo B5793 foi utilizado no mestrado (2007-2009) (Rocha, 2009) e o plasmídeo B5947 foi utilizado mais recentemente no doutorado (2010). Em ambos os plasmídeos existem dois sítios de restrição para a enzima *SwaI* que divide a sequência circular em dois fragmentos lineares. O primeiro é maior e contém as sequências: SSU' (*small subunit RNA gene in rDNA locus* – subunidade pequena do gene no locus do DNA ribossomal) inicial e final de *L. major*, e é a parte responsável pela integração do fragmento de interesse no DNA genômico da *Leishmania* na região do rDNA por homologia. O B5793 possui o gene da proteína verde fluorescente (GFP) e o gene de resistência para o antibiótico Flecmonina e o B5947 possui o gene da proteína vermelha fluorescente (RFP) e o gene de resistência para o antibiótico Norsotricina. O segundo fragmento é menor e contém a sequência do gene de resistência à ampicilina e

inicialmente utilizado para selecionar as bactérias transformadas (Ha *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 2008).

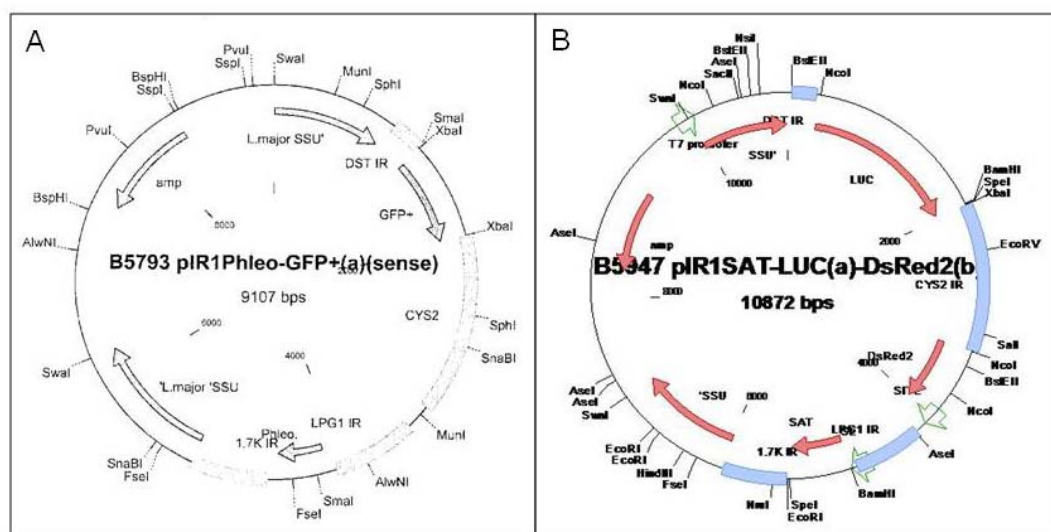


Figura 6: Mapa dos Plasmídeos. A) B5793 piR1Phleo-GFP+(a)(sense) (Rocha, 2009); B) piR1SAT-LUC(a) DsRed2(b) B5947.

3.2.2. Clonagem e produção dos plasmídeos

Os plasmídeos foram transformados utilizando bactérias competentes *Escherichia coli* TOP10 (Nishimura *et al.*, 1990). As células foram colocadas para crescer em tubos de 50 ml contendo LB (triptona a 1%, extrato de levedura a 0,5%, NaCl a 0,5%) líquido sob agitação (1 h, 37 °C). Posteriormente, as bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de Petri (100 x 20 mm) contendo LB/agar (1,8%) com a pressão seletiva de ampicilina (100 µg/mL).

Aleatoriamente, foram selecionadas colônias que foram crescidas em 5 ml em meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) sob agitação (37 °C). Foi realizada a purificação do plasmídeo por mini-prep (Qiagen). O produto foi submetido à digestão enzimática com *SwaI* (New England) (25 °C, 16 h) e os fragmentos de tamanhos esperados resolvidos em gel de Agarose a 1%. As bactérias contendo o inserto foram novamente colocadas para crescer em 200 mL de LB para posterior extração por midi-prep (Qiagen). A digestão com a enzima *SwaI* (New England) foi repetida e em seguida foi realizado um tratamento com fosfatase alcalina (Promega) para eliminar os grupos fosfatos e evitar junção das extremidades dos fragmentos. Para a retirada do sal, foi utilizado o kit DNA and Band Purification (GE). Assim obtivemos os fragmentos linearizados para a eletroporação. Ambos os fragmentos foram colocados em contato com os parasitos, porém só o maior possui a capacidade de integrar-se ao DNA.

3.2.3. Transfecção

O cultivo das formas promastigotas em fase logarítmica ($4-6 \times 10^6/\text{mL}$) foi centrifugado a $2100g$ por 10 minutos. Posteriormente foram lavados em PBS e centrifugados. Foram ressuspensos em tampão Cytomix (KCl a 120 mM, CaCl_2 a 0,15 mM, K_2HPO_4 a 10 mM, Hepes a 25 mM, EDTA a 2 mM e MgCl_2 a 5 mM, pH 7.6) (Segawa *et al.*, 2005). Cerca de 2×10^8 parasitos foram utilizados na transfecção de *L. (L.) amazonensis* sendo colocadas em cubetas de $0,4 \text{ cm}^3$ (BTX) (Kapler *et al.*, 1990). Nestas cubetas foram adicionados $10 \mu\text{g}$ de um dos plasmídeos digerido e os parasitos eletroporados a 1500 V por duas vezes com um intervalo de 10 seg. entre o primeiro e o segundo choque elétrico (Beverley & Clayton, 1993).

3.2.4. Clonagem de *Leishmania*

Após 24 horas da transfecção os parasitos foram plaqueados em meio semi-sólido com ágar nobre a 1% (Sigma, St. Louis, MO) em meio M199 (Sigma, St. Louis, MO) contendo o antibiótico seletivo fleomicina ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma, St. Louis, MO) para GFP e nourseotrisina ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma, St. Louis, MO) para RFP. Posteriormente, após o crescimento das colônias, que leva entre 7 a 15 dias, os mesmos foram coletados e plantados em meio líquido M199 (Ha *et al.*, 1996).

3.3. Avaliação da produção de fluorescência por Microscopia

Para verificar a produção da proteína GFP e RFP pelos parasitos fluorescentes foi realizada a visualização no microscópio de fluorescência. Foram avaliados os parasitos tanto na forma de promastigota quanto na forma amastigota intracelular. As promastigotas foram visualizadas diretamente da cultura, em lâmina e lamínula, acopladas ao Microscópio de Fluorescência Axio Observer A1 (Zeiss). As amastigotas intracelulares foram observadas infectando os macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C fêmeas. Para isso foram utilizadas placas de 6 poços contendo lamínulas circulares de 25mm (Fisher). Foram adicionados 4×10^5 macrófagos por poço deixando aderir por 16 a 18 horas. Posteriormente foi adicionado formas promastigotas na fase estacionária de *L. amazonensis* na concentração de 4×10^6 por poço. A visualização em microscópio de fluorescência foi obtida após a montagem dessas lamínulas em câmara Attofluor Cell Chamber (Molecular Probes). A fluorescência emitida foi analisada em diferentes tempos de infecção sendo escolhidos os tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a detecção de fluorescência as amostras foram expostas ao

comprimento de onda de excitação de 490-494 nm e emissão no filtro de LP 515 nm para GFP. Para RFP, a excitação foi medida usando o filtro BP546/12 nm e para emissão o filtro LP 590 nm. As imagens foram adquiridas pela câmera eletrônica AxioCam MRC e armazenadas em meio eletrônico.

3.4. Parâmetros de tamanho e granulosidade celular - Citometria de fluxo

Para avaliar se a transfecção não afetou a morfologia dos parasitos foram analisados os parâmetros de tamanho e granulosidade no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Mountain View, CA). Foram comparados as formas promastigotas dos parasitos LaWT, LaGFP e LaRFP. Os parâmetros utilizados foram: a FL1 para fluorescência verde e FL2 para a fluorescência vermelha, FSC-H (forward scatter) para tamanho e SSC-H (side scatter) para granulosidade. Foram analisados 20.000 eventos para cada amostra e os dados analisados no programa FlowJo 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)

3.5. Métodos de Triagem de drogas

O procedimento de obtenção de macrófagos murinos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) segundo a licença L-004/08.

3.5.1. Método clássico por contagem microscópica

Os macrófagos peritoneais (MØs) foram obtidos de camundongos BALB/C fêmeas de 6 semanas. Nestes, foram injetados 2 ml de tioglicolato de sódio (3%) via intraperitoneal. Após 72 horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, mergulhados em álcool 70% para desinfecção e imobilizados na posição decúbito dorsal. Após a exposição da cavidade peritoneal, os macrófagos foram coletados após injeção de 5 ml de Meio RPMI 1640 (Sigma®), 2 mM glutamina (Sigma®), 50 U/ml of penicilina (Invitrogen) and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen) sem soro. A suspensão celular foi recolhida com seringa. Os macrófagos peritoneais foram contados em câmara de Neubauer e sua viabilidade determinada por Azul de Trypan (1%). Para o teste tradicional foram plaqueados (2×10^5 células/poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm com volume final de 500µl por poço. Os macrófagos foram incubados em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 16 horas

para adesão. Os macrófagos foram então expostos às formas promastigotas de cultura na fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10:1 (2×10^6 parasitos/poço) (Berman & Lee, 1984; Morais-Teixeira *et al.*, 2008; Sereno *et al.*, 2005).

Após 5 horas de interação o sobrenadante contendo os parasitos livres foi removido e então, adicionado meio RPMI1640 com 10% de soro (500µl por poço).

Para comparar as susceptibilidades dos parasitos LaWT, LaGFP e LaRFP foi utilizada uma das drogas de uso corrente para o tratamento da leishmaniose a Anfotericina B (Cristalia). Para determinar a curva dose-resposta para posterior cálculo do IC₅₀ foram utilizadas 5 concentrações seriadas. As concentrações utilizadas para a Anfotericina B foram 2; 1, 0,5; 0,25 e 0,12 µg/ml.

Para validar a utilização dos clones LaGFP e LaRFP de *L. (L.) amazonensis* foram testadas as 10 moléculas sintetizadas a partir do Propranolol e identificadas por: 1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 5c e 5d. As concentrações utilizadas para cada uma destas moléculas foram de 50; 25; 12,5; 6,25; e 3,1 µg/ml. Essas concentrações também foram inicialmente utilizadas para outras substâncias testadas como os 18 compostos das poliaminas e os 7 complexos metálicos de lapachol. Para avaliar as infecções, controles sem a adição de drogas foram utilizados. Estas doses foram posteriormente transformadas em µM de acordo com a massa molecular de cada molécula para o cálculo do valor de IC₅₀. Neste teste, moléculas com valores de IC₅₀ maiores que 250 µM foram consideradas inativas.

Todas as amostras foram aplicadas em poços independentes durante 3 dias e acondicionados em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. Após 72 horas de exposição a estas moléculas, as lamínulas foram coletadas e coradas pelo método Panótico rápido (Laborclin Pinhais, Brasil) e posteriormente montada com Entellan® (Merck Darmstadt, Germany) sobre lâmina de vidro. Em cada ensaio era realizado o controle positivo (4 poços), no qual continha apenas os macrófagos infectados sem a adição de molécula. Para as drogas testadas cada concentração foi realizada em duplicata (2 poços independentes). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada através de análise em microscopia óptica (Pinheiro *et al.*, 2011).

As porcentagens de macrófagos infectados de experimentos independentes e duplicatas para cada amostra foram utilizadas para plotar curvas de regressão linear e calcular os valores de IC₅₀ utilizando o programa Microcal, Origin Software (Northampton, MA, USA) (Pinheiro *et al.*, 2011).

3.5.2. Método fluorimétrico

As condições do método fluorimétrico foram similares aos utilizados no método clássico como a retirada de macrófagos, quantidade de macrófagos plaqueados, taxa de infecção, quantidade de doses aplicadas no teste. Entretanto, foram necessárias algumas modificações como nas concentrações das moléculas, a placa utilizada é a de 96 poços preta com fundo transparente (Corning) e o volume final de cada poço de 100 μ L. As moléculas que apresentaram valores de IC_{50} maiores que 250 μ M foram consideradas inativas.

As concentrações utilizadas para Anfotericina B foram 5; 1; 0,2; 0,04 e 0,008 μ g/ml e Glucantime® (Sanofi Aventis) foram 10.000; 2.000; 400; 80 e 16 μ g/ml. Apenas os derivados do propranolol foram utilizados e as concentrações utilizadas foram de 500, 100, 20, 4 and 0,8 μ g/ml. Os macrófagos foram expostos diariamente às doses definidas por 3 dias consecutivos. Estas doses foram posteriormente transformadas em μ M.

Para o método fluorimétrico foi possível realizar análise cinética de 24, 48 e 72 horas de exposição às moléculas teste. A fluorescência vermelha foi captada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 560 nm e emissão de 620 nm e para a fluorescência verde a excitação foi de 472 nm e emissão de 512 nm. O espectrofluorímetro usado foi o SpectraMaxM5 (Molecular Devices) e os dados coletados pelo software Softmax 5.1. (Molecular Devices).

A fluorescência relativa captada foi obtida em experimentos independentes e triplicata das amostras possibilitando determinar as curvas doses resposta a partir dos valores expressos em unidades de fluorescência (FU). Também foi utilizada a regressão linear do programa Microcal, Origin Software (Northampton, MA, USA) e determinado os valores de IC_{50} .

3.5.3. Teste de citotoxicidade

O método colorimétrico de MTT ((3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma®) foi utilizado para determinar a viabilidade celular ou da linhagem celular de hepatoma denominada HepG2 A16 ou macrófagos peritoneais murinos. A linhagem celular HepG2 foi mantida em garrafas de poliestireno com meio RPMI 1640 (Sigma®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) em estufa a 37° C e 5% de CO₂. As culturas em monocamada com pelo menos 80% de confluência foram tripsinizadas, lavadas e plaqueadas em placas de cultura de 96 poços (Sarstedt) na concentração de 4×10^4 por poço. Para a adesão celular as placas foram incubadas por 16 horas e posteriormente as substâncias a serem avaliadas foram adicionadas em concentrações seriadas sendo a dose

máxima de 10 mg/ml, com exceção do antimoniato de meglumina (Glucantime) que iniciou em 150 mg/ml. Após 24 horas de exposição foi acrescentado o MTT (20 µl de uma solução a 5mg/mL) e incubado por 3-4 horas. O sobrenadante foi retirado e adicionado isopropanol ácido (HCl 0,1M) para dissolver os cristais de formazan e realizada a leitura em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices) nas absorbâncias de 570 nm e background de 670 nm.

O teste de citotoxicidade foi realizado também em macrófagos murinos apenas para os complexos metálicos de lapachol. A obtenção dos macrófagos peritoneais foi realizada da mesma forma descrita na seção 3.5.1. Depois desta primeira etapa de obtenção dos macrófagos o procedimento seguiu semelhante ao executado com as células HepG2. A única diferença foi a concentração de célula por poço (2×10^5).

Foram utilizados controles sem droga e a dose letal mínima de 50% das células (MDL_{50}) calculada no programa Microcal, Origin Software (Northampton, MA, USA) (Denizot & Lang, 1986; Madureira *et al.*, 2002). Os índices de seletividade (SI) foram calculados usando os valores de MDL_{50}/IC_{50} . Os valores aceitáveis para o SI devem ser maiores que 20 (Ioset *et al.*, 2009; Nwaka & Hudson, 2006).

3.6. Síntese dos derivados da diamina

Esta parte foi realizada pelo colaborador Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza (FARMANGUINHOS – FIOCRUZ, RJ).

Os derivados da diamina foram preparados utilizando a diamina comercial e sintetizados a partir da metodologia padrão. Uma solução de 0,5mol/L de BOC_2O (equivalente a 1,5 mMol) em $CHCl_3$ foi adicionado gota a gota a uma solução de 0,25 mol/L de diamina 1-9 (5 equivalentes) em $CHCl_3$ a 0°C. Após 24 horas a mistura foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida, a temperatura ambiente. O resíduo foi solubilizado em acetato de etila (30 ml), lavado em salmoura (3x 20 ml), seco ($MgSO_4$) e concentrado, produzindo diamina pura mono-BOC protegida 10-13. Posteriormente foi necessário realizar cromatografia para obter os compostos 14-18. Os compostos da diamina mono-BOC protegido foram purificados cromatografia em coluna de sílica gel ($CHCl_3/MeOH$, 95:5) e o rendimento foi de 50-73%. As estruturas estão apresentadas na Figura 7. Além disso, foi calculado o coeficiente de partição octanol/água ($cLog P$) para todos os 18 compostos obtidos usando o programa de predição fornecido no site Molinspiration (<http://www.molinspiration.com>).

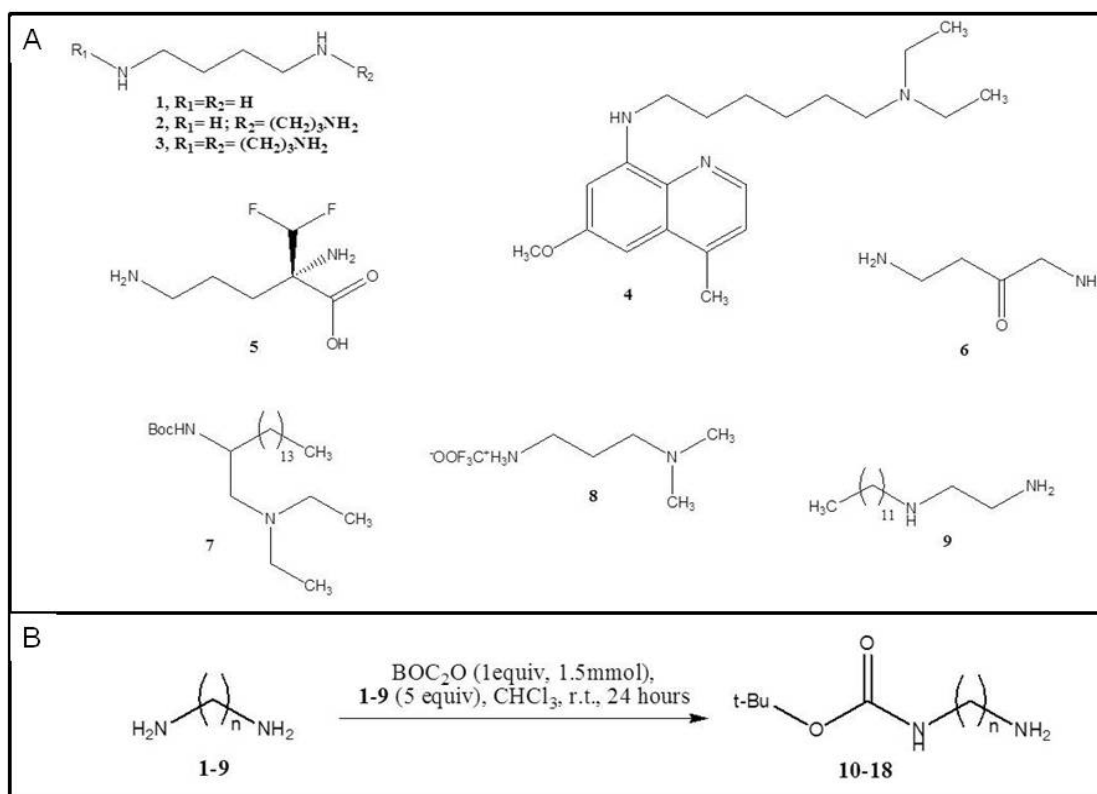


Figura 7: Síntese dos derivados da diamina. A) Estrutura de 9 moléculas sintetizadas. B) Transformação das 9 moléculas protegidas pelo mono-*t*-butiloxicarbonil (BOC).

3.7. Síntese dos derivados do propranolol

Esta parte foi realizada pela colaboradora Dra. Célia Maria Ferreira da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Na busca de novas drogas contra *T. cruzi* foi proposta a síntese de análogos do propranolol com o intuito de estudar a relação entre suas estruturas químicas e a atividade tripanosomicida. A síntese dos análogos baseou-se na metodologia utilizada para a obtenção de β -bloqueadores (Kaiser *et al.*, 1977). A síntese consistiu na reação do sal de potássio do naftol, gerado *in situ* seguido pela adição de epicloridrina. Na sequência, o epóxido I sofre abertura do anel oxirano com as seguintes aminas: isopropilamina, dimetilamina, piperidina e morfolina. Foram sintetizadas 7 substâncias, sendo que os cloridratos de 1-naftiloxi-2-propanol-3-piperidina e 1-naftiloxi-2-propanol-morfolina apresentaram atividade *in vitro* contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, nas concentrações de 366 $\mu\text{g/ml}$ e 752 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2001). Os análogos fenoxipropanolaminas foram sintetizados por estratégia de simplificação do anel naftol do propranolol e com a introdução de grupos doadores e retiradores de elétrons ($X=H, Cl, OMe$ e NO_2) na posição *para* do anel variando-se o grupo N-isopropila pelas aminas: piperidina e morfolina. Os análogos e seus sais foram

sintetizados e a elucidação estrutural confirmada por análise de RMN¹H e de ¹³C. O propranolol e seu cloridrato, juntamente com os derivados *p*-cloro, metoxi e nitro-fenoxipropanol isopropilamina retêm a atividade antagonista adrenérgica β-bloqueador (Main & Tucker, 1985). A substituição do grupo isopropilamina do propranolol ou dos derivados fenoxi por grupos heterocíclicos, tais como, piperidina ou morfolina foram propostas com o intuito de avaliar se a introdução desses grupos provoca perda da atividade antagonista β-bloqueadora e consequentemente poderiam ser avaliados seus potenciais tripanosomicida e leishmanicida. As estruturas químicas de cada uma das moléculas testadas para avaliação de sua atividade leishmanicida estão apresentadas abaixo (Figura 8).

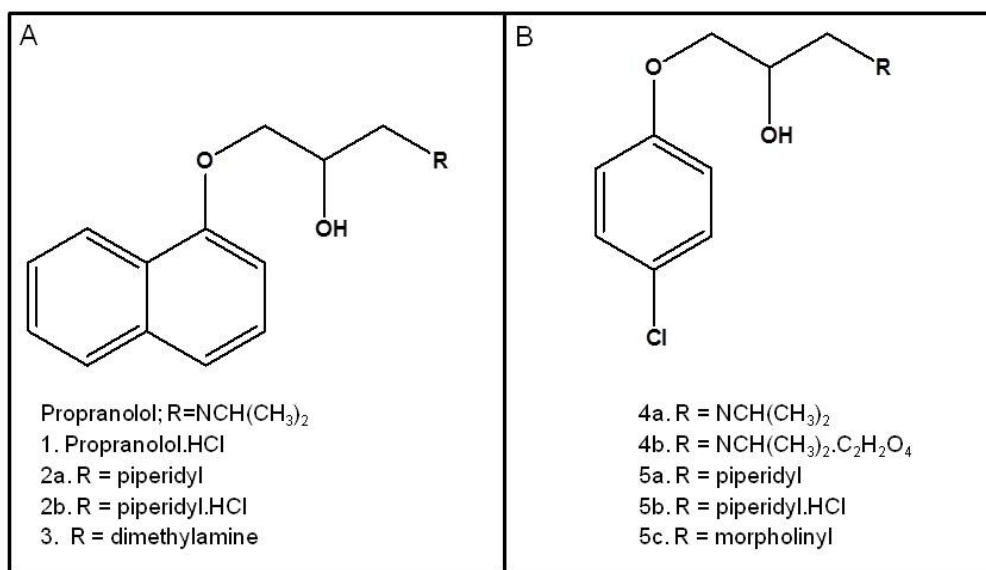


Figura 8: Propranolol e seus derivados. A) Estrutura base para 5 moléculas sintetizadas a partir do propranolol e cada radical inserido no R da estrutura. B) Estrutura base para o restante das moléculas transformado em cloridrato.

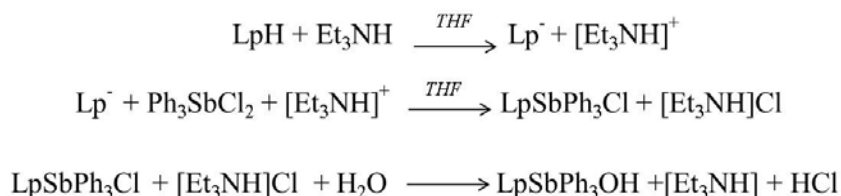
3.8. Síntese dos complexos de lapachol com Antimônio, Bismuto e Estanho

A síntese dos complexos de lapachol foi realizada pelo grupo da Dra. Cynthia Demicheli na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICEX).

Os complexos (Lp) (Ph₃Bi) O0.5 (Figura 9A) e (Lp) (Ph₃Sb) OH (Figura 9B) foram sintetizados seguindo o procedimento descrito por (Oliveira *et al.*, 2011). Para preparar (Lp) (Ph₃Sn) (Figura 9C) o mesmo procedimento foi usado. Adicionou-se trietilamina (70 ul) que foi adicionada a uma mistura de lapachol (0.121g, 0.5 mmol) e cloreto de trifetil estanho (IV) (193 mg, 0,5 mmol) em clorofórmio (20 mL). A mistura resultante foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente. A remoção do solvente foi realizada a vácuo e originou um material

sólido. O material foi em seguida dissolvido em acetona e precipitado em água. O cloridrato de trietilamônio formado durante a reação foi dissolvido e removido pela água. As análises elementares foram realizadas utilizando um Perkin-Elmer 240 Elemental Analyzer. A análise de absorção atômica do conteúdo de antimônio, bismuto e estanho foram realizadas em um espectrofotômetro modelo Hitachi 8200.

As seguintes equações propostas são para ilustrar a formação do complexo LpPh_3SbOH , assim como para os outros metais:



As estruturas de todos os compostos testados são demonstradas na Figura 10. Cloreto de trifenil antimônio (Figura 9 D), cloreto de trifenil bismuto (Figura 9 E), cloreto de trifenil estanho (Figura 9 F) e lapachol, foram obtidos da Aldrich ®. Trietilamina foi obtida de Sigma®.

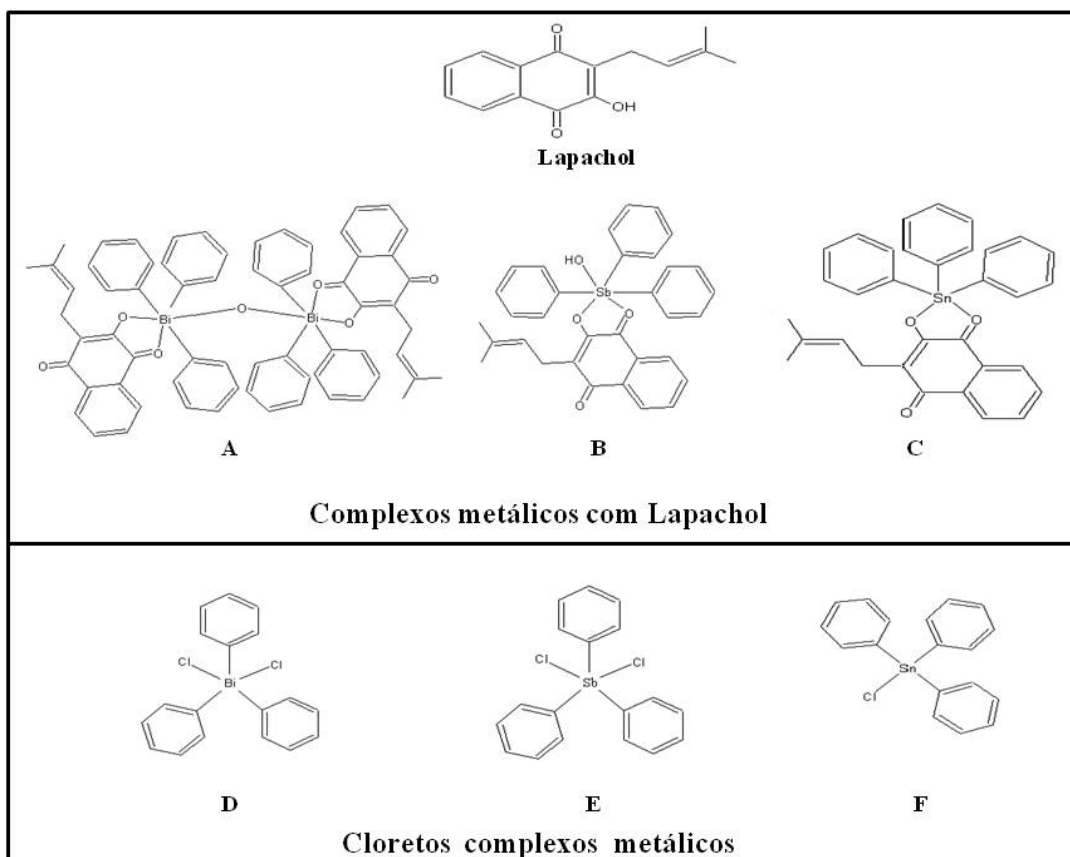


Figura 9: Complexos metálicos com o lapachol. A) Complexo Lapachol e antimônio, B) Complexo Lapachol e bismuto, C) Complexo Lapachol e estanho, D) Complexo cloreto de bismuto, E) Complexo cloreto de antimônio e F) Complexo cloreto de estanho.

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA). O teste Shapiro-Wilk foi empregado para analisar a distribuição gaussiana dos dados (Shapiro & Wilk, 1965) e o Teste Turkey para comparação múltipla dos dados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. A análise estatística foi usada para comparar a susceptibilidade das cepas de *L. (L.) amazonensis* WT, GFP e RFP frente às moléculas testadas no teste tradicional.

4. RESULTADOS

4.1. ARTIGO 1

Author's personal copy

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75 (2013) 282–291



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Parasitology

An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein[☆]Marcele N. Rocha^a, Célia M. Corrêa^b, Maria N. Melo^c, Stephen M. Beverley^d, Olindo Assis Martins-Filho^a, Ana Paula Madureira^e, Rodrigo P. Soares^{a,*}^a Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil^b Laboratório de Química Farmacêutica, DEFAR, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil^c Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^d Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA^e Departamento de Engenharia de Biotecnologia (DEBER), Universidade Federal de São João del-Rey, São João del-Rey, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2012

Received in revised form 25 October 2012

Accepted 16 November 2012

Available online 10 January 2013

Keywords:

Leishmania amazonensis

Green fluorescent protein

Red fluorescent protein

Drug screening

Chemotherapy

ABSTRACT

Fluorescent and colorimetric reporter genes are valuable tools for drug screening models, since microscopy is labor intensive and subject to observer variation. In this work, we propose a fluorimetric method for drug screening using red fluorescent parasites. Fluorescent *Leishmania amazonensis* were developed after transfection with integration plasmids containing either red (RFP) or green fluorescent protein (GFP) genes. After transfection, wild-type (LaWT) and transfected (LaGFP and LaRFP) parasites were subjected to flow cytometry, macrophage infection, and tests of susceptibility to current antileishmanial agents and propranolol derivatives previously shown to be active against *Trypanosoma cruzi*. Flow cytometry analysis discriminated LaWT from LaRFP and LaGFP parasites, without affecting cell size or granularity. With microscopy, transfection with antibiotic resistant genes was not shown to affect macrophage infectivity and susceptibility to amphotericin B and propranolol derivatives. Retention of fluorescence remained in the intracellular amastigotes in both LaGFP and LaRFP transfectants. However, detection of intracellular RFP parasites was only achieved in the fluorimeter. Murine BALB/c macrophages were infected with LaRFP parasites, exposed to standard (meglumine antimoniate, amphotericin B, Miltefosine, and allopurinol) and tested molecules. Although it was possible to determine IC₅₀ values for 4 propranolol derivatives (1, 2b, 3, and 4b), all compounds were considered inactive. This study is the first to develop a fluorimetric drug screening test for *L. amazonensis* RFP. The fluorimetric test was comparable to microscopy with the advantage of being faster and not requiring manual counting.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by the protozoa *Leishmania* and presenting a spectrum of clinical manifestations. It is widely distributed in 88 countries in Africa, Southern Europe, Central and South America, the Middle East, and Asia. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, a dermatotropic species, is the etiologic agent of cutaneous leishmaniasis (CL) and diffuse cutaneous leishmaniasis

(DCL) (Bittencourt et al., 1989). The latter is a chronic, progressive, polyparasitic variant exhibiting disseminated nonulcerative skin lesions (Desjeux, 2004).

Despite control methods, leishmaniasis cases have been increasingly reported in many urban areas (Conti and Melo, 2004). Factors involved in this expansion may include the lack of a vaccine, the adaptation of vectors and reservoirs to human environments, ineffective drug treatments, and the therapeutic failures (Croft et al., 2006a). *Leishmania amazonensis* is often associated with drug resistance, and conventional treatments may involve immunotherapy (Convit et al., 1989). In the Americas, for over 6 decades, parenteral administration of pentavalent antimonials (Sb-V), sodium stibogluconate (Pentostam®; GlaxoSmithKline, UK), and meglumine antimoniate (Glucantime®; Sanofi, Brazil) has been used for treating leishmaniasis. In India, where resistance to antimonials is common, other available chemotherapeutic agents include amphotericin B and pentamidine (Croft et al., 2006b; Mishra et al., 2007). However, the

[☆] Financial support: R. P. Soares, O. A. Martins-Filho, and M. N. Melo are research fellows supported by the National Council for the Development of Research of Brazil (CNPq; process 305042/2010-6). M. N. Rocha is supported by CNPq (process 142961/2009-7). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01123-09 PRONEX). S. M. Beverley is supported by the National Institutes of Health (AI21908 and 29646).

* Corresponding author. Tel.: +55-31-3340-7871; fax: +55-31-3205-3115.
E-mail address: rsoares@cpqar.fiocruz.br (R.P. Soares).

high toxicity and the lack of safe oral drugs underline the need for new antileishmanial treatments.

For many years, the classic microscopic method (Berman and Lee, 1984) has been used for screening compounds for efficacy against intracellular amastigote forms of *Leishmania*. Although it is labor intensive and cannot be automated, direct counting assay enables determination of the percent of infected cells and the number of amastigotes per cell. Half inhibitory concentration (IC_{50}) values can be ascertained either by monitoring reduction in the mean percent of infected macrophages or by the mean reduction in the number of amastigotes per macrophage. This method requires well-trained personnel and is subject to individual observer variation (Serenio et al., 2007). More importantly, intra- and interspecies variations in susceptibility may occur (Croft et al., 2006b). For example, *Leishmania donovani* (Old World) is more susceptible to Miltefosine® (Sigma, St. Louis, MO, USA) than are New World species (*Leishmania infantum*, *L. amazonensis*, *L. (Vannia) braziliensis*, and *L. (V.) guyanensis*) (De Moraes-Teixeira et al., 2011). The development of a semi-automated method using fluorescent parasites could more rapidly detect inter- and perhaps intraspecies variations.

Many efforts have been dedicated to the development of drug screening procedures to increase performance, efficacy, and reliability compared to the labor-intensive microscopy. These may include use of green fluorescent protein (GFP), bioluminescent (firefly luciferase), and colorimetric (chloramphenicol acetyl transferase, β -galactosidase and alkaline phosphatase) reporters (Dube et al., 2009; Gupta, 2011; Lang et al., 2005; Serenio et al., 2007). Emerging technologies using bioluminescent imaging have been adapted for the study of host-*Leishmania* chemotherapy. Consistent with this idea, 3 recent reports proposed the use of high-throughput screening (HTS) methods using *Leishmania* (De Muijder et al., 2011; Sharlow et al., 2010; Siqueira-Neto et al., 2010). Fluorescent reporter genes are promising tools for chemotherapeutic screening methods. They encode proteins in which expression is quantifiable and distinguishable from endogenous cell background. Other advantages include low cost, sensitivity, rapidity, no radioactivity, potential for bioimaging, higher efficiency, low toxicity, no substrate required, no need for permeabilization and fixation of cells, no additional steps required, and easy detection in a fluorimeter or by flow cytometry (Dube et al., 2009; Mehta et al., 2010; Varela et al., 2009).

In *Leishmania*, GFP parasites have been developed for *Leishmania major* (Bolhassani et al., 2011; Kram et al., 2008; Mißlitz et al., 2000; Plock et al., 2001), *Leishmania donovani* (Kaur et al., 2010; Singh and Dube, 2004; Singh et al., 2009), *Leishmania infantum* (Bolhassani et al., 2011; Kannau et al., 2001), *Leishmania mexicana* (Mißlitz et al., 2000), and *L. amazonensis* (Boeck et al., 2006; Chan et al., 2003; Costa et al., 2011; Demicheli et al., 2004; Mehta et al., 2008; Mehta et al., 2010; Okuno et al., 2003). Although red fluorescent protein (RFP) parasites of *L. major* have been developed (Ng et al., 2008), no chemotherapeutic method is available using those transfectants. However, chemotherapeutics employing RFP parasites have been produced for *Trypanosoma brucei* (Gibson et al., 2008; Peacock et al., 2007), *Trypanosoma cruzi* (DaRocha et al., 2004; Guevara et al., 2005; Pires et al., 2008), and *Plasmodium berghei* (Fievert et al., 2005). Although these parasites could be readily used for many purposes in cell biology, their biological fitness has not been properly assessed.

In this work, we generated transgenic *L. amazonensis* stably expressing GFP and/or RFP and compared their biological fitness to wild-type (WT) parasites. Subsequently, a host cell-based screening test using murine macrophages infected with LaRFP was conducted. Although both transfectants produced significant fluorescent signals in vitro, only LaRFP intracellular parasites were reliably detected by the fluorimeter. The intracellular detection of fluorescently viable *Leishmania* amastigote forms provides a more accurate approach for drug screening tests. This test was reproducible, in comparison to microscopy.

2. Material and methods

2.1. Mammalian cells and parasite strain

Animals were kept in the Animal Facility of the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Olfert et al., 1993). The procedures were approved by the Internal Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil (Protocol L-042/08). Mice were euthanized with CO_2 in an induction chamber prior to macrophage removal. The cell lineage Hep G2 A16 was derived from a human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC HB-8065) and obtained from the American Type Culture Collection line (ATCC) (Darlington et al., 1987). The World Health Organization (WHO) reference strain *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (FLA/B/1967/PHB) was used in this work. The strain was typed as previously described (Rocha et al., 2010). To ensure infectivity, parasites were continuously passaged in BALB/c mice (*Mus musculus*) prior to isolation of amastigotes from foot-pad lesions. Those forms were differentiated from promastigotes and grown at 25 °C in M199 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab, Campinas, Brazil), 40 mmol/L Hepes (Amresco, Solon, OH, USA), 0.1 mmol/L adenine (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.0005% hemin (Sigma), 0.0002% biotin (Sigma), 50 U/ml penicillin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 50 mg/ml streptomycin (Invitrogen) (Soares et al., 2002). Parasites were seeded in triplicate (1×10^5 cells/mL), and growth curves of LaWT, LaGFP, and LaRFP parasites determined daily using a Beckman Coulter Counter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) until cells reached a stationary phase ($>4.0 \times 10^7$ cells/mL).

2.2. Transfection

Leishmania amazonensis parasites were transfected with the constructs pIR1Phleo-GFP+(a)(sense) (B-5793) and pIR1SAT-LUC(a) DsRed2(b) (B5947) (Ng et al., 2008) containing GFP and RFP genes, respectively. The integrated constructs were linearized using *SmaI* prior to electroporation with 5–10 µg of DNA. Promastigotes in logarithmic phase (2×10^6 cells) were centrifuged at $2100 \times g$ for 10 min. The pellet was resuspended in Cytomix buffer (120 mmol/L KCl; 0.15 mmol/L $CaCl_2$; 10 mmol/L K_2HPO_4 ; 25 mmol/L Hepes; 2 mmol/L EDTA; and 5 mmol/L $MgCl_2$; pH 7.6) and washed twice in the same buffer. The parasites were electroporated in 500 µL of cytomix in 4-mm gap cuvettes (BTX, Holliston, MA, USA) at 1500 V, 25 µF (2 pulses between 10 s) (Robinson and Beverley, 2003) (with modifications, we used 10 µg/mL instead of 100 µg/mL of nourseothricin). Parasites were kept in M199 without antibiotics for 24 h. For selection, parasites were centrifuged and plated in semi-solid Noble agar (1%) in M199 medium containing phleomycin (10 µg/mL) (Sigma) and nourseothricin (SAT) (10 µg/mL) (Sigma) for GFP and RFP constructs, respectively. Colonies were selected and seeded in liquid M199 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) (Cultilab) (Ha et al., 1996). Live fluorescent promastigotes and intracellular amastigotes were placed on a slide for examination using a fluorescent microscope (Zeiss, Thornwood, NY, USA). LaGFP parasites were detected with an excitation wavelength of 490–494 nm and emission of LP 515 nm. LaRFP parasites were exposed to an excitation wavelength of BP546/12 nm and emission of LP590 nm. The acquired images were stored for AxioCam MRC electronically.

2.3. Flow cytometry analyses

To evaluate whether transfection affected the morphology of the cells, LaWT, LaGFP, and LaRFP *L. amazonensis* (1×10^6 /mL)

284

M.N. Rocha et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75 (2013) 282–291

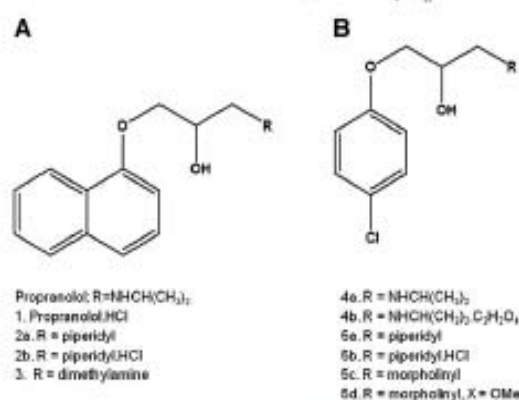


Fig. 1. Propranolol and synthetic derivatives tested for antileishmanial activity. (A) Basic structure of phenoxypipropylamine analogues. (B) Structure after simplification of naphthalene ring. Inserted radicals are represented below each structure.

were compared by flow cytometry. Measures were performed on a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Fluorescence, size (forward scatter–FSC-H), and granularity (side scatter–SSC-H) of LaWT, LaGFP, and LaRFP parasites were visualized using FL1 and FL2 modes. Twenty thousand events were obtained for each preparation (Ha et al., 1996). FlowJo software 7.6.4 (Tree Star, Ashland, OR, USA) was used for data analysis.

2.4. Optical microscopy analyses

To evaluate whether transfection affected macrophage infectivity and susceptibility to tested molecules, WT, GFP, and RFP clones were compared microscopically (Berman and Lee, 1984). BALB/c mice were injected intraperitoneally with 2 mL of 3% sodium thioglycollate medium (Merck, Darmstadt, Germany). Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were removed by peritoneal washing with RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and enriched by plastic adherence for 18 h. Cells (2×10^5 cells/well) were cultured in RPMI 1640 (Sigma), 2 mmol/L glutamine (Sigma), 50 U/mL of penicillin (Invitrogen), and 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) on 13-mm sterile glass coverslips (500 µL/well) (37 °C, 5% CO_2). Promastigote forms (LaWT, LaGFP, and LaRFP) in stationary phase (2×10^5 /well) were used for macrophage infection (ratio 1:10 macrophage/parasite). Plates were incubated for 4–5 h at 37 °C in 5% CO_2 . Noninternalized free-floating parasites were removed prior to drug exposure (Pinheiro et al., 2011). Macrophage infection (%) among LaWT, LaGFP, and LaRFP parasites was compared after 24 and 72 h.

In the microscopy test, propranolol derivatives and allopurinol were 2-fold serially diluted with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS at final concentrations of 50 → 3.12 µg/mL. Amphotericin B (a reference antileishmanial drug) was used at 2-fold decreasing concentrations of 1 → 0.062 µg/mL. Meglumine antimoniate (Glucantime®) was used at 2-fold decreasing concentrations of 2000 → 3.2 µg/mL. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) was used at 2-fold decreasing concentrations of 10 → 0.016 µg/mL. Infected macrophages were exposed to the compounds daily for 3 consecutive days. Fresh compounds were added each day. After this

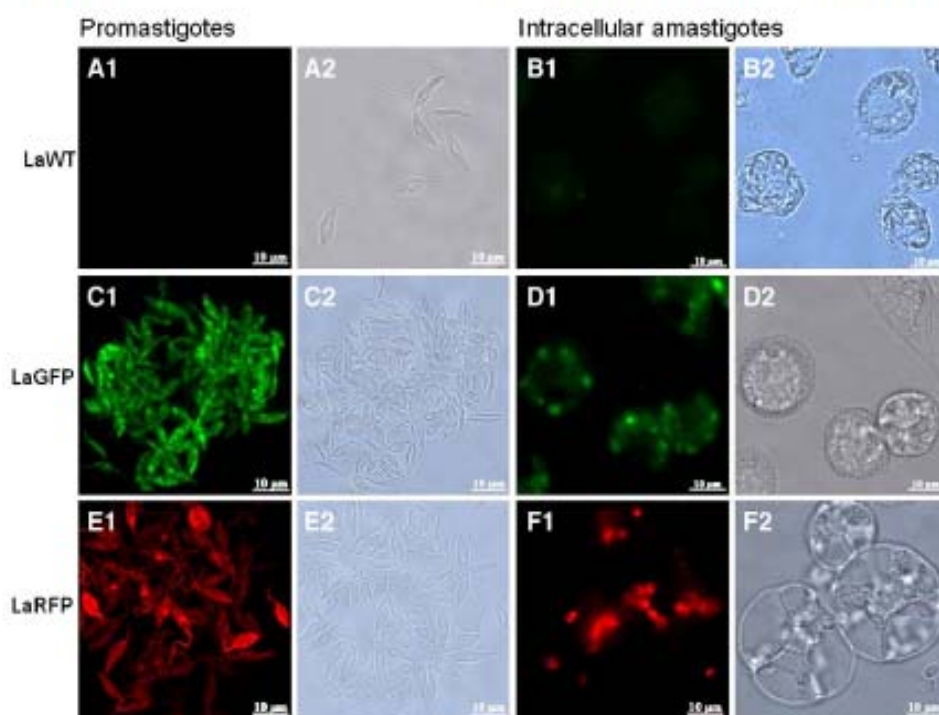


Fig. 2. Fluorescent and bright field images of *L. (L.) amazonensis* infected with green and red fluorescent proteins (LaGFP and LaRFP). A1 and B1) Differential interference contrast (DIC); A2 and B2) wild-type (WT) promastigotes and amastigotes (filter LPS15); C1 and D1) DIC; C2 and D2) LaGFP promastigotes and amastigotes (filter LPS15); E1 and F1) DIC; E2 and F2) LaRFP promastigotes and amastigotes (filter LPS90). Scale bar = 10 µm.

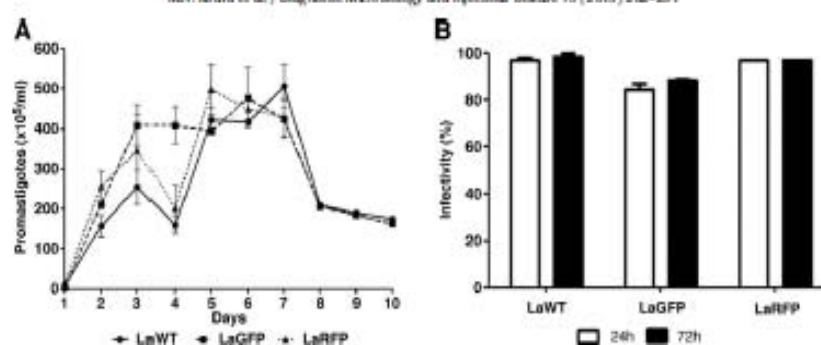


Fig. 3. Growth curve and macrophage infectivity of LaWT and transfected (LaGFP and LaRFP) *Leishmania amazonensis*. (A) *Leishmania amazonensis* parasites were grown in M199 medium and counts determined daily (initial concentration of 1×10^5 /ml). (B) Macrophage infectivity (%) was determined at 24 and 72 h post-infection.

period, coverslips were collected, stained with Panoptic (Laborclin, Pinhais, Brazil), and subsequently mounted with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) on glass slides. Negative controls included only infected macrophages and medium. Incubations were tested in duplicate in 2 independent experiments. After the determination of IC₅₀ values, data were transformed in micromoles per liter (μmol/L).

2.5. Spectrofluorometric analyses

Macrophages were obtained as described above and plated in dark 96-well plates with clear well bottoms (Corning, New York, NY, USA) in

RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS (37 °C, 5% CO₂). In order to evaluate fluorescence, LaGFP promastigotes were incubated with macrophages (2×10^5 /well) for 5 h (MOI 10:1) (Fig. 6A). On the other hand, LaRFP parasites were incubated with different macrophage concentrations ($10 \rightarrow 1 \times 10^5$ cells/well) using also MOI (10:1) in order to determine the best viable cell concentration prior to drug tests.

The concentration of 2×10^5 macrophages, which was the same as for the microscopy method, enabled parasite detection (~20,000 relative fluorescence units [RFUs]) and was chosen for the experiments (Fig. 6B). The optimal emission/excitation wavelengths were determined after a screening spectrum ranging from 350 to

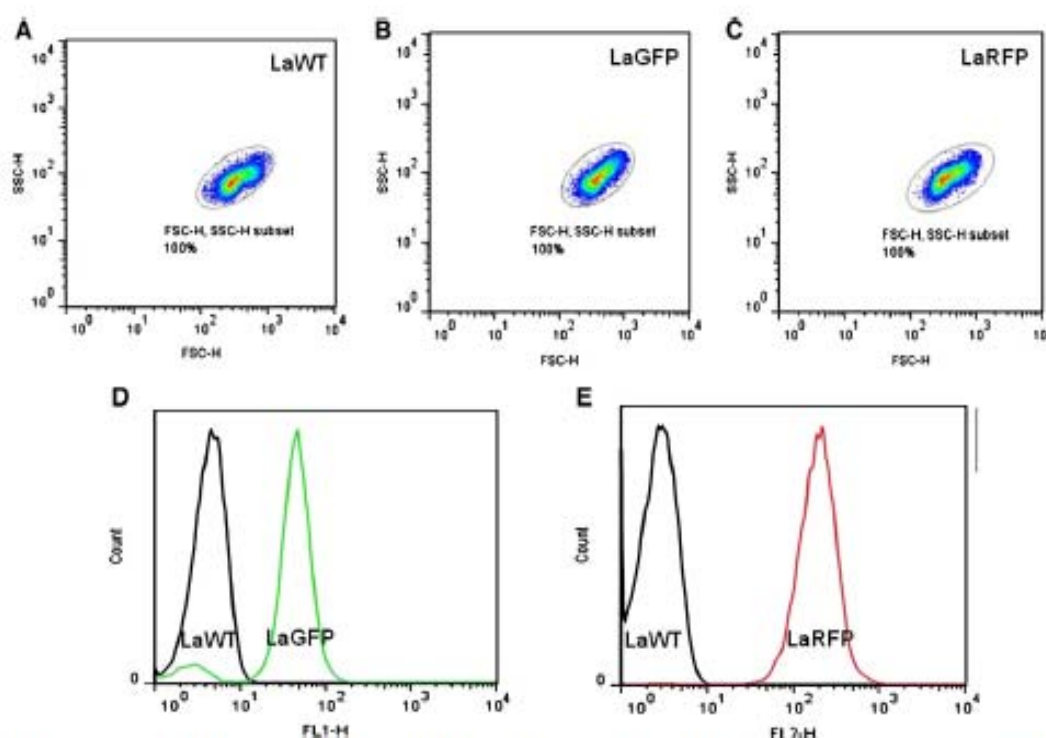


Fig. 4. Flow cytometry analyses of WT and transfected (LaGFP and LaRFP) *Leishmania amazonensis*. (A–C) Analyses of size (forward scatter—FSC-H) and granularity (side scatter—SSC-H) of *Leishmania amazonensis* promastigotes WT, LaGFP, and LaRFP, respectively. (D and E) Fluorescence comparison between WT (black line), LaGFP (green line) in FL1 and LaRFP (red line) in FL2.

Table 1

In vitro antileishmanial activity ($\mu\text{mol/L}$) of tested compounds against WT and transfected (LaGFP and LaRFP) *L. donovani* in the microscopy test.

	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) ^a		
	WT ^b	LaGFP	LaRFP ^c
Amphotericin B	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.16 ± 0.02
Meglumine antimoniate	1133 ± 246	ND ^d	552 ± 18.38
Miltefosine	7.6 ± 0.8	ND ^d	9.3 ± 0.1
Allopurinol	>250	ND ^d	>250
1	32.3 ± 10.0	20.2 ± 7.0	46.6 ± 3.2
2a	>250	>250	>250
2b	59.0 ± 19.5	41.9 ± 4.4	83.9 ± 23.5 ^f
3	80.5 ± 19.8	91.3 ± 7.0	86.0 ± 9.2
4a	210.5 ± 97.7	>250	>250
4b	56.3 ± 37.1	20.2 ± 5.0	139.2 ± 32.0 ^f
5a	>250	>250	>250
5b	>250	>250	>250
5c	>250	>250	>250
5d	>250	>250	>250

^a IC₅₀ = Half-maximal inhibitory response.

^b WT = Wild type.

^c LaGFP = Parasites transfected with green fluorescent protein.

^d LaRFP = Parasites transfected with red fluorescent protein.

^e ND = Not determined.

^f Values are statistically higher ($P < 0.05$, Tukey test).

750 nm (Fig. 6C). Initially, our standardization experiments using the fluorimeter used the same drug concentrations as the microscopy test (50 → 3.12 $\mu\text{g/mL}$). However, it was necessary to increase the concentrations (to 500 $\mu\text{g/mL}$) in order to obtain IC₅₀ curves. Propranolol derivatives and amphotericin B were 5-fold diluted (500 → 0.8 and 5 → 0.008 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Meglumine

antimoniate and allopurinol were also 5-fold diluted (2000 → 16 $\mu\text{g/mL}$), and Miltefosine was 5-fold diluted (50 → 0.016 $\mu\text{g/mL}$). Infected macrophages were exposed daily to the compounds for 3 consecutive days (freshly added each day), and analysis was performed after 72 h. Each dose of propranolol derivatives and control drugs was tested in triplicate in at least 2 experiments. The negative control included uninfected macrophages, and positive controls consisted of LaRFP- and LaGFP-infected macrophages. After the determination of IC₅₀ values, the data were transformed in micromoles per liter. The optimal wavelengths for LaRFP were 560 nm (excitation) and 620 nm (emission) (Fig. 6C), and for LaGFP were 472 and 512 nm, respectively (not shown). RFUs were determined in the fluorimeter (SpectraMaxM5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Inhibition of parasite growth was calculated from the percent of infected macrophages (100 cells) and RFU values using microscopy and the fluorescence method, respectively. The values were used for plotting curves and calculation of IC₅₀ values using MicroCal Origin software (MicroCal, Northampton, MA, USA) (Pinheiro et al., 2011). IC₅₀ values above 10 $\mu\text{mol/L}$ were considered inactive using *L. donovani* as reference (Nwaka and Hudson, 2006).

2.6. Cytotoxicity assay and selective index

Cytotoxicity was determined using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma) in the hepatoma cell lineage Hep G2 A16. Cells were kept in RPMI medium supplemented with 10% FBS, and confluent monolayers were trypsinized, washed in RPMI, and transferred to tissue culture plate 96 well (4×10^4 cells/well). Active compounds and amphotericin B in the same conditions described for microscopy were incubated with the

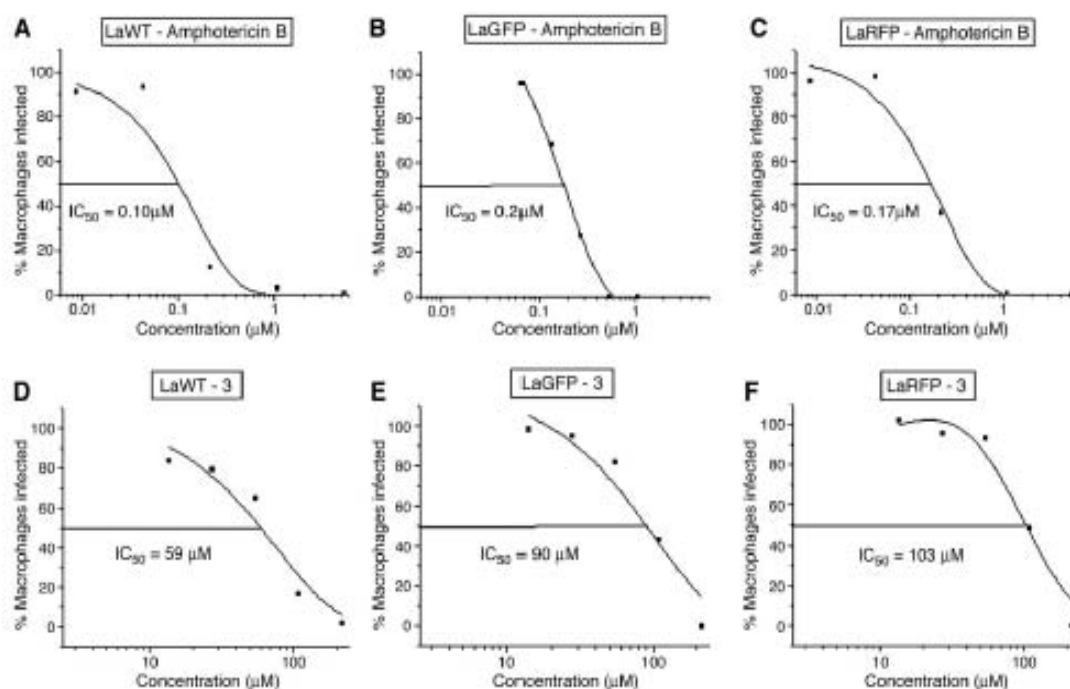


Fig. 5. Dose-response curves of tested molecules against intracellular *L. donovani* in the microscopy test. (A–C) Half inhibitory concentration (IC₅₀) of amphotericin B; (D–F) IC₅₀ of propranolol derivative 3; WT, wild type; LaGFP, transfected parasites with green fluorescent protein; LaRFP, transfected parasites with red fluorescent protein. Curves were obtained using MicroCal Origin Software. Results are a representation of 1 experiment.

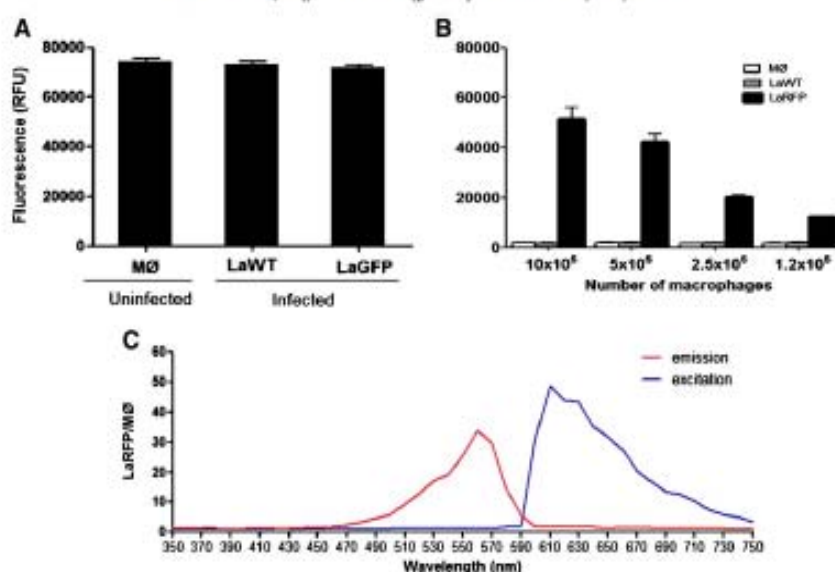


Fig. 6. Evaluation of infected macrophage (MØ) with LaWT and fluorescent parasites (LaGFP and LaRFP) in the fluorimeter. (A) Macrophages (concentration 2×10^6 /well) containing LaWT and LaGFP parasites (excitation/emission of 472/512 nm). (B) Macrophages containing LaWT and LaRFP parasites (excitation/emission of 560/620 nm). (C) Wavelength spectra to determine the best excitation/emission (red/blue lines) values for LaRFP intra cellular parasites in relation to uninfected macrophages (RFP/MØ).

cells (37 °C, 5% CO₂, 24 h). Colorimetric reaction was developed following incubation with MTT (37 °C, 4 h) and addition of acidified isopropanol (Denizot and Lang, 1986). The reaction was read spectrophotometrically (Spectramax M5) with a 570-nm filter and a background of 670 nm. Incubations were tested in triplicate in 2 independent experiments. The minimum dose that killed 50% of the cells (MLD₅₀) was determined (Madureira et al., 2002), and the values were plotted to generate dose–response curves as described above. The selective indexes (SI) were calculated using the MLD₅₀/IC₅₀ ratios (Joset et al., 2009; Nwaka and Hudson, 2006).

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5.0 software (Graph Prism, San Diego, CA, USA). The Shapiro–Wilk test was used to test the null hypothesis that the data were sampled from a Gaussian distribution (Shapiro and Wilk, 1965). The *P* value (*P* > 0.05) showed that the data did not deviate from Gaussian distribution. For this reason, analysis of variance and Tukey's multiple comparison test were used.

2.8. Chemistry

The propranolol derivatives were prepared using a standard synthetic methodology (Ing and Ormerod, 1952; Kaiser et al., 1977). The propranolol derivatives 2a, 3, 4a, 5a, 5c, and 5d were isolated as the free base. The compounds 2a, 4a, and 5a were converted to the corresponding hydrochloride 1, 2b, and 5b and oxalate (4b) salts prior to biological testing (Fig. 1).

3. Results

3.1. Fitness of transfected *Leishmania*

Leishmania amazonensis transfections with GFP and RFP were confirmed by direct microscopy in both promastigotes and amasti-

gotes (Fig. 2). To verify parasite fitness, growth curves and infectivity were evaluated. No differences were observed in parasite densities among LaWT, LaGFP, and LaRFP in M199 medium (*P* > 0.05, Tukey) (Fig. 3A). Infectivity for all strains was above 85% after 24 h and 89% after 72 h (Fig. 3B). Parasites were analyzed by flow cytometry for size (FSC) and granularity (SSC), and the morphometric profiles were similar amongst the isolates (Fig. 4A–C). Fluorescence clearly discriminated LaGFP/LaRFP parasites from LaWT (Fig. 4D and E). These results demonstrated that transfected parasites could be differentiated from LaWT by fluorescence alone.

3.2. Susceptibility evaluation using the classic microscopic test

Transfection with GFP and RFP proteins also included the insertion of resistance genes phleomycin and nourseothricin, respectively. To assess their influence on the resistance to amphotericin B and propranolol derivatives, LaGFP and LaRFP parasites were compared to LaWT using microscopy (Table 1). All propranolol derivatives were inactive against the parasite (IC₅₀ > 10 μmol/L) (Fig. 5) (Table 1). The IC₅₀ values obtained for control drugs (amphotericin B, meglumine antimoniate, and Miltefosine), and 1, 2b, 3, and 4 were compared among groups (LaWT × LaGFP, WT × LaRFP, and LaGFP × LaRFP). With the exception of meglumine antimoniate and 4b, statistical analysis did not reveal significant differences among groups (*P* > 0.05) (Table 1). Overall, transfection with GFP or RFP plasmids containing antibiotic resistance genes did not result in cross-resistance with the tested molecules.

Table 2

Evaluation of fluorescence persistence (RFLh) in macrophages (MØ) infected with *L. amazonensis* RFP (LaRFP) parasites according to time (h).

	5	24	48	72
MØ	31.95 ± 10.37	22.97 ± 20.3	30.20 ± 10.36	22.36 ± 53.7
MØ + LaRFP	330.03 ± 52.26	1.93.68 ± 28.06	1.61.62 ± 24.80	1.16.54 ± 19.88

Author's personal copy

288

M.N. Rocha et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75 (2013) 282–291

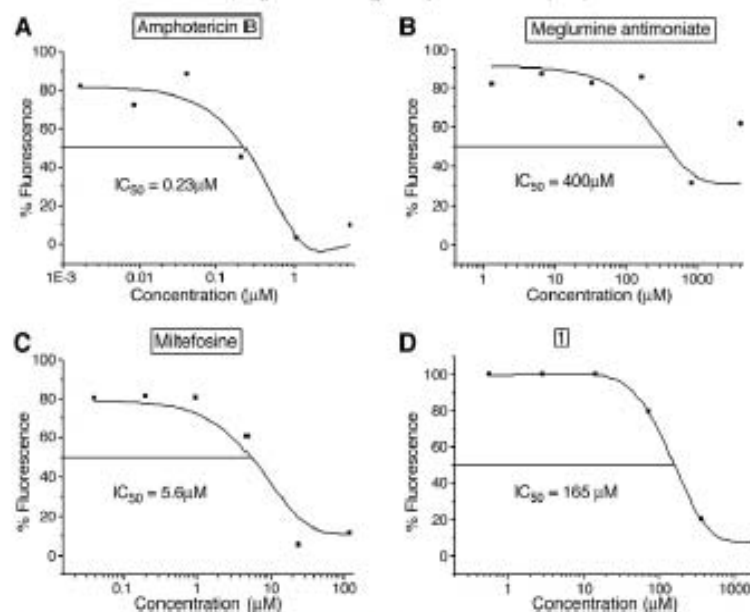


Fig. 7. Dose-response curves of tested molecules against intracellular *L. (L.) amazonensis* in the fluorimetric test. IC_{50} of amphotericin B (A), meglumine antimoniate (B), Miltefosine (C), and molecule 1 (D) against intracellular *L. (L.) amazonensis* transfected with red fluorescent protein (LaRFP). Curves were obtained using MicroCal Origin Software. Results are a representation of 1 experiment.

3.3. In vitro fluorimetric test

Since transfected fluorescent parasites were comparable to LaWT with respect to biological fitness (growth curve, macrophage infection, morphology, and drug susceptibility), the next step was to standardize an in vitro drug screening test. Although LaRFP intracellular parasites could be easily seen under fluorescence microscopy (Fig. 2D), the RFLs of those parasites were indistinguishable from LaWT and from uninfected macrophages (Fig. 6A). LaRFP promastigotes could be detected in the fluorimeter at concentrations above 1×10^7 cells (50,000 RFLs) (data not shown). LaRFP could be distinguished from LaWT and uninfected macrophages. The concentration of 2×10^5 macrophages was chosen since it was the concentration used for the microscopy method and enabled the detection of LaRFP parasites (~20,000 RFLs) (Fig. 6B). After screening, the optimal excitation/emission wavelengths of 560/620 were determined (Fig. 6C). For this reason only, LaRFP parasites were tested for in vitro assays in the fluorimeter. Seven LaRFP clones were obtained and evaluated for infection and fluorescence. No substantial differences were observed among the tested clones, and a single clone was selected for subsequent experiments. To analyze fluorescence persistence during infection, infected macrophages were observed at 5, 24, 48, and 72 h post-infection (Table 2). Maximum fluorescence detection was observed 5 h post-infection (33,000 RFLs). After 24 h, a decrease (~40%) was seen, consistent with parasite killing by the macrophage. After 24 h, fluorescence stabilized at approximately 4–5-fold the control. Negative control (background) represented by uninfected macrophages remained constant during the course of the experiment. These data confirmed the use of LaRFP parasites as a model for a fluorescent drug screening test.

As expected, all antileishmanial control drugs (except allopurinol) were active against *L. amazonensis*. Comparing the microscopy test and the fluorimetric test, all antileishmanial reference drugs showed similar IC_{50} values ($P > 0.05$, *t* test) (Fig. 7A–D). Again, none of the

propranolol derivatives tested was found active with the fluorimeter ($IC_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$) (Table 3). Selective indices for meglumine antimoniate and Miltefosine observed with microscopy were similar to those found using fluorimetry. For amphotericin B, the value calculated with the microscopic method was 2-fold that in the fluorimeter (Table 4) (Fig. 7A). These data indicate that the fluorimetric test is comparable to the microscopy assay.

4. Discussion

The absence of research and development for new medicines targeting tropical diseases has become a global concern. The search for new drugs, drug combinations, and protocols against tropical and neglected diseases has recently been stimulated (Chirac and Torreale, 2006; Moran et al., 2009). There is no available vaccine for leishmaniasis, and vector/reservoir control has limitations. Current

Table 3
Evaluation of in vitro antileishmanial activity ($\mu\text{mol/L}$) of tested compounds against *L. amazonensis* transfected with red fluorescent protein (LaRFP).

	Microscopy method ^a	Fluorimetric method ^a
Amphotericin B	0.16 ± 0.02	0.31 ± 0.16
Meglumine antimoniate	552 ± 18.8	480 ± 351
Miltefosine	0.3 ± 0.1	0.0 ± 5.0
Allopurinol	>250	>250
1	46.6 ± 3.2	197.5 ± 39.9
2a	>250	>250
2b	83.9 ± 23.5	180.6 ± 5.0
3	86.0 ± 9.2	301.5 ± 17.0
4a	>250	>250
4b	139.2 ± 32.0	283.8 ± 83.9
5a	>250	>250
5b	>250	>250
5c	>250	>250
5d	>250	>250

^a Values obtained for LaRFP parasites in Table 1 for comparison.

Table 4

Comparison of cytotoxicity and selective indexes of active substances in the microscopy and fluorimetric tests.

	Cytotoxicity ($\mu\text{mol/L}$) MLD ₅₀ ^b	Selective index (SI) ^a	
		Microscopy	Fluorimeter
Amphotericin B	92.2 $\pm$ 20.8	505	204
Meglumine antimoniate	4845.1 $\pm$ 1735.5	88	105
Miltefosine	166.9 $\pm$ 46.3	18	19

^a Based on the MLD₅₀/IC₅₀ ratios.^b MLD₅₀ = The minimum lethal dose that killed 50% of the cells in $\mu\text{mol/L}$.

control measures are based on patient treatment. Leishmaniasis chemotherapy is hindered by occurrence of side effects, treatment failure due to parasite resistance, HIV co-infection, and the need for intravenous administration (Croft et al., 2006a,b). A search for new chemotherapeutic compounds and methods of screening potential drugs against *Leishmania* is warranted (Alvar et al., 2006; Sereño et al., 2007).

Three recent reports have described high-throughput methods providing a more efficient way to identify candidate anti-parasitic compounds against *Leishmania* (De Muylder et al., 2011; Sharlow et al., 2010; Siqueira-Neto et al., 2010). An important advantage of those methods is their capability of screening a high number of compounds in promastigotes and in intracellular and axenic amastigotes. Our method requires no nuclear staining such as DAPI (De Muylder et al., 2011), Draq5 (Siqueira-Neto et al., 2010), or celltiter blue reagent (Sharlow et al., 2010). Since the plasmid is stably integrated, it is not necessary to keep the parasites in the presence of the selection antibiotic. More importantly, our method allows analysis concomitant with that of the host cell. Although our method could be considered medium throughput, it has the advantage of being less costly than the automated image system. A plate reader is more accessible and does not require sophisticated image capturing, analysis software, and expensive maintenance. Ours and the 3 above-mentioned HTS methods are summarized in Table 5. Here, it was described for the first time that transfection did not affect LaGFP or LaRFP parasite fitness in any parameter studied. It was shown that LaGFP parasites were not suitable for fluorimetry, whereas RFP *L. amazonensis* (LaRFP) were successfully detected. Many recent studies have determined the activity of chemical- or plant-derived compounds against *L. amazonensis* (Aguar et al., 2010; Garcia et al., 2010; Junior et al., 2010; Khouri et al., 2010; Pinheiro et al., 2011; Souza-Fagundes et al., 2010). Although IC₅₀ values could be determined for compounds 1, 2b, 3, and 4b using both assessed methods, none of our 10 propranolol derivatives was considered active (IC₅₀ >10 $\mu\text{mol/L}$) (Joiset et al.,

2009). It is important to point out that the cut-off value was established for *L. donovani*, an Old World viscerotropic species. However, for the dermatropic and viscerotropic New World species, the value may vary. For example, with the reference drug Miltefosine, IC₅₀ values for *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* were 19-fold that of *L. donovani* (De Moraes-Teixeira et al., 2011).

With flow cytometry, LaGFP parasites could be detected in both amastigotes and promastigotes (Bolhassani et al., 2011; Siqueira-Neto et al., 2010); hence not only LaGFP, but also LaRFP parasites, could be distinguished from LaWT using this technique. This could only be achieved with LaGFP after macrophage lysis as previously demonstrated using a spectrofluorimeter (Costa et al., 2011). One of the main advantages of using LaRFP is the elimination of the lysis step. In our model, the macrophage green background fluorescence was a determinant in hindering fluorimeter detection of LaGFP parasites. Similar to our data, LaGFP promastigote detection was also observed by Boeck et al. (2006). However, those authors achieved intracellular detection of episomal LaGFP parasites and this may be due to differences in the wavelengths used (435 nm excitation/538 nm emission).

However, in the fluorimeter, LaGFP parasites could not be distinguished from infected or uninfected LaWT macrophages (Fig. 6A). This can be attributed to the slight green background fluorescence in mouse macrophages (Fig. 2B). In our study, only LaGFP promastigotes could be detected in the fluorimeter in numbers above 1×10^7 cells (data not shown).

Transfection did not affect parasite morphology (Figs. 2 and 4), growth curves (Fig. 3), and infectivity in mouse (data not shown). The possibility of cross-resistance with the antibiotics used during selection is a concern when using transfected parasites. By using stable integrated plasmids, the requirement for selective drugs is avoided. With the exception of 2 molecules (Table 3), transfection did not affect drug susceptibility in either LaGFP or LaRFP parasites. However, these exceptions are likely to be due to variations in the microscopy method.

Preliminary results using propranolol have shown activity against trypanastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Hammond et al., 1984). Ten new propranolol derivatives were evaluated for their in vitro activity against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* using both microscopic and fluorimetric assays. All proved inactive by both methods.

This is the first description of a fluorimetric drug screening test for *L. amazonensis* using LaRFP parasites. This procedure was faster, suitable for medium throughput, accessible, and was comparable to microscopy with minimal modifications. Transfection of the parasites with GFP or RFP genes did not affect parasite biological fitness.

Table 5

Summary of drug screening protocols against *Leishmania*.

Type of screening	Analyses type	Need for substances/dyes	Parasite stage	Applicability to any parasite strain/host cell	Host cell	Species	Reference
HTS	Resazurin sodium salt (Sigma, St. Louis, MO, USA) Draq5 (DNA marker)	Yes	Promastigote	Yes/no		<i>L. major</i>	Siqueira-Neto et al., 2010
HTS	GillTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA) (ATP-bioluminescence) DAPI (DNA marker)	Yes	Intracellular amastigote Promastigote	Yes/yes	THP1	<i>L. major/L. donovani</i> <i>L. donovani</i>	De Muylder et al., 2011
HTS	GillTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA) GillTiter Blue Reagent	Yes	Intracellular amastigote Axenic amastigote	Yes/yes	THP1		
MTS	RFP fluorescence	No	Promastigote Intracellular amastigote	Yes/no Yes/yes	Marine macrophages	<i>Leishmania</i> sp. <i>L. amazonensis</i>	Sharlow et al., 2010

Acknowledgment

The authors thank Dr. Tânia Maria de Almeida Alves for support with the fluorimetric experiments through the Programme for Drug Development and Discovery (P3D).

References

- Aguilar MG, Pereira AM, Fernandes AP, Ferreira LA. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical pyrimethamine and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4699–704.
- Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006;61:223–74.
- Berman JD, Lee LS. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *J Parasitol* 1984;70:220–5.
- Bittencourt A, Baral A, De Jesus AR, De Almeida RP, Grimaldi J Jr. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989;84:585–6.
- Boerdj P, Bandeira-Falcao CA, Leal JC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem* 2006;14:1538–46.
- Bolhassani A, Taheri T, Tadolini V, Zamanlou S, Zadehfard F, Seyedi N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Exp Parasitol* 2011;127:637–45.
- Chan MM, Bulinski JC, Chang KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitol Res* 2009;80:266–71.
- Chinai P, Torreele E. Global framework on essential health R&D. *Lancet* 2006;367:1580–1.
- Corvitt J, Castellanos PL, Ulrich M, Gomes M, Rondon A, Pinardi ME, Rodriguez N, Brown BK, Ferreira S, Vacciolo L, et al. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989;160:104–15.
- Costa SS, de Assis Galim M, Rossi-Bergmann B, Góes FT, Giorgio S. Use of in vivo and in vitro systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. *Komans J Parasitol* 2011;40:357–64.
- Croft SL, Seibert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006a;123:399–410.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006b;19:111–26.
- Darlington CJ, Kelly JH, Bullone GJ. Growth and hepatocellular gene expression of human hepatitis cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987;23:349–54.
- Dalocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res* 2004;92:113–20.
- De Moura-Teixeira E, Damasceno QS, Galuppo MK, Romasão AJ, Rabello A. The in vitro leishmanicidal activity of benadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:475–8.
- De Moulder G, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKenrow JH. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1253.
- Demicheli C, Ochoa R, da Silva J, Falcao CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AI, Simister RD, Frezard F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:100–3.
- Denzler F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986;89:271–7.
- Desjard P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305–18.
- Dube A, Gupta R, Singh N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2009;25:432–9.
- Fawcett U, Engelmann S, Zoughde S, Stange J, Ng B, Matuszewski K, Liebes L, Yee H. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 2005;3:e192.
- Garcia M, Munoz L, Montalvo AM, Scull R. Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharm Biol* 2010;48:1053–8.
- Gibson W, Prasad L, Ferris V, Williams K, Bailey M. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 2008;1:4.
- Gostijo CM, Melo MN. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7:338–40.
- Guevara P, Diaz M, Rojas A, Cisante G, Abreu-Bland MT, Umezawa E, Vazquez M, Levin MJ, Anz N, Ramirez J. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. *J Med Entomol* 2005;42:48–56.
- Gupta S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* 2011;133:27–39.
- Ha DS, Schwab JK, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;77:57–64.
- Hammond DJ, Geyer B, Guttridge WE. A novel series of chemical structures active in vitro against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984;78:91–5.
- Ing HR, Omond WE. The synthesis and local anesthetic properties of arylazopyranolamines. *J Pharm Pharmacol* 1952;4:21–6.
- Jacob JR, Brun R, Wendler T, Kaiser M, Yardley V. Drug screening for kinetoplastid diseases: a training manual for screening in neglected diseases. DNDI and Pan-Asian Screening Network; 2009. p. 1–74.
- Junior GG, de Assis PA, Silva PP, Sousa SC, de Andrade NG, Barbosa TP, et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania dogieli*. *Bioorg Chem* 2010;38:279–84.
- Kaiser C, Jen T, Garvey E, Bowles WD, Colella DF, Wardle J Jr. Adrenergic agents 4. Substituted phenoxypyrrolamine derivatives as potential beta-adrenergic agonists. *J Med Chem* 1977;20:887–92.
- Kanau SW, Göttsch F, Hehl AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3854–6.
- Kaur J, Sander S, Singh N. Molecular docking, structure-activity relationship and biological evaluation of the antileishmanial drug monensin as a proteinase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1742–8.
- Khoury R, Novais F, Santana G, de Oliveira CI, Vannier dos Santos MA, Sima A, et al. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *PLoS One* 2010;5:e14394.
- Kiani D, Thale C, Kolodziej H, Kiderlen AF. Intracellular parasite killing: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods* 2008;333:79–88.
- Liang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 2005;7:383–92.
- Madureira AM, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Ferreira MJL, Cunha AP, Rosário VE. Antileishmanial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe Island. *J Ethnopharmacol* 2002;81:23–9.
- Melita SR, Huang R, Yang M, Zhang XQ, Kelli R, Chang KP, et al. Real-time in vivo green fluorescent protein imaging of a murine leishmaniasis model as a new tool for *Leishmania* vaccine and drug discovery. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1764–70.
- Melita SR, Zhang XQ, Badano R, Spina C, Day J, Chang KP, Schooley RT. Flow cytometric screening for anti-leishmaniasis in a human macrophage cell line. *Exp Parasitol* 2010;126:817–20.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007;14:153–60.
- Milioni A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T. Targeted integration into a vRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 2000;107:251–61.
- Morán M, Guzmán J, Kopan AL, McDonald A, Janssens N, Omsere B, et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? *PLoS Med* 2009;6:e30.
- Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Moss P, et al. Migratory dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 2009;4:e1000222.
- Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:941–55.
- Obana T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Matsumoto Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing eGFP or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Exp Anim* 2009;52:109–18.
- Oliver ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide To The Care And Use Of Experimental Animals. Saskatoon, Canada: Canadian Council on Animal Care, Saskatoon; 1993.
- Prasad L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Dynamics of infection and competition between two strains of *Trypanosoma brucei* in the mouse fly observed using fluorescent markers. *Kinetoplastid Biol Dis* 2007;6:4.
- Pinheiro AC, Rocha MN, Nogueira PM, Nogueira TC, Jansen IF, de Souza MV, Soares RP. Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-*n*-butyl-*n*-carboxyl-protected diamines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:273–8.
- Pires SF, Dalocha WD, Freitas JM, Oliveira LA, Riten GT, Machado CR, et al. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int J Parasitol* 2008;38:289–97.
- Plack A, Sokolowska-Köhler W, Presher W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Exp Parasitol* 2001;97:141–53.
- Rubinstein KA, Beverley SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2009;128:217–28.
- Rocha MN, Margonari C, Prestes IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:401–9.
- Sereem D, Cordeiro da Silva A, Mathias-Deaude F, Ouellet A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007;56:3–7.
- Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965;52:591–611.
- Shawlow ER, Lyda TA, Dodson HC, Mustafa G, Morris MT, Leimgruber SS, et al. A target-based high throughput screen yields *Trypanosoma brucei* histonease small molecule inhibitors with antiparasitic activity. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e100050.

Author's personal copy

MN. Ruda et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75 (2013) 282–291

291

- Singh N, Dube A. Short report: fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:400–2.
- Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sankar S, Dube A. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable *ex vivo* drug screening. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:370–4.
- Siqueira-Neto JL, Song OK, Oh H, Sohn JH, Yang G, Nam J, Jang J, et al. Anti-leishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e875.
- Soares RP, Macedo ME, Raposo C, Gonijo NF, Almeida E, Gazzinelli RT, et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;121:213–24.
- Souza-Fagundes EM, Costa BB, Reis LH, Romanha AJ, Correa-Oliveira R, Rosa CA, et al. In vitro activity of hyposphingosin from *Leishna strigosa*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:1054–61.
- Varela MR, Munoz DL, Robledo SM, Kelli BK, Dutra S, Chang KP, Markus C. *Leishmania (Mannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of anti-leishmanial drug. *Exp Parasitol* 2009;122:134–9.

4.2. ARTIGO 2

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 71 (2011) 273–278

DIAGNOSTIC
MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS
DISEASEwww.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Parasitology

Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-*t*-butyloxycarbonyl-protected diamines[☆]

Alessandra C. Pinheiro^a, Marcele N. Rocha^b, Paula M. Nogueira^b, Thaís C.M. Nogueira^{a,c},
Liana F. Jasmim^a, Marcus V.N. de Souza^{a,c}, Rodrigo P. Soares^{b,*}

^aInstituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 21041-250 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bCentro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^cInstituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CP 68363, 21945-970 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 24 April 2011; accepted 17 June 2011

Abstract

Leishmania amazonensis is the etiologic agent of the cutaneous and diffuse leishmaniasis. This species is often associated with drug resistance, and the conventional treatments exhibit high toxicity for patients. Therefore, the search for new antileishmanial compounds is urgently needed since there is no vaccine available. In this study, using the in vitro traditional drug screening test, we have analyzed the effects of a series of diaminoalkanes monoprotected with *t*-butyloxycarbonyl (BOC) against *L. amazonensis*. Among the 18 tested compounds, 6 exhibited antileishmanial activity (2, 7–9, 17, and 18). Best IC₅₀ values (10.39 ± 0.27 and 3.8 ± 0.42 µg/mL) were observed for compounds 17 and 18 (H₂N(CH₂)_nNHBoc, *n* = 10 and 12), respectively. Although those compounds had higher lipophilicity as indicated by their cLog *P* values, compound 17 was very toxic. Determination of the selective indexes indicated that 50% of the active compounds were very toxic for HepG2 cells. However, compounds 2, 8, and 18 had good lipophilicity and were less toxic among all polyamine derivatives tested. The chemical properties of antileishmanial diamine derivatives, such as lipophilicity and cytotoxicity, are relevant factors for the design of new drugs. A higher lipophilicity is likely to improve the chances of reaching this intracellular parasite.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; Diamine; BOC; Chemotherapy; Selective index

1. Introduction

Leishmaniasis are a spectrum of clinical manifestations caused by the protozoan parasite *Leishmania*. It is estimated that 12 million people are affected by the disease in 88 countries in Africa, Southern Europe, Central and South America, the Middle East, and Asia. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a New World member of the *Leishmania mexicana* complex, has been identified as a dermatotropic

species, whose symptoms include cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis (LCD). LCD is characterized by a chronic, progressive, polyparasitic variant and is manifested by disseminated nonulcerative skin lesions (Dejeux, 2004; Herwaldt, 1999).

Although the disease is treatable, the lack of a vaccine, the adaptation of the vector and reservoirs to human environments, and the therapeutic failure have made the control of the disease difficult. In addition, there is no medication that is both completely safe and efficacious for all *Leishmania* and clinical manifestations (Croft et al., 2006a). In the Americas, for over 6 decades, parenteral administration of the pentavalent antimonials (Sb-V) sodium stibogluconate (Pentostam[®]) and meglumine antimoniate (Glucantime[®]) has been used for treating all types of leishmaniasis. In places where resistance to antimonials is common, such as India, other common chemotherapeutic treatments include amphotericin B and pentamidine (Croft et al., 2006b; Mishra et al.,

[☆] R.P. Soares is supported by the National Council for the Development of Research of Brazil (CNPq) (305042/2010-6). M.N. Rocha is supported by CNPq (552072/2009-5). P.M. Nogueira is supported by Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. This project was approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) in FIOCRUZ, Brazil (Protocol L-042/08). A.C. Pinheiro and M.N. Rocha contributed equally to this manuscript.

* Corresponding author. Tel.: +55-31-3349-7766; fax: +55-31-3295-3115.
E-mail address: soares@cqqr.fiocruz.br (R.P. Soares).

2007). Since the development of the antimonial drugs in the 1940s, only recently was the oral drug miltefosine tested against leishmaniasis (Sundar et al., 2002). However, the relative high toxicity and the lack of safe oral drugs still underline the need for new leishmanicidal drugs.

In the last decades, due to their biological activities, naturally occurring PAs, analogues, or conjugates have become of great interest in different research areas (Kargiannis and Papaioannou, 2000). Therefore, the natural PAs putrescine **1**, spermidine **2**, and spermine **3** found in high levels in *Leishmania* are essential for cell growth and differentiation in either eukaryotic or prokaryotic cells (Vannier-Santos et al., 2008). In general, polyamines have been postulated to have anti-inflammatory and antioxidant properties (Lagishetty and Naik, 2008). Early studies indicated the mechanism of action of spermine and those may include inhibition of the cytochrome *c* reduction initiated by formyl-Met-Leu-Phe or phorbol myristate acetate-stimulated human granulocytes, inhibition of the Fe(III)/xanthine oxidase-stimulated lipid peroxidation of brain phospholipid liposomes, and inhibition of the Fe(II)-induced depolymerization of hyaluronic acid (Løvaas and Carlin, 1991). It has been suggested that PAs exert at least 2 different anti-inflammatory mechanisms: the first one is mediated by the synthesis of an anti-inflammatory protein (vasoregulin) (Oyanagui, 1984) and the second one is their direct action on leucocytes as modulators of calcium-dependent immune processes (Theoharides, 1980). Furthermore, the specific *Leishmania* polyamine metabolism pathway may increase the chances of a better selectivity in mammalian cells, since abandoning of the treatment by the patients due to serious side-effects is a major concern (Croft et al., 2006b).

In this context, synthesized diamino derivative PA analogues have emerged as promising compounds against leishmaniasis and other parasitic infections such as malaria. However, most of the studies reported to date have evaluated their activity against promastigotes or axenic amastigotes either in *L. amazonensis* or in *L. infantum* (Costa et al., 2009; Del Olmo et al., 2002; Labadie et al., 2004; Tavares et al., 2005). This is the first study using PA analogues in the natural intracellular model of infection. This work described the synthesis of a series of mono-protected diamines with *t*-butoxycarbonyl (BOC). In order to observe the relative contribution of these subunits to the leishmanicidal activities of PA derivatives, the compounds were incubated in the presence of macrophages containing intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*. Also, PA derivatives' cytotoxicity and selective index were estimated using the human hepatoma HepG2 cell line.

2. Materials and methods

2.1. Chemistry

The diamine derivatives were prepared using commercial diamines and a standard synthetic methodology. Briefly, a

0.5 mol/L solution of BOC₂O (1 equiv, 1.5 mmol) in CHCl₃ was added dropwise to a 0.25 mol/L solution of diamine **1–9** (5 equiv) in CHCl₃ at 0 °C. After 24 h at room temperature, the reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was solubilized in ethyl acetate (30 mL), washed with brine (3 × 20 mL), dried (MgSO₄), and concentrated, affording pure mono-BOC-protected diamine **10–13**. Further column chromatography purification (CHCl₃/MeOH, 95:5) was necessary to obtain compounds **14–18**. After column chromatography purification on silica gel, the mono-BOC-protected diamine compounds were obtained in 50–73% yield. Also, a calculated octanol/water partition coefficient (cLog *P*) was obtained for compounds **1–18** by using the online prediction program provided at the Molinspiration website (<http://www.molinspiration.com>).

2.2. Parasite maintenance

The World Health Organization (WHO) reference strain of *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) was used and typed as previously described (Rocha et al., 2010). To ensure infectivity, parasites were always kept in BALB/c mice (*Mus musculus*) prior to isolation of amastigotes from foot-pad lesions. Amastigote forms differentiated into promastigotes were grown at 25 °C in MI99 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 40 mmol/L HEPES, 0.1 mmol/L adenine, 0.0005% hemin, 0.0002% biotin, and 50 U/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin (Soares et al., 2002).

2.3. Purification of murine peritoneal macrophages and cell culture

Macrophages and infection were performed as reported with modifications (Berman and Lee, 1984; Neal and Croft, 1984). BALB/c mice were injected intraperitoneally with 2 mL of 3% sodium thioglycollate medium. After 72 h, peritoneal macrophages were removed by washing with cold RPMI 1640 medium and enriched by adherence in round glass coverslips (13 mm) placed in a 24-well culture plate. Cells (2×10^5 cells/well) were cultured (37 °C, 5% CO₂, 18 h) in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) prior to infection with parasites. Macrophages were exposed to stationary phase promastigotes (2×10^6 /well) at a ratio of 1:10. To allow internalization of parasites, plates were incubated for (37 °C, 5% CO₂, 5 h) and the remaining noninternalized parasites were removed.

2.4. In vitro assay with PA derivatives

The PA derivatives and controls were serially diluted with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS at final concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.12 µg/mL. Amphotericin B (as the reference antileishmanial drug) was used at final concentrations of 1, 0.5, 0.25, 0.12, and 0.06 µg/mL. Infected macrophages were exposed daily to the compounds for 3 consecutive days. After this period,

coverslips were collected, stained with panoptic (Laborclin, Pinhais, Brazil), and subsequently mounted with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) on glass slides. Negative control included only infected macrophages and medium. Incubations were tested in duplicate in 2 independent experiments (Berman and Lee, 1984; Neal and Croft, 1984).

2.5. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was determined using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) and the hepatoma cell lineage Hep G2 A16. Cells were kept in RPMI medium supplemented with 10% FBS, and confluent monolayers were trypsinized, washed in RPMI, and applied in 96-well microtiter plates (4×10^4 cells/well). Compounds and amphotericin B in the same conditions described above were incubated with the cells (37 °C, 5% CO₂, 24 h). Colorimetric reaction was developed after incubation with MTT (37 °C, 4 h) followed by addition of acidified isopropanol as previously described (Denizot and Lang, 1986). The reaction was read spectrophotometrically with a 570-nm filter and a background of 630 nm. Incubations were tested in triplicate in 2 independent experiments.

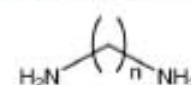
2.6. Analyses

Inhibition of parasite growth and cytotoxicity were evaluated through the percentage of infected macrophages (100 cells) and MTT-derived colorimetric values, respectively. Those values were plotted to generate dose–response curves. The half-maximal inhibitory response (IC₅₀) and the minimum lethal dose (MLD₅₀) based upon cell growth in drug-free controls were estimated by curve fitting using the Microcal Origin Software (Northampton, MA, USA) (Cunio et al., 2006; Desjardins et al., 1979; Madureira et al., 2002; Oliveira et al., 2008). The selective indexes (SIs) were calculated using the MLD₅₀/IC₅₀ ratios (Loiset et al., 2009; Nwada and Hudson, 2006).

3. Results

Screening compounds against intracellular amastigote forms of *Leishmania* have been used as the classical method for many years. Although this method is labor intensive and cannot support automation, direct counting assays enable to determine the percentage of infected cells and the number of amastigotes per cell. IC₅₀ values can be ascertained by monitoring either the reduction in the mean percentage of infected macrophages or the mean reduction in the number of amastigotes/macrophages (Sereno et al., 2007). In this work, based on the percentage of infected macrophages the IC₅₀s values were calculated. The in vitro antileishmanial activities, cytotoxicity, selective indexes, and cLog P values of PA derivatives (1–18) are shown in Tables 1 and 2. Compounds with IC₅₀ higher than 50 µg/mL were

Table 1
Lipophilicity, in vitro antileishmanial activity, and cytotoxicity of compounds 1–9 against intracellular amastigotes of *L. amazonensis*.



1-9

Compound	n	cLog P ^a	IC ₅₀ ^b	MLD ₅₀ ^c	SI ^d
1	2	-2.08	>50		
2	3	-1.81	34.65 ± 13.25	2208.00 ± 1828.00	63.72
3	4	-1.54	>50		
4	5	-1.03	>50		
5	6	-0.53	>50		
6	7	-0.02	>50		
7	8	0.48	29.16 ± 16.98	459.00 ± 289.91	15.74
8	10	1.49	19.59 ± 14.97	682.50 ± 0.71	34.84
9	12	2.50	26.34 ± 5.44	439.50 ± 228.40	16.69

^a Calculated using the online prediction program at <http://www.molinspiration.com>.

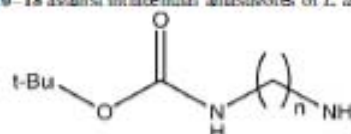
^b IC₅₀ = Half-maximal inhibitory response in micrograms per milliliter.

^c MLD₅₀ = The minimum lethal dose that killed 50% of the cells in micrograms per milliliter.

^d SI = Selective index, calculated based on the IC₅₀/MLD₅₀ ratios.

considered inactive against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*. On the other hand, compounds 2, 7, 8, 9, 17, and 18 were considered active (IC₅₀'s ranging from 3.78 to 34.65 µg/mL) (Fig. 1). Amphotericin B, our antileishmanial reference drug, exhibited the lowest IC₅₀ value (0.42 µg/mL) (Fig. 2A). It is interesting to note that an increase in the cLog P values resulted in better

Table 2
Lipophilicity, in vitro antileishmanial activity, and cytotoxicity of compounds 10–18 against intracellular amastigotes of *L. amazonensis*.



10-18

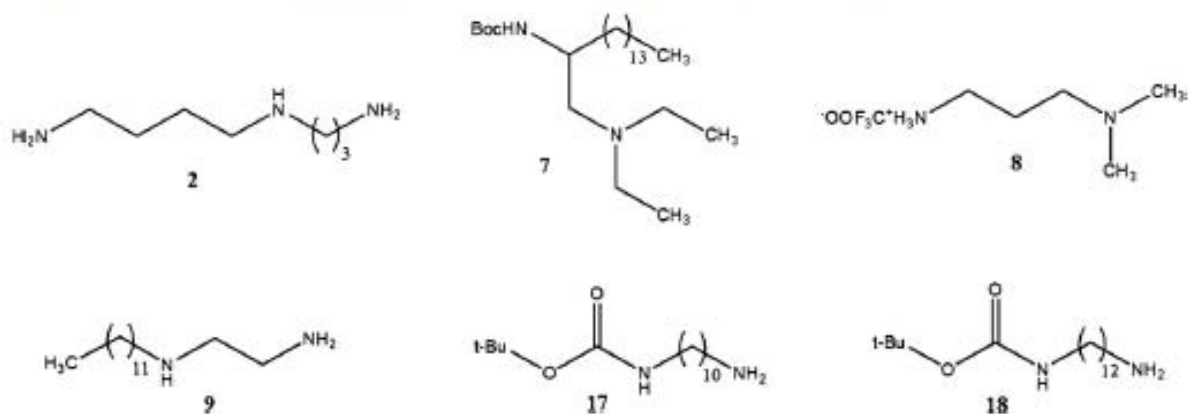
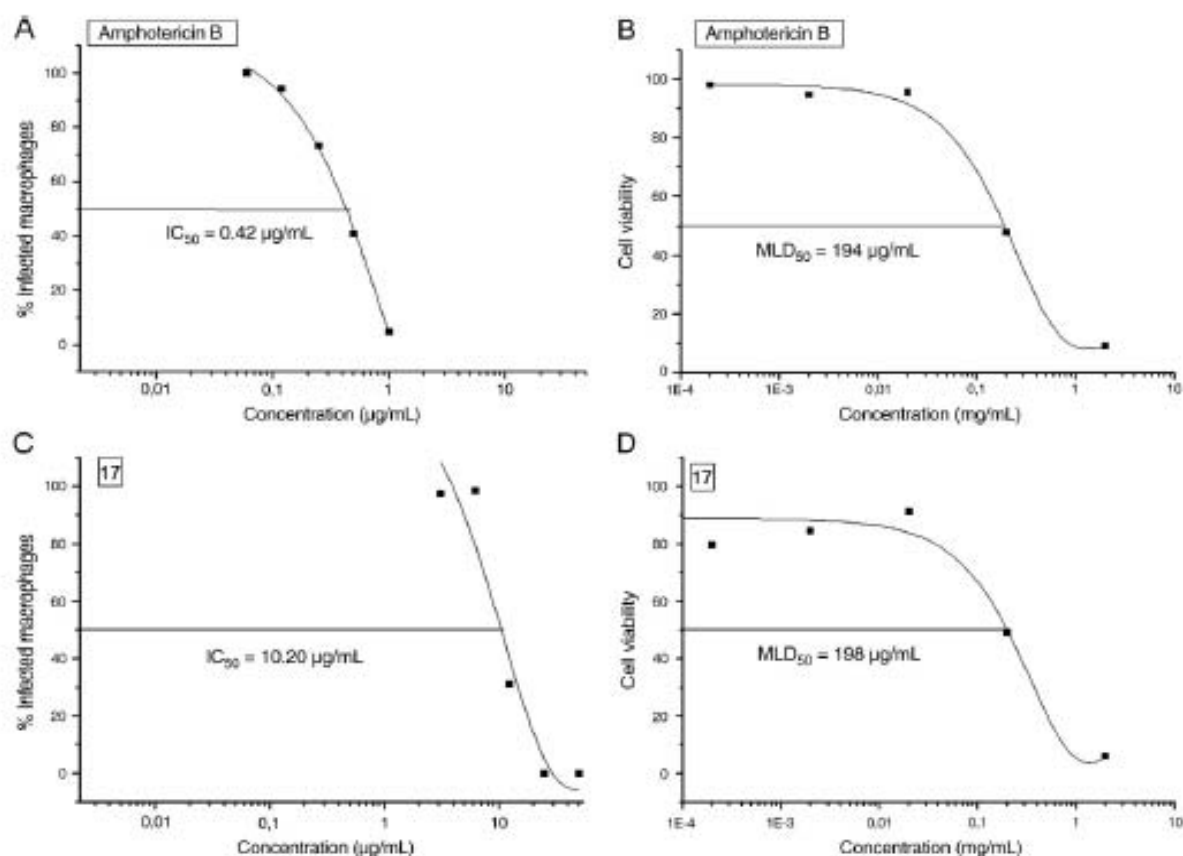
Compound	n	cLog P ^a	IC ₅₀ ^b	MLD ₅₀ ^c	SI ^d
10	2	-0.063	>50		
11	3	0.208	>50		
12	4	0.478	>50		
13	5	0.984	>50		
14	6	1.489	>50		
15	7	1.994	>50		
16	8	2.499	>50		
17	10	3.509	10.39 ± 0.27	106.50 ± 129.40	10.25
18	12	4.520	3.78 ± 0.42	117.00 ± 7.07	30.95
Amphotericin B			0.46 ± 0.04	192.50 ± 2.12	418.48

^a Calculated using the online prediction program at <http://www.molinspiration.com>.

^b IC₅₀ = Half-maximal inhibitory response in micrograms per milliliter.

^c MLD₅₀ = The minimum lethal dose that killed 50% of the cells in micrograms per milliliter.

^d SI = Selective index, calculated based on the IC₅₀/MLD₅₀ ratios.

Fig. 1. Synthetic mono-*t*-butyloxycarbonyl (BOC)-protected diamines with antileishmanial activities.Fig. 2. Dose-response curves of amphotericin B and polyamine derivative 17 against intracellular *Leishmania amazonensis* (A and C) and hepatoma HepG2 cells (B and D). IC_{50} = Half-maximal inhibitory response; MLD_{50} = the minimum lethal dose. Curves were obtained using Microcal Origin Software. Results are a representation of 1 experiment.

antileishmanial activity while comparing compounds **17** and **18** to compounds **2**, **7**, **8** and **9** (Tables 1 and 2).

Active compounds and amphotericin B were thus selected for cytotoxicity evaluation against a human hepatoma cell line (HepG2) (Fig. 2B and D). The results were expressed as minimal lethal doses (MLD₅₀) prior to calculation of the SI. The relative selectivity of these compounds against *L. amazonensis* compared to HepG2 was calculated based on MLD₅₀/IC₅₀ ratios (Tables 1 and 2). Among the 6 selected compounds, the best SI value was observed for **2**, followed by **8** and **18**. Amphotericin B, our drug control, had the best SI value as expected. Compounds exhibiting SI lower than 20 (**7**, **9**, and **17**) were considered toxic (Loiset et al., 2009; Nwada and Hudson, 2006) (Tables 1 and 2).

4. Discussion

Leishmaniasis are considered by the WHO as one of the major 6 important infectious diseases worldwide (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>). At present, a great interest in developing new drugs, combinations, or protocols against tropical and neglected diseases has been stimulated by many initiatives (Moran et al., 2009). In this context, recent studies using nonantimony treatments (oral miltefosine, ketoconazole, and liposomal amphotericin B) were proven to be an effective alternative to pentavalent antimony for many *Leishmania* species (Ramanathan et al., 2011). This may represent an advantage in the use of non-antimony-based regimens due to their safety, efficacy, and potentially less toxic effects. Over the past years, the absence of research and development for new medicines targeting diseases affecting people in developing countries has become a global concern (Chirac and Tomele, 2006). In the case of leishmaniasis, a primarily rural disease, an increase in its incidence has been increasingly reported in larger cities (Ashford, 2000). Since there is no available vaccine and vector/reservoir control has limitations, current control measures are mainly based on patient treatment. However, side-effects, treatment failure due to parasite resistance, HIV co-infection, and intravenous administration are the major concerns in leishmaniasis chemotherapy (Croft et al., 2006a,b). Although the introduction of new therapies such as liposomal amphotericin, oral miltefosine, and paromomycin occurred in the past decade, these are not ideal. It is critical that less toxic and cheaper therapies be developed. Therefore, a search for new chemotherapeutic compounds against *Leishmania* is still warranted (Alvar et al., 2006).

L. amazonensis, the etiologic agent of cutaneous and diffuse leishmaniasis, is often associated with resistance against current standard antileishmanial drugs. It is a useful species for both in vivo and in vitro tests since it is very easy to keep under laboratory conditions and is a very effective mouse model. In the search for an alternative antileishmanial drug, many studies have already determined the activity of

chemical or plant-derived compounds against this species (Aguar et al., 2010; Garcia et al., 2010; Junior et al., 2010; Khouri et al., 2010; Souza-Fagundes et al., 2010).

Polyamine compound derivatives have been tested against *Leishmania* by several authors due to their roles in important biological functions in cell growth and differentiation (Costa et al., 2009; Del Olmo et al., 2002; Labadie et al., 2004; Tavares et al., 2005). However, those studies have evaluated PA antiproliferative activity only in promastigotes and amastigote-like parasites. Although the mechanism of action still needs to be fully elucidated in *Leishmania*, it is very clear that PA derivatives can have differential effects depending on the parasite stage. For example, in promastigotes, the mechanism is similar to apoptosis observed for metazoan (Tavares et al., 2005). In our work, we tested for the first time this class of organic compounds against intracellular amastigote forms in murine macrophages, a model that resembles a natural infection.

Consistent with the data from the previous studies, PA derivatives also exhibited antileishmanial activities inside the cell. This phenomenon was correlated to the lipophilicity of the molecules as indicated by cLog *P* values. Highest antiproliferative activity against intracellular *L. amazonensis* was observed for compounds **17** (Fig. 2C) and **18** (IC₅₀'s between 3.8 and 10.4 µg/mL), and those data could be a result of their capacity to reach the parasite in the parasitophorous vacuole. Confirming this idea, we found that compound **2** (cLog *P* value = −1.81) had a lower ability to kill the parasite, exhibiting a higher IC₅₀ value (34.65 ± 13.25 µg/mL). These preliminary results indicate that a longer alkyl chain seems to be important to the leishmanicidal activity observed. In spite of having a good antileishmanial activity, compound **17** was very toxic (SI = 10.25). On the other hand, compound **2** was the less cytotoxic among all PA derivatives tested (MDL₅₀ = 2208.00 ± 1828.00 µg/mL) followed by compounds **8** (682.50 ± 0.71 µg/mL) and **18** (117.00 ± 7.07 µg/mL), with respective SIs of 63.72, 34.84, and 30.95. In comparison to our reference drug, amphotericin B, the SI indexes for these compounds can be considered low, suggesting limited selectivity against *L. amazonensis* infection in vitro. In fact, Tavares et al. (2005) have demonstrated DNA fragmentation in *L. infantum* as one of the apoptotic mechanisms in promastigotes. Although PA derivatives have antileishmanial potential, 50% of the active compounds were very cytotoxic to HepG2 cells.

5. Conclusions

A series of 18 protected and nonprotected α,ω-diaminoalkanes have been evaluated for their in vitro activity against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*. In general, mono-BOC-protected α,ω-diaminoalkanes compounds with longer alkyl chains (H₂N(CH₂)_nNHBoc, *n* = 10–12) exhibited better leishmanicidal activity when

compared to the analogous nonprotected compounds. However, most of the PA derivatives exhibited high cytotoxicity. Moreover, from all compounds tested, **2**, **8**, and **18** exhibited the best leishmanicidal activity and highest SIs. Although compound **18** exhibited the best lipophilicity, compounds **2** and **8** were less toxic. Their potential for in vivo tests in mice should be further evaluated.

Acknowledgments

The authors thank Deborah Sullivan-Davis from the University of Kentucky for reviewing the manuscript.

References

- Aguar MG, Pereira AM, Fernandes AP, Ferreira LA (2010) Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4699–4704.
- Alvar J, Croft S, Pien O (2006) Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61:223–274.
- Ashford RW (2000) The leishmaniasis as an emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30:1269–1281.
- Berman JD, Lee LS (1984) Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *J Parasitol* 70:220–225.
- Lagishetty CV, Naik SR (2008) Polyamines: potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Ind J Pharmacol* 40:121–125.
- Chimo P, Torreele E (2006) Global framework on essential health R&D. *Lancet* 367:1560–1561.
- Costa CF, Coimbra ES, Braga FG, Reis RCN, Silva A, Almeida MV (2009) Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. *Biomol Pharmacol* 63:40–42.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V (2006a) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123:399–410.
- Croft SL, Sundar S, Fairclimb AH (2006b) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111–126.
- Cunha W, Cechinel CA, Bonacors HG, Martins MA, Zanatta N, De Souza MV, Freitas ID, Soares RP, Kretzli AU (2006) Antimalarial activity of 4-(5-trifluoromethyl-1H-pyrazol-1-yl)-chloroquine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 16:649–653.
- Del Olmo E, Alves M, López JL, Inchaurri A, Yaluff G, Arias AR, San Feliciano A (2002) Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorg Med Chem Lett* 12:659–666.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271–277.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16:710–718.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:305–318.
- García M, Monarte I, Montalvo AM, Soull R (2010) Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharm Biol* 48:1053–1058.
- Herwaldt B (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199.
- Júnior CG, de Assis PA, Silva PP, Sousa SC, de Andrade NG, Barbosa TP, Neris PL, Segundo LV, Anjos IC, Carvalho GA, Rocha GB, Oliveira MR, Vasconcellos ML (2010) Efficient synthesis of 16 aromatic Mont-Baylis-Hillman adducts: biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. *Bioorg Chem* 38:279–284.
- Karigiannis G, Papaioannou D (2000) Structure, biological activity and synthesis of polyamine analogues and conjugates. *Eur J Org Chem* 2000:1841–1863.
- Khouri R, Novais F, Santana G, de Oliveira CL, Vannier dos Santos MA, Baral A, Baral-Netto M, Van Weyenberg J (2010) DETC induces *Leishmania* parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *PLoS One* 5:e14394.
- Labadie GR, Choi S, Avery MA (2004) Diamine derivatives with antiparasitic activities. *Bioorg Med Chem Lett* 14:615–619.
- Loest JR, Brun R, Wenzler T, Kaiser M, Yardley V (2009) Drug screening for kinetoplastid diseases: a training manual for screening in neglected diseases. *DNDi Pan-Asian Screen Netw* 1:1–74.
- Lovaas E, Carlin G (1991) Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radic Biol Med* 11:455–461.
- Madureira AM, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Ferreira MJU, Cunha AP, Rosario VE (2002) Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tome and Principe Island. *J Ethnopharmacol* 81:23–29.
- Mishra J, Saxena A, Singh S (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 14:1153–1169.
- Moran M, Guzman J, Ropars AL, McDonald A, Jameson N, Omune B, Ryan S, Wu L (2009) Neglected disease research and development: how much are we really spending? *PLoS Med* 6:e30.
- Neal RA, Croft SL (1984) An in vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 14:463–475.
- Nwada S, Hudson A (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 5:941–955.
- Oliveira RB, Souza-Fagundes EM, Soares RP, Andrade AA, Kretzli AU, Zani CL (2008) Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *Eur J Med Chem* 43:1983–1988.
- Oyanagi Y (1984) Anti-inflammatory effects of polyamines in serotonin and carageenan paw edema — possible mechanism to increase vascular permeability inhibitory protein level which is regulated by glucocorticoids and superoxide radical. *Agents Actions* 14:228–237.
- Ramanathan R, Talaat KR, Fedotko DP, Mahanty S, Nash TE (2011) A species-specific approach to the use of non-antimony treatments for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 84:109–117.
- Rocha MN, Margonari C, Presto IM, Soares RPP (2010) Evaluation of 4 polymers chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68:401–409.
- Semeno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouassii A (2007) Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 56:3–7.
- Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Guzzinelli RT, Pimenta PF, Turco SJ (2002) *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mol Biochem Parasitol* 121:213–224.
- Souza-Fagundes EM, Cota BB, Rosa LH, Romanha AJ, Costa-Oliveira R, Rosa CA, Zani CL, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO (2010) In vitro activity of hypnophillin from *Leishmania strigosa*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. *Braz J Med Biol Res* 43:1054–1061.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347:1739–1746.
- Tavares J, Ouassii A, Lin PKT, Tomás A, Da Silva AC (2005) Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Int J Parasitol* 35:637–646.
- Theoharides TC (1980) Polyamines spermidine and spermine as modulators of calcium-dependent immune processes. *Life Sci* 27:703–713.
- Vannier-Santos MA, Menezes D, Oliveira MF, Mello FG (2008) The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* 154:3104–3111.

4.3. ARTIGO 3

Hindawi Publishing Corporation
 Biinorganic Chemistry and Applications
 Volume 2013, Article ID 961783, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/961783>

Research Article

Cytotoxicity and *In Vitro* Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol

Marcele Neves Rocha,¹ Paula Monalisa Nogueira,¹ Cynthia Demicheli,²
 Ludmila Gonçalves de Oliveira,² Meiriane Mariano da Silva,² Frederic Frezard,³
 Maria Norma Melo,⁴ and Rodrigo Pedro Soares¹

¹ Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

² Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Rodrigo Pedro Soares; rsoares@cpqrr.fiocruz.br

Received 30 January 2013; Revised 26 April 2013; Accepted 6 May 2013

Academic Editor: Patrick Bednarski

Copyright  2013 Marcelle Neves Rocha et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Leishmania amazonensis is the etiologic agent of the cutaneous and diffuse leishmaniasis often associated with drug resistance. Lapachol [2-hydroxy-3-(3'-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone] displays a wide range of antimicrobial properties against many pathogens. In this study, using the classic microscopic *in vitro* model, we have analyzed the effects of a series of lapachol and chlorides complexes with antimony (V), bismuth (V), and tin (IV) against *L. amazonensis*. All seven compounds exhibited antileishmanial activity, but most of the antimony (V) and bismuth (V) complexes were toxic against human HepG2 cells and murine macrophages. The best IC₅₀ values (0.17 ± 0.03 and 0.10 ± 0.11 μg/mL) were observed for Tin (IV) complexes (3) [(Lp)(Ph₃Sn)] and (6) (Ph₃SnCl₂), respectively. Their selective indexes (SIs) were 70.65 and 120.35 for HepG2 cells, respectively. However, while analyzing murine macrophages, the SI decreased. Those compounds were moderately toxic for HepG2 cells and toxic for murine macrophages, still underlying the need of chemical modification in this class of compounds.

1. Introduction

Leishmania amazonensis, a New World species, has been identified as a dermatotropic species often associated with drug resistance [1]. Current antileishmanial therapies are toxic to human and some simply fail [2, 3]. In the Americas, for over six decades, parenteral administrations of pentavalent antimonials (Sb-V), sodium stibogluconate (Pentostam), and meglumine antimoniate (Glucantime) have been used for treating leishmaniasis. In places where resistance to antimonials is common, such as India, other chemotherapeutic treatments include amphotericin B and pentamidine [2, 4]. Therefore, the absence of a low toxic and safe oral drug still underlines the need for new antileishmanial compounds.

Lapachol, [2-hydroxy-3-(3'-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone] (Figure 1) is a natural compound extracted from the core of Bignoniaceae trees. In *Leishmania*, lapachol analogues, derivatives, and complexes have been tested by several groups. Lapachol, isolapachol, and some of their derivatives were active *in vitro* and *in vivo* against *Leishmania braziliensis* and *L. amazonensis*, respectively [5]. Bismuth (III), antimony (V), and tin (IV) complexes were active against *Helicobacter pylori*, *Leishmania major*, and *Leishmania donovani*, respectively [6–8].

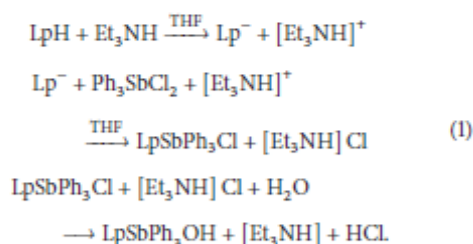
The design of bifunctional metal complex, where both the ligand and the metal exert pharmacological activity, represents a promising strategy for achieving more effective and

selective drugs. In the present study, lapachol was coupled with three different metals: triphenyltin (IV), triphenylbismuth (V), and triphenylantimony (V). We have tested the *in vitro* activity and cytotoxicity of synthesized antimony (V), bismuth (V), and tin (IV) lapachol and chloride complexes against intracellular *L. amazonensis*, HepG2 cells, and murine macrophages.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the Lapachol Metal Complexes and Tested Metal Chlorides. The $(\text{Lp})(\text{Ph}_3\text{Bi})\text{O}_{0.5}$ (1) and $(\text{Lp})(\text{Ph}_3\text{Sb})\text{OH}$ (2) complexes were synthesized by following the procedure described by [9]. To prepare $(\text{Lp})(\text{Ph}_3\text{Sn})$ (3) the same procedure was used. Triethylamine (70 μL) was added to a mixture of lapachol (0.121 g, 0.5 mmol) and triphenyltin (IV) chloride (193 mg, 0.5 mmol) in chloroform (20 mL). The resulting mixture was stirred for 4 h at room temperature. Removal of the solvent under vacuum yielded a solid material. The material was subsequently dissolved in acetone and precipitated in water. The triethylammonium hydrochloride formed during the reaction was dissolved and removed by water. Elemental analyses were carried out using a Perkin-Elmer 240 Elemental Analyzer. Atomic absorption analyses of bismuth, antimony and tin contents were carried out on a Hitachi Atomic Absorption Spectrophotometer (Model 8200).

The following equations can be proposed to illustrate the formation of $(\text{Lp})(\text{Ph}_3\text{Sb})\text{OH}$ complex as follows:



The same process can be proposed for all complexes. The yields, melting points, and elemental analyses of the compounds prepared are given in Table 1.

Triphenylbismuth dichloride (4), triphenylantimony dichloride (5), triphenyltin chloride (6), and lapachol (7) were obtained from Aldrich. Triethylamine was obtained from Sigma. The predicted structures of all tested compounds are shown in Figure 1.

2.2. Parasites. The World Health Organization (WHO) reference strain *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) was used and typed as previously described [10]. Promastigote forms were grown at 25°C in M199 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab), 40 mmol/L HEPES (Amersham), 0.1 mmol/L adenine (Sigma), 0.0005% hemin (Sigma), 0.0002% biotin (Sigma), 50 units/mL penicillin, and 50 mg/mL streptomycin (Invitrogen) [11].

2.3. In Vitro Classic Microscopic Tests. Animals were kept in the Animal Facility of the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ in strict accordance to the Guide for the Care and Use of Experimental Animals [12]. The procedures were approved by the Internal Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brazil (Protocol L-042/08). Mice were euthanized with CO_2 in an induction chamber prior to macrophage removal. Balb/c mice were injected intraperitoneally with 2 mL of 3% sodium thioglycollate medium. After 72 h, peritoneal macrophages were removed by washing with cold RPMI 1640 medium and enriched by adherence to round glass coverslips (13 mm) placed in a 4-well culture plate. Cells (2×10^5 cells/well) were cultured (37°C, 5% CO_2 , 18 h) in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FBS (fetal bovine serum) prior to infection with parasites. Macrophages were exposed to stationary phase promastigotes (2×10^5 /well) at a final ratio of 1:10. The plates were incubated at 37°C, 5% CO_2 for 5 h in BOD to allow internalization of parasites [13]. Then, the medium was removed for the remaining noninternalized parasites. Negative control included only infected macrophages and medium. Incubations were tested in duplicate in two independent experiments [14, 15]. The substances were serially diluted with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS at five different concentrations ($50 \rightarrow 3.1 \mu\text{g/mL}$). For compounds (3) and (6), the dilution was $10 \rightarrow 0.016 \mu\text{g/mL}$. Amphotericin B was used as reference drug. Infected macrophages were exposed daily to the compounds for 3 consecutive days. After this period, coverslips were collected, stained with Panoptic (Laborclin), and subsequently mounted with Entellan (Merck) on glass slides.

2.4. Cytotoxicity Tests. The cell lineage HepG2 A16 was derived from a human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC HB-8065) and obtained from America Type Culture Collection line (ATCC) [16]. Balb/c murine peritoneal macrophages were obtained as described above. Cytotoxicity was determined using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma). HepG2 cells were kept in RPMI medium supplemented with 10% FBS, and confluent monolayers were trypsinized, washed in RPMI, and transferred to 96-well microtiter plates (4×10^4 cells/well) for 16–18 h. Murine macrophages were used in the concentration 2×10^5 cells/well in 96-well microtiter plates. The compounds were serially diluted in different concentrations ($10 \rightarrow 0.16 \text{ mg/mL}$). In both tests, the medium was removed, and the compounds were incubated for 24 h (37°C, 5% CO_2). Colorimetric reaction was developed following the incubation with MTT (37°C, 5% CO_2 , 4 h) and addition of acidified isopropanol [17]. The reaction was read spectrophotometrically (Spectramax M5, Molecular Devices, San Francisco, CA) with a 570 nm filter and a background of 670 nm. Incubations were tested in triplicate in two independent experiments. The minimum dose that killed 50% of the cells (MLD_{50}) was determined [18], and the values were plotted to generate dose-response curves using

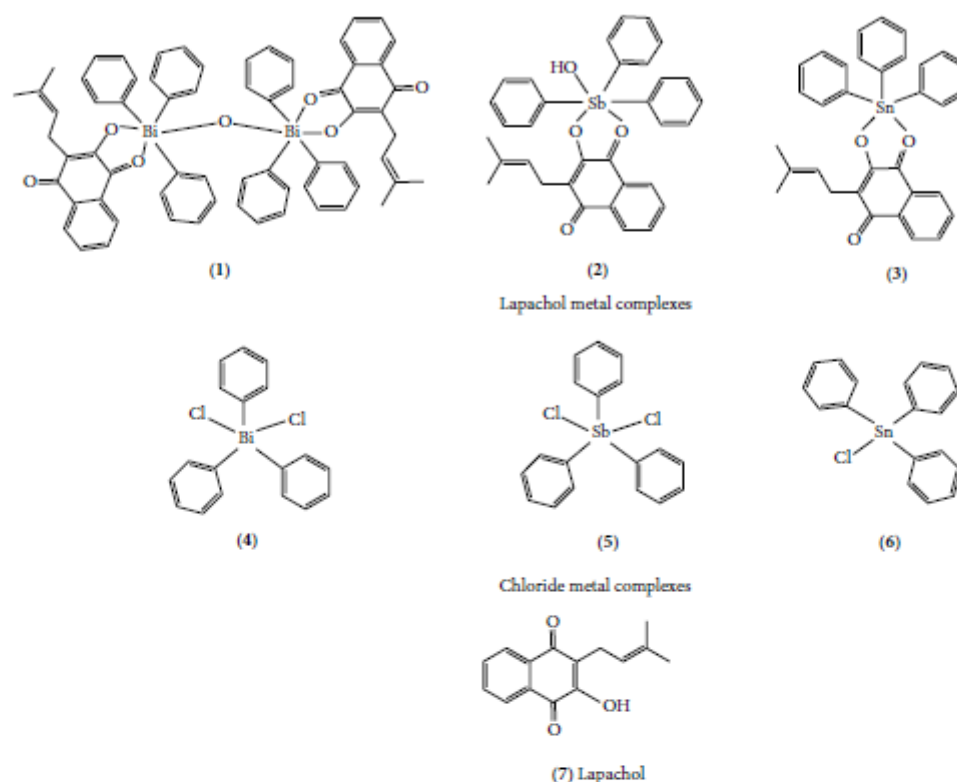


FIGURE 1: Structures of lapachol metal (Bi, Sb, and Sn) complexes (1–3) and chloride metal (Bi, Sb, and Sn) compounds (4–6) and lapachol (7). Legend: Bi = bismuth, Sb = antimony, and Sn = tin.

TABLE 1: Yields and elemental analyses of the compounds.

Compound	Yield (%)	M.p. (°C) ^a	C found (calc.) (%)	H found (calc.) (%)	Metal found (calc.) (%)	Formula for calc.
(1)	79	126–129	57.31 (57.40)	4.09 (4.23)	29.03 (29.98)	(Lp)(Ph ₃ Bi)O _{0.5}
(2)	76	154–156	65.30 (64.82)	4.52 (4.78)	20.64 (19.19)	(Lp)(Ph ₃ Sb)OH
(3)	79	107–109	66.41 (67.03)	4.40 (4.77)	21.74 (20.07)	(Lp)(Ph ₃ Sn)

^aM.p.: melting point.

TABLE 2: Antileishmanial activity, cytotoxicity, and selective indexes of tested compounds for HepG2 cells and murine macrophages.

Compound	Formula	IC ₅₀ ^a	HepG2		Macrophages	
			MLD ₅₀ ^b	SI ^c	MLD ₅₀ ^b	SI ^c
(1)	(Lp)(Ph ₃ Bi)O _{0.5}	29.05 ± 18.45	58.38 ± 8.47	2.01	32.4 ± 8.20	1.11
(2)	(Lp)(Ph ₃ Sb)OH	18.27 ± 5.58	325.22 ± 89.40	17.81	130.65 ± 40.52	7.15
(3)	(Lp)(Ph ₃ Sn)	0.17 ± 0.03	12.01 ± 0.17	70.65	1.6 ± 0.57	9.41
(4)	Ph ₃ BiCl ₂	5.40 ± 0.16	183.75 ± 4.77	34.03	25.15 ± 0.49	4.67
(5)	Ph ₃ SbCl ₂	11.61 ± 7.85	157.46 ± 37.13	13.56	30.75 ± 6.01	2.65
(6)	Ph ₃ SnCl ₂	0.10 ± 0.11	12.04 ± 8.42	120.35	0.73 ± 0.13	7.30
(7)	Lp ^d	15.48 ± 5.23	201.77 ± 5.32	13.03	184.65 ± 6.58	11.92
Amphotericin B		0.73 ± 0.60	644.59 ± 126.57	883.00	179.95 ± 8.84	246.51

^aIC₅₀: the inhibitory concentration that killed 50% of the *L. amazonensis* in µg/mL.

^bMLD₅₀: the minimum lethal dose that killed 50% of the cells in µg/mL.

^cSI: selective index, calculated based on the MLD₅₀/IC₅₀ ratios.

^dLp: Lapachol.

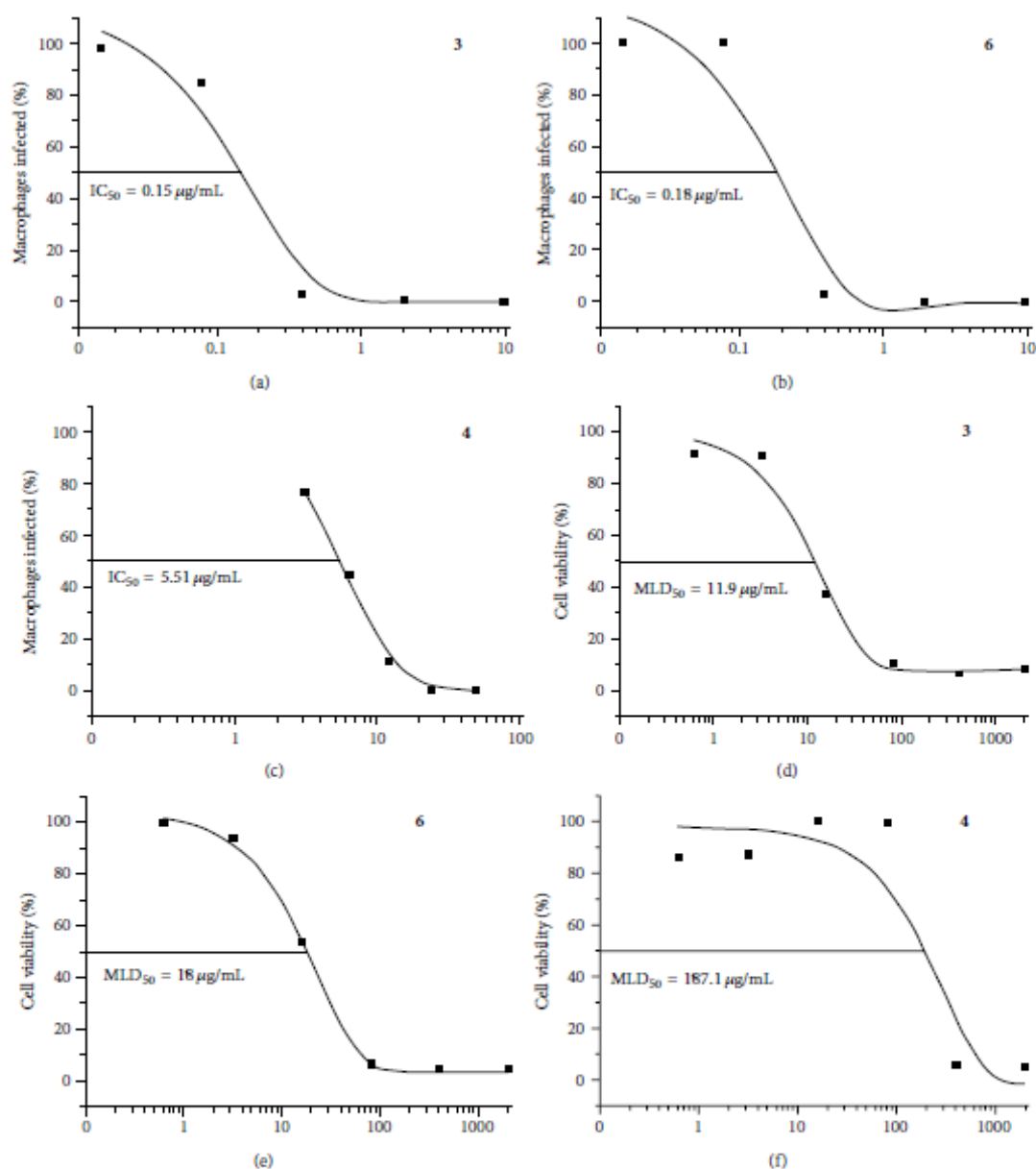


FIGURE 2: *In vitro* antileishmanial activity of compounds (3), (4), and (6) against intracellular *L. amazonensis* ((a), (b), and (c)) and cytotoxicity against hepatoma HepG2 cell ((d), (e), and (f)). Curves were obtained using Microcal Origin Software. IC_{50} = half-maximal inhibitory response; MLD_{50} = the minimum lethal dose. Figures are a representation of one experiment.

Microcal Origin Software (Northampton, MA, USA) [15, 19]. The selective indexes (SIs) of compounds were calculated using the $\text{MLD}_{50}/\text{IC}_{50}$ ratios to HepG2 and peritoneal macrophages [20, 21].

3. Results

The *in vitro* classic microscopic test enables direct counting to determine the percentage of infected cells and/or the number of amastigotes [22]. Here, the IC_{50} values were calculated based on the percentage of infected macrophages [15]. The *in vitro* antileishmanial activities, cytotoxicity and selective

indexes (SIs) of lapachol metal complexes and chlorides (1–6), lapachol (7) and amphotericin B are shown in Table 2. Lapachol and compounds (1), (2), and (5) were considered inactive ($IC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$) and toxic ($SI < 20$) for HepG2 cells and macrophages [20, 21]. The tin (IV) lapachol complex (3) and chloride (6) were active against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis* (Figures 2(a) and 2(b)) and less toxic for HepG2 cells (SIs ranging from 70.65 to 120.35) (Figures 2(d) and 2(e)) (Table 2). One triphenyl bismuth chloride (4) (Figure 2(c)) was also active and a little more toxic for HepG2 cells (Figure 2(f)) than (3) (Figure 2(d)) and (6) (Figure 2(e)) ($SI = 34.03$). All compounds were toxic for murine macrophages ($SI < 20$). Amphotericin B, an antileishmanial reference drug, exhibited an IC_{50} value approximately fourfold higher than (3) and (6) ($0.73 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$) (Table 2).

4. Discussion

Leishmaniasis are considered by the WHO as one of the major six important infectious diseases worldwide. Over the past years, the absence of research and development for new medicines targeting diseases affecting people in developing countries has become a global concern [23]. Currently, the development of new drugs, combinations, or protocols against tropical and neglected diseases is of great importance in public health [24–27]. However, side effects, treatment failure due to parasite resistance, HIV coinfection, and intravenous administration are the major concerns hindering leishmaniasis chemotherapy [2, 3].

Lapachol derivatives and complexes have exhibited anti-tumor, anti-inflammatory, antiangiogenic, analgesic, and antimicrobial properties [6, 28–32]. Lapachol and some of its analogues demonstrated activity *in vitro* against *L. braziliensis* and *L. amazonensis* [5]. The use of metal complexes against *Leishmania* may represent a potential alternative against the disease since antimony-based regimens tend to be very toxic. In this context, we have explored the use of lapachol and chloride metal complexes with antimony (V), bismuth (V), and tin (IV) against *L. amazonensis*.

In contrast to data from previous studies, lapachol (7) did not exhibit significant antileishmanial activity against *L. amazonensis* (15.48 ± 5.23 versus $5.2 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$) [5]. This IC_{50} value is close to that observed for *L. braziliensis* ($11.9 \pm 6.9 \mu\text{g/mL}$). This discrepancy could be attributed to the strain of *L. amazonensis* used (MHOM/BR/77/LTB0016) and experimental conditions. The highest antiproliferative activity against intracellular *L. amazonensis* was observed for tin (IV) lapachol and chloride complexes (3) and (6) (Figures 2(a) and 2(b)) and one bismuth (V) chloride compound (4) (Figure 2(c)). More importantly, compounds (3) and (6) were more active than amphotericin B and less toxic among all substances tested while using HepG2 cells (SIs of 70.65 and 120.35, resp.). Interestingly, the resulting compound of lapachol and tin (IV) showed a marked decrease in metal toxicity than lapachol alone (SIs of 70.65 versus 13.03, resp.). One of the possibilities that could justify such phenomenon could be due to an increase in the lipophilicity of the

lapachol-complexed molecule. Another hypothesis is that lapachol complexation could affect the REDOX potential of the compound, thus, consequently changing its activity. Consistent with this idea, the mechanisms underlying those activities are related to the generation of reactive oxygen radicals (ROSs) induced by the bioreduction of its quinonoid nucleus through specific enzymes and oxygen [33–35]. ROS mechanisms induced by lapachol have been implicated in the chemotherapeutic activities against many protozoa such as *Trypanosoma cruzi* [30] and also tumor cells [31]. Similarly, among all metal chloride substances, the triphenyl tin (IV) chloride compound exhibited lower toxicity compared to bismuth (V) and antimony (V) chloride ones. Finally, compound (4) exhibited moderate toxicity ($SI = 34.03$) with an IC_{50} value 7-fold higher than amphotericin B. However, when cytotoxicity was tested against murine macrophages, the host cells for *Leishmania*, all compounds were toxic. Those data indicate the need of chemical modifications in this class of compounds in the search of novel antileishmanial molecules.

chloride compound exhibited lower toxicity compared to bismuth (V)

5. Conclusions

Lapachol and a series of six lapachol and chloride metal complexes have been evaluated for their *in vitro* activity against intracellular amastigote forms of *L. amazonensis*. The tin (IV) lapachol and chloride complexes (3 and 6) exhibited higher antileishmanial activity compared to amphotericin B. The triphenyl bismuth (V) compound (4) also exhibited antileishmanial activity with moderate cytotoxicity. Lapachol compounds with bismuth (V) and tin (IV) were less toxic when compared with lapachol alone for HepG2 cells. In conclusion, tin, and in a less extent, bismuth complexes were moderately toxic for HepG2 cells and toxic for murine macrophages.

Conflict of Interests

The authors have declared that no conflict of interests exists.

Financial Support

The authors received the following funds.

Acknowledgments

R. P. Soares, C. Demicheli, F. Frézard, and M. N. Melo are supported by the National Council for the Development of Research of Brazil (CNPq) (305042/2010-6, 303866/2010-1, and 303046/2009-1). M. N. Rocha is supported by CNPq (142361/2009-7). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-00197-11, APQ-01123-09, PRONEX, PPM-00382-11). The authors would like to thank Dr. Deborah Sullivan-Davis for reviewing the paper.

References

- [1] A. Bittencourt, A. Barral, A. R. de Jesus, R. P. de Almeida, and G. Grimaldi Júnior, "In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 84, no. 4, pp. 585–586, 1989.
- [2] S. L. Croft, S. Sundar, and A. H. Fairlamb, "Drug resistance in leishmaniasis," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 1, pp. 111–126, 2006.
- [3] S. L. Croft, K. Seifert, and V. Yardley, "Current scenario of drug development for leishmaniasis," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 123, no. 3, pp. 399–410, 2006.
- [4] J. Mishra, A. Saxena, and S. Singh, "Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 10, pp. 1153–1169, 2007.
- [5] N. M. F. Lima, C. S. Correia, L. L. Leon et al., "Antileishmanial activity of lapachol analogues," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 7, pp. 757–761, 2004.
- [6] P. C. Andrews, R. L. Ferrero, P. C. Junk et al., "Bismuth(III) complexes derived from non-steroidal anti-inflammatory drugs and their activity against *Helicobacter pylori*," *Dalton Transactions*, vol. 39, no. 11, pp. 2861–2868, 2010.
- [7] B. Raychaudhury, S. Banerjee, S. Gupta, R. V. Singh, and S. C. Datta, "Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*," *Acta Tropica*, vol. 95, no. 1, pp. 1–8, 2005.
- [8] P. C. Andrews, R. Frank, P. C. Junk, L. Kedzierski, I. Kumar, and J. G. MacLellan, "Anti-Leishmanial activity of homo- and heteroleptic bismuth(III) carboxylates," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 105, no. 3, pp. 454–461, 2011.
- [9] L. G. Oliveira, M. M. Silva, F. C. Paula et al., "Antimony(V) and bismuth(V) complexes of lapachol: synthesis, crystal structure and cytotoxic activity," *Molecules*, vol. 16, no. 12, pp. 10314–10323, 2011.
- [10] M. N. Rocha, C. Margonari, I. M. Presot, and R. P. Soares, "Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 68, no. 4, pp. 401–409, 2010.
- [11] R. P. P. Soares, M. E. Macedo, C. Ropert et al., "Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 121, no. 2, pp. 213–224, 2002.
- [12] D. O. D. V. M. Ernest, M. C. D. V. M. Brenda, and A. A. McWilliam, *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, Canadian Council on Animal Care, 1993.
- [13] M. N. Rocha, C. M. Correa, M. N. Melo et al., "An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein," *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 75, no. 3, pp. 282–291, 2013.
- [14] J. D. Berman and L. S. Lee, "Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages," *Journal of Parasitology*, vol. 70, no. 2, pp. 220–225, 1984.
- [15] A. C. Pinheiro, M. N. Rocha, P. M. Nogueira et al., "Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-*t*-butyloxycarbonyl-protected diamines," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 71, no. 3, pp. 273–278, 2011.
- [16] G. J. Darlington, J. H. Kelly, and G. J. Buffone, "Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium," *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 349–354, 1987.
- [17] F. Denizot and R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival—modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability," *Journal of Immunological Methods*, vol. 89, no. 2, pp. 271–277, 1986.
- [18] M. C. Madureira, A. P. Martins, M. Gomes, J. Paiva, A. P. Cunha, and V. Rosário, "Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 81, pp. 23–29, 2002.
- [19] I. Oliveira, A. Sousa, J. S. Morais et al., "Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 5, pp. 1801–1807, 2008.
- [20] S. Nwaka and A. Hudson, "Innovative lead discovery strategies for tropical diseases," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 11, pp. 941–955, 2006.
- [21] J. R. Ioset, R. Brun, T. Wenzler, M. Kaiser, and V. Yardley, "Drug screening for kinetoplastids diseases: a training manual for screening in neglected diseases," *DNDi and Pan-Asian Screening Network*, pp. 1–74, 2009.
- [22] D. Sereno, A. Cordeiro da Silva, F. Mathieu-Daude, and A. Ouaisi, "Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures," *Parasitology International*, vol. 56, no. 1, pp. 3–7, 2007.
- [23] P. Chirac and E. Torreale, "Global framework on essential health R&D," *The Lancet*, vol. 367, no. 9522, pp. 1560–1561, 2006.
- [24] R. Pink, A. Hudson, M. A. Mouriès, and M. Bendig, "Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4, no. 9, pp. 727–740, 2005.
- [25] M. Moran, J. Guzman, A. L. Ropars et al., "Neglected disease research and development: how much are we really spending?" *PLoS Medicine*, vol. 6, no. 2, Article ID e1000030, 2009.
- [26] J. L. Siqueira-Neto, O. R. Song, H. Oh et al., "Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 5, article e675, 2010.
- [27] G. de Muylder, K. K. H. Ang, S. Chen, M. R. Arkin, J. C. Engel, and J. H. McKerrow, "A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 7, Article ID e1253, 2011.
- [28] F. G. de Miranda, J. C. Vilar, I. A. Alves, S. C. Cavalcanti, and A. R. Antonioli, "Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract," *BMC Pharmacology*, vol. 1, no. 1, article 6, 2001.
- [29] V. F. Andrade-Neto, M. G. L. Brandão, F. Q. Oliveira et al., "Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil," *Phytotherapy Research*, vol. 18, no. 8, pp. 634–639, 2004.
- [30] A. V. Pinto and S. L. de Castro, "The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review," *Molecules*, vol. 14, no. 11, pp. 4570–4590, 2009.
- [31] J. M. Matés and F. M. Sánchez-Jiménez, "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 32, no. 2, pp. 157–170, 2000.
- [32] G. L. Parrilha, R. P. Vieira, P. P. Campos et al., "Coordination of lapachol to bismuth(III) improves its anti-inflammatory and anti-angiogenic activities," *BioMetals*, vol. 25, no. 1, pp. 55–62, 2012.

- [33] J. Tonholo, L. R. Freitas, F. C. de Abreu et al., "Electrochemical properties of biologically active heterocyclic naphthoquinones," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 9, no. 2, pp. 163–169, 1998.
- [34] J. Benites, J. A. Valderrama, F. Rivera et al., "Studies on quinones—part 42: synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 2, pp. 862–868, 2008.
- [35] E. A. Hillard, F. C. de Abreu, D. C. M. Ferreira, G. Jaouen, M. O. F. Goulart, and C. Amatore, "Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds," *Chemical Communications*, no. 23, pp. 2612–2628, 2008.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que há uma demanda global por novos medicamentos, principalmente para as doenças negligenciadas. Essa necessidade existe por vários fatores, como a inexistência ou ineficácia dos fármacos para a cura dessas doenças, bem como os efeitos adversos provocados pelos mesmos. Deste modo, muitos são os esforços no meio científico para se desenvolverem novas vacinas, metodologias para diagnóstico, esquemas de tratamento e no nosso caso o desenvolvimento de métodos alternativos para a descoberta de novas drogas para o tratamento e controle das Leishmanioses (Nwaka & Hudson, 2006; Pecoul, 2004).

No campo da busca, descoberta e desenvolvimento de novas drogas, no que se refere às fases pré-clínicas e, mais especificamente nos testes *in vitro* contra *Leishmania*, não existe um consenso sobre o método utilizado. Historicamente, o método microscópico clássico (Berman & Lee, 1984) é o mais aceito como padrão ouro. Com os novos conhecimentos sobre biotecnologia, novas ferramentas estão sendo desenvolvidas e possibilitando tornar este método mais prático e rápido. Neste contexto, o que mais ganhou força foi o desenvolvimento de *Leishmania* transgênica que permite a automatização da triagem de droga utilizada por vários autores e que está relacionada na Tabela 3 (página 41).

Outro ponto importante é o estágio morfológico do parasito que deve ser utilizado na triagem, visto que não existe uma correlação perfeita entre as substâncias que mostraram atividades contra as formas promastigotas e foram posteriormente testadas contra as amastigotas intracelulares ou vice e versa (De Muylder *et al.*, 2011; Vermeersch *et al.*, 2009)

A forma amastigota axênica não é totalmente representativa da amastigota intracelular (Rochette *et al.*, 2009), porém alguns pontos de partida para a descoberta da droga foram identificados. A falta de correlação da atividade entre amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares também tem sido relatada (De Muylder *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de um método de Triagem de alto rendimento (HTS) usando a forma amastigota intracelular que infectam macrófagos humanos foi primeiramente relatada em 2010 como um ensaio secundário para confirmar a atividade de compostos selecionados como ativos contra a forma promastigota (Siqueira-Neto *et al.*, 2010). Em 2011, foi adaptado para um formato de placa de 96 poços e testadas algumas centenas de compostos (De Muylder *et al.*, 2011). Ambos os trabalhos não utilizaram parasitos transgênicos, mas marcações específicas e a avaliação foi realizada após captação de imagem com posterior análise computacional. Este mecanismo aumenta muito o custo.

O método alternativo proposto neste trabalho foi considerado como Triagem de médio rendimento (MTS). A *L. (L.) amazonensis* expressando a proteína vermelha fluorescente

(RFP) foi produzida para a realização da triagem de drogas com leitura direta em placas de 96 poços contendo macrófagos murinos infectados e leitura em espectrofluorímetro. Desta forma, o método se tornou mais rápido e reprodutível comparado ao teste clássico de triagem com contagens microscópicas. Na tabela 4 (página 82) pode ser feita a comparação dos principais métodos de alto rendimento atualmente utilizados para a triagem de novas substâncias contra *Leishmania*. Quando compara-se o método proposto neste trabalho (MTS) com os métodos de HTS, esse apresenta vantagens como a simplicidade de leitura em espectrofluorímetro que consequentemente reduz o custo final da triagem, além de não requerer marcação adicional para a leitura, a *Leishmania* fluorescente produzida a partir de plasmídeo de integração não necessita de manutenção sob o antibiótico de seleção. Desta forma, essa limitação para triagem de droga não existe.

Um grande avanço desse trabalho foi a leitura da fluorescência emitida pelo parasito intracelular de forma satisfatória e quando analisadas substâncias testes foram obtidas as curvas dose-resposta, confirmando a morte do parasito. Além disso, o teste pode ser realizado em laboratórios que tenham estruturas mais simples, demandando uma capela de fluxo laminar, estufa CO₂, e um espectrofluorímetro.

O caminho para a descoberta de uma nova droga é longo, complexo e exige muito investimento. No caso de doenças negligenciadas, dificilmente uma instituição consegue realizar todas as etapas sozinha. E mais, o mercado não é rentável para grandes empresas farmacêuticas, com alto custo de desenvolvimento e baixo potencial relativo de mercado. Apesar disto, o cenário mundial está favorável à descoberta e desenvolvimento destas drogas que o mercado tanto precisa. Parcerias são essenciais, e existem diferentes modelos de parcerias que podem envolver diferentes tipos de instituição.

Fazer proteção de propriedade intelectual (Patente) de novas drogas para *Leishmania* pode não ser tão relevante se o parceiro for uma multinacional e/ou uma Empresa Público Privada, mas pode ser fundamental se o parceiro for uma pequena empresa [200, 245].

O desenvolvimento de um novo medicamento não necessariamente passa pela descoberta de novas entidades químicas, reconhecido como um processo de alto risco (taxa de sucesso de 7 % para moléculas pequenas e 11% para biológicos), longo (em média 13,5 de anos) e de alto custo (Nwaka & Hudson, 2006; Paul *et al.*, 2010).

Outra abordagem para o desenvolvimento e descoberta de novos fármacos é a modificação molecular que oferece uma gama de possibilidades para a construção de novas moléculas. Neste contexto, neste trabalho testamos grupos de substâncias de três grupos diferentes. O colaborador Dr. Marcus Vinícius Norra de Souza de Farmanguinhos que sintetizou os derivados das diaminas, a colaboradora Dra. Célia Maria Correa da UFOP que

sintetizou os derivados do propranolol e Dra. Cynthia Demicheli do ICEX/UFMG que sintetizou os complexos metálicos de bismuto, antimônio e estanho com o lapachol foram os nossos colaboradores. Essas colaborações resultaram nos artigos desta tese. Apesar de não termos encontrado uma substância excelente chegamos a alguns candidatos promissores. Além disso, percebemos que a abordagem sintética associada ao conhecimento da atividade de tais substâncias contra outros protozoários auxiliaram nessa descoberta.

Tabela 4: Resumo dos recentes protocolos para triagens de drogas contra *Leishmania*.

Tipo de triagem	Tipo de Análise	Necessidade de substrato ou corante	Estágio do parasite	Aplicação para qualquer espécie de <i>Leishmania</i> /célula hospedeira	Tipo de Célula Hospedeira	Espécie	Referências
HTS	Resazurina	Sim	Promastigota	Sim/Não	--	<i>L. major</i>	(Siqueira-Neto <i>et al.</i> , 2010)
	Draq5 (marcador de DNA)		Amastigota intracelular	Sim/Sim	THP1	<i>L. major</i> / <i>L. donovani</i>	
HTS	Reagente CellTiter-Glo (ATP-bioluminescente)	Sim	Promastigota	Sim/Não	--	<i>L. donovani</i>	(De Muylder <i>et al.</i> , 2011)
	Dapi (marcador de DNA)		Amastigota intracelular	Sim/Sim	THP1		
	Reagente CellTiter-Glo		Amastigota Axênica	Sim/Não	--		
HTS	Reagente azul Cell Titer	Sim	Promastigota	Sim/Não	--	<i>Leishmania</i> sp	(Sharlow <i>et al.</i> , 2010)
MTS	Fluorescência RFP	Não	Amastigota intracelular	Sim/Sim	Macrófagos peritoneais murinos	<i>L. amazonensis</i>	(Rocha <i>et al.</i> , 2013)

HTS= triagem de alto rendimento

MTS= triagem de médio rendimento

THP1= linhagem monocítica de leucemia aguda humana

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnew P, Holzmuller P, Michalakakis Y, Sereno D, Lemesre JL, Renaud F. *In vitro* growth of *Leishmania amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine is dependent on interactions among strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1928-9.

Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002; 346:891-5.

Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006; 61:223-74.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7:e35671.

Arthur G, Bittman R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem. Biophys. Acta*. 1998; 1390:85-102.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30:1269-81.

Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3776-83.

Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol* 1998; 30:435-43.

Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 1995; 34:474-9.

Berman J, Bryceson AD, Croft S, Engel J, Gutteridge W, Karbwang J, Sindermann H, Soto J, Sundar S, Urbina JA. Miltefosine: issues to be addressed in the future. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100 Suppl 1:S41-4.

Berman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:197-201.

Berman JD, Lee LS. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. *J Parasitol* 1984; 70:220-5.

Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27:916-20.

Beverley SM, Clayton CE. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol* 1993; 21:333-48.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86:51-6.

Boeck P, Bandeira Falcao CA, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem* 2006; 14:1538-45.

Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol* 2010; 127:637-45.

Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 2002; 20:3277-84.

- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. Clin Microbiol Rev 1996; 9:512-31.
- Buckner FS, Wilson AJ. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. Am J Trop Med Hyg 2005; 72:600-5.
- Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spinola RM, Cruz OG. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. Cad Saúde Pública 2001; 17:1263-7.
- Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin Immunol Immunopathol 1983; 27:176-86.
- Chalfie M. Green fluorescent protein. Photochem Photobiol 1995; 62:651-6.
- Chan MM, Bulinski JC, Chang KP, Fong D. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. Parasitol Res 2003; 89:266-71.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 2007; 5:873-82.
- Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4⁺ T cells. Infect Immun 2007; 75:4648-54.
- Convit J, Pinardi ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. Trans R Soc Trop Med Hyg 1972; 66:603-10.
- Costa CH, Tapety CM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:415-9.
- Costa JM. Nipple involvement in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) produced by *Leishmania (L) amazonensis*. Rev Soc Bras Med Trop 1995; 28:139.

Costa JM, Garcia AM, Rebelo JM, Guimarães KM, Guimarães RM, Nunes PM. Fatal case during treatment of American tegumentary leishmaniasis with sodium stibogluconate bp 88 (shandong xinhua). Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36:295-98.

Costa S. dos S, de Assis Golim M, Rossi-Bergmann B, Costa FT, Giorgio S. Use of *in vivo* and *in vitro* systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. Korean J Parasitol 2011; 49:357-64.

Costa SS, de Assis Golim M, Rossi-Bergmann B, Costa FT, Giorgio S. Use of *in vivo* and *in vitro* systems to select *Leishmania amazonensis* expressing green fluorescent protein. Korean J Parasitol 2011; 49:357-64.

Croft SL. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. Trends Pharmacol Sci 1988; 9:376-81.

Croft SL. The current status of antiparasite chemotherapy. Parasitol 1997; 114 Suppl:S3-15.

Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochem Pharmacol 1987; 36:2633-6.

Croft SL, Oliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1478-83.

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

Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. J Antimicrob Chemother 1996; 38:1041-7.

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

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des 2002; 8:319-42.

- Davis AJ, Murray HW, Handman E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. Trends Parasitol 2004; 20:73-6.
- De Andrade-Neto VF, Goulart MO, da Silva Filho JF, da Silva MJ, Pinto Mdo C, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14:1145-9.
- De Muylder G, Ang KK, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e1253.
- Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcao CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, Sinisterra RD, Frezard F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:100-3.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 1986; 89:271-7.
- Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. Biochem J 2004; 381:405-12.
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16:710-8.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27:305-18.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis 1997; 25:1240-2.

Do Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D, Corbeil J, Melo MN, Frezard F, Ouellette M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e1167.

Dube A, Gupta R, Singh N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. Trends Parasitol 2009; 25:432-9.

Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in *in vitro* and *in vivo* experimental models. Parasitol Res 2005; 96:216-23.

Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:4474-84.

Eue I, Zeisig R, Arndt D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells. J Cancer Res Clin Oncol 1995; 121:350-6.

Evans KJ, Kedzierski L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. J Trop Med 2012; 2012:892817.

Eyong KO, Kumar PS, Kuete V, Folefoc GN, Nkengfack EA, Baskaran S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. Bioorg Med Chem Lett 2008; 18:5387-90.

Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugere B, Dumon H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:827-30.

Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende DM, Hermont V, Abrantes CF, Gazzinelli RT. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine 2008; 26:5888-95.

Fischer C, Voss A, Engel J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190:85-7.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2012; 2:11-19.

Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 2009; 14:2317-36.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol* 2004; 155:224-30.

Ganguly NK, Bano R, Seth SD. Human genome project: pharmacogenomics and drug development. *Indian J Exp Biol* 2001; 39:955-61.

Garnier T, Mantyla A, Jarvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:802-10.

Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:71-80.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2004; 7:338-49.

Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J* 1943; 37:198-209.

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

Gubbels MJ, Li C, Striepen B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:309-16.

Guevara P, Dias M, Rojas A, Crisante G, Abreu-Blanco MT, Umezawa E, Vazquez M, Levin M, Anez N, Ramirez JL. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. J Med Entomol 2005; 42:48-56.

Gupta S. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. Indian J Med Res 2011; 133:27-39.

Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 1996; 77:57-64.

Hammond DJ, Cover B, Gutteridge WE. A novel series of chemical structures active in vitro against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78:91-5.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354:1191-9.

Hochhuth CH, Vehmeyer K, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. Cell Immunol 1992; 141:161-8.

Hollon T, Yoshimura FK. Variation in enzymatic transient gene expression assays. Anal Biochem 1989; 182:411-8.

Inocencio da Luz R, Romero GA, Dorval ME, Cruz I, Canavate C, Dujardin JC, Van Assche T, Cos P, Maes L. Drug susceptibility of *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. J Antimicrob Chemother 2011; 66:677-9.

Ioset JR, Brun R, Wenzler T, Kaiser M, Yardley V. Drug screening for kinetoplastids Diseases: A training manual for screening in neglected diseases. DNDi and Pan-Asian Screening Network 2009: 1-74.

- Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB, Lawyer PG, Were JB, Reed SG, Panisko DM, Limmer BL. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* spp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:464-80.
- Jarvis JN, Lockwood DN. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 2013; 26:1-9.
- Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:26-30.
- Kaiser C, Jen T, Garvey E, Bowen WD, Colella DF, Wardel JR, Jr. Adrenergic agents. 4. Substituted phenoxypropanolamine derivatives as potential beta-adrenergic agonists. *J Med Chem* 1977; 20:687-92.
- Kamau SW, Grimm F, Hehl AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effects of antileishmanial compounds in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3654-6.
- Kaminsky R. Miltefosine Zentaris. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:550-4.
- Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1084-94.
- Karigiannis G, Papaoiannou D. Structure, biological activity and synthesis of polyamine analogues and conjugates. *Eur J Org Chem* 2000; 2000:1841-63.
- Kaur J, Sundar S, Singh N. Molecular docking, structure-activity relationship and biological evaluation of the anticancer drug monastrol as a pteridine reductase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1742-8.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4:1-24.

Kohli M, Ganguly NK, Kaur S, Chugh KS, Sharma VK, Bhushnurmath SR. Does Convit vaccine (BCG + *Mycobacterium leprae*) afford protection against biochemical changes in renal brush border membrane in experimental leprosy? *Lepr Rev* 1991; 62:269-75.

Kram D, Thale C, Kolodziej H, Kiderlen AF. Intracellular parasite kill: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods* 2008; 333:79-88.

Kumar D, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. In vitro susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to Miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:835-8.

Lagishetty CV, Naik SR. Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian J Pharmacol* 2008; 40:121-5.

Lainson R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 1997; 11 (1):29-40.

Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 1978; 273:595-600.

Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cell Microbiol* 2005; 7:383-92.

Lima NM, Correia CS, Leon LL, Machado GM, Madeira Mde F, Santana AE, Goulart MO. Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:757-61.

Lin CJ, Barbosa AS. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metodologia* 2002; 46 (6):330-40.

- Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. J Antimicrob Chemother 2001; 47:537-46.
- Lira R, Mendez S, Carrera L, Jaffe C, Neva F, Sacks D. *Leishmania tropica*: the identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. Exp Parasitol 1998; 89:331-42.
- Lovaas E, Carlin G. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. Free Radic Biol Med 1991; 11:455-61.
- Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Oppendoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 2000; 111:1-14.
- Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. Exp Cell Res 1997; 232:339-48.
- Madureira AM, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Ferreira MJU, Cunha AP, Rosario VE. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional in S. Tome and Principe Island. Journal Ethnopharmacology 2002; 81:23-29.
- Main BG, Tucker H. Recent advances in beta-adrenergic blocking agents. Prog Med Chem 1985; 22:121-64.
- Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. J Antimicrob Chemother 2010; 65:496-507.
- Marinho FA, Goncalves KC, Oliveira SS, Oliveira AC, Bellio M, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2011; 106:507-9.

Martinez A, Carreon T, Iniguez E, Anzellotti A, Sanchez A, Tyan M, Sattler A, Herrera L, Maldonado RA, Sanchez-Delgado RA. Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium-clotrimazole complexes display high in vitro activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. J Med Chem 2012; 55:3867-77.

Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E, Schubach Ade O, Marzochi KB. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42:570-80.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1997; 30:162-63

Mbongo N, Loiseau PM, Lawrence F, Craciunescu DG, Robert-Gero M. Uptake into *Leishmania donovani* promastigotes and antileishmanial action of an organometallic complex derived from pentamidine. Arzneimittelforschung 1998; 48:850-5.

Mehta SR, Zhang XQ, Badaro R, Spina C, Day J, Chang KP, Schooley RT. Flow cytometric screening for anti-leishmanials in a human macrophage cell line. Exp Parasitol 2010; 126:617-20.

Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol 2007; 147:67-76.

Michel G, Ferrua B, Lang T, Maddugoda MP, Munro P, Pomares C, Lemichez E, Marty P. Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, in vivo, ex vivo and in vitro. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e1323.

Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora MS, Brasília, 2006a, p. 138.

Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com Coinfecção Leishmania-HIV. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora MS, Brasília, 2011, p. 112.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora MS, Brasília, 2007, p. 182.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Editora MS, Brasília, 2006b, p. 122.

Misteli T, Spector DL. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* 1997; 15:961-4.

Morais-Teixeira E, Carvalho AS, Costa JC, Duarte SL, Mendonca JS, Boechat N, Rabello A. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:358-62.

Morais-Teixeira E, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ, Rabello A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:475-8.

Moreira ES, Anacleto C, Petrillo-Peixoto ML. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. *Parasitol Res* 1998; 84:720-6.

Moreira ES, Soares RM, Petrillo-Peixoto Mde L. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. *Parasitol Res* 1995; 81:291-5.

Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* 2000; 275:21149-57.

- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366:1561-77.
- Nagata K, Hirai KI, Koyama J, Wada Y, Tamura T. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:700-2.
- Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol* 1999; 58:749-57.
- Neal RA, Croft SL. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14:463-75.
- Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P, Weninger W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000222.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6169.
- Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Curr Med Chem* 2010; 17:1594-617.
- Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:941-55.
- Okelo GB, Sang D, Bhatt KM. The treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis: a report of two cases. *East Afr Med J* 1991;68: 67-8.
- Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Matsumoto Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Exp Anim* 2003; 52:109-18.

Oliveira LG, Silva MM, Paula FC, Pereira-Maia EC, Donnici CL, Simone CA, Frezard F, Silva EN, Jr., Demicheli C. Antimony(V) and bismuth(V) complexes of lapachol: synthesis, crystal structure and cytotoxic activity. *Molecules* 2011; 16:10314-23.

Olliaro PL, Bryceson AD. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1993; 9:323-8.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; 7:257-66.

Oyanagui Y. Anti-inflammatory effects of polyamines in serotonin and carrageenan paw edemata - possible mechanism to increase vascular permeability inhibitory protein level which is regulated by glucocorticoids and superoxide radical. *Agents Actions* 1984; 14:228-37.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:203-14.

Pazzagli M, Devine JH, Peterson DO, Baldwin TO. Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Anal Biochem* 1992; 204:315-23.

Prefeitura de Belo Horizonte (PBH). SAÚDE LEISHMANIOSE. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&. Acesso em 28 dez 2012.

Pecoul B. New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. *PLoS Med* 2004; 1:e6.

Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* 2003; 278:49965-71.

Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2468-74.

Pinheiro AC, Rocha MN, Nogueira PM, Nogueira TC, Jasmim LF, de Souza MV, Soares RP. Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-t-butyloxycarbonyl-protected diamines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71:273-8.

Pinto CN, Dantas AP, De Moura KC, Emery FS, Polequevitch PF, Pinto MC, de Castro SL, Pinto AV. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittelforschung* 2000; 50:1120-8.

Ravinder, Bhaskar, Gangwar S, Goyal N. Development of luciferase expressing *Leishmania donovani* axenic amastigotes as primary model for in vitro screening of antileishmanial compounds. *Curr Microbiol* 2012; 65:696-700.

Raychaudhury B, Banerjee S, Gupta S, Singh RV, Datta SC. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Trop* 2005; 95:1-8.

Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. Drug sensitivity of *plasmodium falciparum*. An in-vitro microtechnique. *Lancet* 1978; 1:22-3.

Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126:129-42.

Rocha MN: Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* spp fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos. In: CPqRR/Ciências da Saúde Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte-MG, 2009, p. 83.

Rocha MN, Correa CM, Melo MN, Beverley SM, Martins-Filho OA, Madureira AP, Soares RP. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 282-291.

- Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68:401-9.
- Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulos B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 165:32-47.
- Romero IC, Saravia NG, Walker J. Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis* in vitro. *J Parasitol* 2005; 91:1474-9.
- Ross R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *Br Med J* 1903; 2:1261-2.
- Rossi-Bergmann B, Costa SS, Moraes VLG. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science* 1997; 49:395-402.
- Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopoulos B. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 110:195-206.
- Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 19:195-200.
- Sampaio RNR, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:77.
- Sanchez BA, Varotti FP, Rodrigues FG, Carvalho LH. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. *J Microbiol Methods* 2007; 69:518-22.

Schettini DA, Costa Val AP, Souza LF, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frezard F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:1879-83.

Segawa H, Soares RP, Kawakita M, Beverley SM, Turco SJ. Reconstitution of GDP-mannose transport activity with purified *Leishmania* LPG2 protein in liposomes. *J Biol Chem* 2005; 280:2028-35.

Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:380-7.

Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 2007; 56:1213-8.

Sereno D, Alegre AM, Silvestre R, Vergnes B, Ouaisi A. In vitro antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:808-12.

Sereno D, Guilvard E, Maquaire S, Cavaleyra M, Holzmuller P, Ouaisi A, Lemesre JL. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. *Acta Trop* 2001; 80:195-205.

Shahian M, Alborzi A. Effect of meglumine antimoniate on the pancreas during treatment of visceral leishmaniasis in children. *Med Sci Monit* 2009; 15:CR290-3.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 22:1567-72.

Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 2008; 5:545-51.

Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 1965; 52:591-611.

Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania* major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet* 1998; 351:1540-3.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Junior G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79:511.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:285-91.

Silveira FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM: Doenças Infeciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. In: *Leishmaniose Tegumentar Americana*. (Leão RNQ, ed.), Editora CEJUP, 1997, pp. 619-30.

Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella Mdel C, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:627-30.

Singh N, Dube A. Short report: fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71:400-2.

Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sundar S, Dube A. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:370-4.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004; 10:307-15.

Siqueira-Neto JL, Song OR, Oh H, Sohn JH, Yang G, Nam J, Jang J, Cechetto J, Lee CB, Moon S, Genovesio A, Chatelain E, Christophe T, Freitas-Junior LH. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4:e675.

Soares RP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. An Acad Bras Cienc 2003; 75:301-30.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis 2004; 38:1266-72.

Souza AS, Giudice A, Pereira JM, Guimaraes LH, de Jesus AR, de Moura TR, Wilson ME, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. BMC Infect Dis 2010; 10:209.

Strongin DE, Bevis B, Khuong N, Downing ME, Strack RL, Sundaram K, Glick BS, Keenan RJ. Structural rearrangements near the chromophore influence the maturation speed and brightness of DsRed variants. Protein Eng Des Sel 2007; 20:525-34.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health 2001; 6:849-54.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med 2002; 347:1739-46.

Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, Murray HW, Singh VP. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:139-43.

Sundar S, Thakur BB, Tandon AK, Agrawal NR, Mishra CP, Mahapatra TM, Singh VP. Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala-azar. Bmj 1994; 308:307.

SUS 2012a: Portal da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/proffisional/area.cfm?id_area=1560. Acesso em 31 dez. 2012.

SUS 2012b: Portal da Saúde. Leishmaniose Visceral. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561. Acesso em 31 dez. 2012.

Tavares J, Ouaisi M, Ouaisi A, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. *Acta Trop* 2007; 103:133-41.

Teixeira GR, Mendes MA, Chiari E, Oliveira AB, Corrêa CM. Síntese de naftiloxipropanolaminas com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. 24 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, MG 2001; MD010.

Theoharides TC. Polyamines spermidine and spermine as modulators of calcium-dependent immune processes. *Life Sci* 1980; 27:703-13.

Thompson JF, Hayes LS, Lloyd DB. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* 1991; 103:171-7.

Urbina JA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100 Suppl 1:S9-S16.

Van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:184-94.

Vandeputte J, Wachtel JL, Stiller ET. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a Streptomycete. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot. Annu* 1956; 1955-1956:587-91.

Vannier-Santos MA, Menezes D, Oliveira MF, de Mello FG. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* 2008; 154:3104-11.

- Varela MR, Munoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, Chang KP, Muskus C. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol* 2009; 122:134-9.
- Vehmeier K, Scheurich P, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. *Cell Immunol* 1991; 137:232-8.
- Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3010-5.
- Vermeersch M, da Luz RI, Tote K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3855-9.
- World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis. . Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, WHO Technical Report Series 949 2010: 1-202.
- World Health Organization (WHO). Essential leishmaniasis maps. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis.map/en/index.html>. Acesso em 05 set. 2011.
- Wood KV. Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6:50-8.
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; 279:39925-32.
- Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. *Bmj* 2002; 325:176-7.
- Zaghloul IY, Al-Jasser M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol* 2004; 98:793-800.