



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LAURA MARIA ALCÂNTARA

DESCOBRIMENTO DE CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL: DO DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO
BASEADO EM IMAGEM À TRIAGEM DE COMPOSTOS EM MODELOS *IN VITRO*

DISCOVERY OF NEW DRUG CANDIDATES FOR VISCERAL *LEISHMANIASIS*
TREATMENT: FROM IMAGE-BASED ASSAY DEVELOPMENT TO *IN VITRO*
COMPOUNDS SCREENING

CAMPINAS

2017

LAURA MARIA ALCÂNTARA

**DESCOBRIMENTO DE CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS PARA
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: DO DESENVOLVIMENTO DE
UM ENSAIO BASEADO EM IMAGEM À TRIAGEM DE COMPOSTOS EM
MODELOS *IN VITRO***

**DISCOVERY OF NEW DRUG CANDIDATES FOR VISCERAL *LEISHMANIASIS*
TREATMENT: FROM IMAGE-BASED ASSAY DEVELOPMENT TO *IN VITRO*
COMPOUNDS SCREENING**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Genética e Biológica Molecular,
na área de Imunologia*

Thesis presented to the Biology Institute of the
University of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Doctor in the
area of Immunology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE, DEFENDIDA
PELA ALUNA LAURA MARIA
ALCÂNTARA E ORIENTADA PELO DR.
LUCIO HOLANDA GONDIM DE
FREITAS JUNIOR

Orientador: Dr. Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140907/2013-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

AL16d Alcântara, Laura Maria, 1988-
Descobrimiento de candidatos a novos fármacos para tratamento da leishmaniose visceral : do desenvolvimento de um ensaio baseado em imagem à triagem de compostos em modelos *in vitro* / Laura Maria Alcântara. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania*. 2. Leishmaniose visceral. 3. Ensaio de triagem em larga escala. 4. Descoberta de drogas. I. Freitas-Junior, Lucio Holanda. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Discovery of new drugs candidates for visceral leishmaniasis treatment : from image-based assay development to *in vitro* compounds screening **Palavras-chave em inglês:**

Leishmania

Visceral leishmaniasis

High-throughput screening assays

Drug discovery

Área de concentração: Imunologia

Título: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior [Orientador]

Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Ricardo Toshio Fujiwara

Marcio Vinicius Bertacine Dias

Danilo Ciccone Miguel

Data de defesa: 29-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior (orientador)

Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Aos meus pais José Gaspar e Sueli.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Lúcio e Carolina, pelos anos de aprendizado e convivência, por confiarem em meu trabalho e me darem o apoio necessário para o desenvolvimento do projeto. Além disso, agradeço todas as oportunidades, incentivo e motivação que me proporcionaram ao longo desse período;

Ao Laboratório Nacional de Biosciências – LNBio – por proporcionar excelente infraestrutura para a realização do projeto;

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da UNICAMP;

Ao *Center for research in inflammatory diseases* – CRID – USP, Ribeirão Preto, onde foram obtidos parte dos resultados apresentados na tese;

Aos parceiros DNDi, na figura de Eric Chatelain, e Comissão Europeia, pelo apoio financeiro e científico. O suporte de todos os envolvidos foi de suma importância para o planejamento e execução do projeto;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto durante a bolsa de doutorado direto;

A todos os colaboradores que fizeram parte desse projeto, em especial a: Prof. Carlos Roque Duarte Correia (Instituto de Química, UNICAMP), Prof. Hélio Stefani (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), Profa. Carolina Horta (Faculdade de Farmácia, UFG) e Prof. Simon Bernhard Cämmerer (Instituto de Química, UNICAMP). Obrigada a vocês e aos alunos envolvidos, por confiarem em nosso trabalho;

Ao *Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH)*, Universidade da Antuérpia, Bélgica, sob a supervisão do Prof. Loius Maes. Meu muito obrigada a todos os membros do laboratório, em especial a Margot, An e Pim, por terem me ensinado tanto durante o período de estágio;

Ao departamento de Biologia Animal, da UNICAMP, onde realizei meu estágio no Programa de Estágio Docente. Muito obrigada a todos os professores, técnicos e alunos, em especial ao Prof. Danilo Ciccone, por me receberem de forma tão gentil e por me ensinarem tanto durante esse período;

À minha família do laboratório: Betico, Bruno, Claudinha, Denis, Gigi, Lu, Nic, Rafinha, Thalitex, Van e Valberino. Não tenho palavras para demonstrar o quanto me sinto grata por ter conviado com vocês durante esse período. Sem a ajuda e contribuição de cada um de vocês, o desenvolvimento desse projeto não seria possível. Muito obrigada pelas tantas horas de laboratório, mesmo que durante o fim de semana e feriado, pelas conversas depois do almoço (até as discussões), pelos conselhos sobre o futuro, pelo apoio e motivação nos períodos difíceis, pelas piadas e risadas. Vocês, sem sombra de dúvidas, são os melhores!

Aos meus amigos da Turma V, de Engenharia Biotecnológica, UNESP – Assis, não só pelos anos incríveis que tivemos durante a faculdade, mas também pelos momentos que continuamos compartilhando, sempre cheios de amizade, carinho, consideração e amor. Apesar de não termos a mesma convivência frequente, sempre que encontramos são dias mais que especiais, que me mostram que nada mudou. Meu muito obrigada em especial a Mari e Bi, que tive a sorte de continuar convivendo em Campinas e tiveram papel fundamental durante esse período. Muito obrigada pelo carinho, pelas conversas e desabafos, pela convivência e compreensão. Vocês fizeram meus dias em Campinas mais leves e alegres;

A Caio, o melhor namorado-amigo-parceiro de laboratório que eu poderia imaginar. Muito obrigada pelo incentivo, motivação e por me ouvir e apoiar tanto durante essa etapa. Você deixou essa trajetória muito mais interessante e divertida. Me sinto muito feliz de poder compartilhar tantos momentos e planos com você. Obrigada por tudo, dentro e fora do laboratório. Nós somos uma dupla e tanto!

Às minhas queridas amigas de Araxá: Amanda, Marcella, Cibele e Carina, por estarem presente durante tanto tempo em minha vida. É muito bom saber que passamos por tantos momentos da vida uma da outra e que ainda vamos compartilhar tantas outras coisas! Que possamos sempre estar juntas, apesar da distância. A amizade de vocês é, sem dúvida, um presente.

À toda minha família que me apoia em todas minhas escolhas, sendo sempre meu porto-seguro. Obrigada de coração ao meu pai e minha mãe, José Gaspar e Sueli, por toda dedicação, suporte e amor, e por se sentirem tão orgulhosos das minhas conquistas. À minha irmã Rosa, minha melhor amiga, por sempre ter sido meu melhor modelo e exemplo, e por ter nos dado nosso presente Miguel. Sem vocês eu não conseguiria realizar meus sonhos!

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que provocam grande impacto na saúde pública de países em desenvolvimento. A quimioterapia disponível ainda é limitada e apresenta importantes limitações; portanto, é prioritária a pesquisa e descoberta de novos fármacos com potencial leishmanicida. Nesse contexto, os ensaios de alto conteúdo (HCS) vem sendo empregados eficientemente nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos, para identificação de moléculas candidatas com atividade anti-*Leishmania*. Apesar das vantagens, essa metodologia ainda apresenta baixas taxas de *hits* e de confirmação, quando comparada a modelos de outras doenças, e alta taxa de falhas quando os compostos são testados em modelos in vivo. Além disso, os protocolos de HCS vem sendo empregados para um número limitado de cepas de *Leishmania*, geralmente *L. donovani*, embora espécies/cepas possam diferir drasticamente em termos de infecção e suscetibilidade aos fármacos. Dessa forma, focado em protocolos de HCS previamente publicados, um ensaio baseado em imagem foi desenvolvido e otimizado, para a triagem de compostos contra amastigotas intracelulares de diferentes cepas/espécies viscerais de *Leishmania*. Para cada espécie/cepa, estabeleceu-se o modelo biológico, determinando-se as melhores condições de cultivo para célula hospedeira e parasita, infecção e período de exposição aos compostos, e padronizou-se o método de análise de imagem através do software comercial. Entre as cepas/espécies estabelecidas, houve diferenças no perfil de infecção, em termos de taxa de infecção, número de parasitas intracelulares e taxa de multiplicação celular; bem como na atividade de compostos referência: enquanto a anfotericina B apresentou atividade consistente contra as cepas, a miltefosina mostrou atividade dependente da cepa, com valores de EC₅₀ entre 0,4 e 7,6 µM. O mesmo perfil de variação dependente da cepa ocorreu na dinâmica de atividade dos compostos referência, na triagem de bibliotecas e na atividade dos *hits* selecionados; evidenciando, assim, a importância da expansão do portfólio de ensaios in vitro para *Leishmania*. Através da metodologia estabelecida, a prospecção de candidatos a fármacos foi realizada, utilizando diferentes abordagens: triagem de bibliotecas de extratos naturais e compostos sintéticos, reposicionamento de fármacos e combinação terapêutica. Destacam-se os resultados obtidos através: (i) da biblioteca Hypha Mycodiverse, da qual foram identificados cinco compostos purificados com atividade anti-*Leishmania* promissora (EC₅₀ ≤ 1,3 µM), (ii) das coleções de compostos/extratos de diferentes colaboradores, com classes terapêuticas e químicas inéditas ou pouco exploradas, tais como marinoquinolinas, chalconas e belzil-farnesil aminas, e candidatos potenciais (EC₅₀ < 10 µM), representando moléculas e scaffolds iniciais para otimização química, (iii) da biblioteca comercial LOPAC, da qual o composto nitro CB1954 apresentou atividade de amplo espectro: contra as diferentes cepas e formas do ciclo de vida do parasita e contra outros tripanossomatídeos, com valores de EC₅₀ na grandeza de nano e micro molar, e (iv) da combinação terapêutica, na qual o inibidor de calpaína MDL28170 apresentou perfil sinérgico em associação com anfotericina e miltefosina. Conclui-se que a metodologia estabelecida representa uma importante contribuição para os processos iniciais do desenvolvimento de fármacos, sendo que os candidatos identificados nesse trabalho poderão ser explorados futuramente como alternativa de terapia para leishmanioses.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by protozoan parasites of genus *Leishmania*, which lead to severe impact in public health of developing countries. The available chemotherapy is still inadequate and presents important limitations; therefore, the research and the discovery of new leishmanicidal drugs must be prioritized. In this context, the high content screenings (HCS) have been applied efficiently in the early drug development, for identification of candidate molecules with anti-*Leishmania* activity. Despite the advances, the methodology still has several drawbacks such as low ratio of *hits* and confirmation, compared to others diseases models, and high number of failures, when compounds are assessed in *in vivo* assays. Additionally, HCS protocols have been developed, to the date, for a limited number of *Leishmania* species, mostly *L. donovani*, although different species/strains may diverge dramatically in regard to drug susceptibility. Therefore, focused on HCS protocols previously published, an image-based assay was developed and optimized, in order to screen compounds against intracellular amastigotes of distinct *Leishmania* species and strains. For each species/strain, the biological model was established by determining the best conditions of host cell and parasite culture, infection and period of drug exposition; and an image analysis method was standardized using a commercial software. Among the strains/species established, differences were observed in the general infection parameters, in terms of infection ratio, intracellular amastigotes number and multiplying amastigotes ratio; also, diverging results were verified for reference compounds activity: while amphotericin B presented consistent activity against strains, miltefosine showed strain-dependent activity, with EC₅₀ values from 0.4 to 7.6 μM. The strain-specific profile also occurred in the activity dynamics of reference compounds, in libraries screening and in the activity of selected *hits*, confirming the importance of expanding the *in vitro* *Leishmania* portfolio. Throughout this methodology, candidates' prospectations were performed within different screening approaches: triage of libraries containing natural products and synthetic compounds, drugs repurposing and drugs combination. Among the results, we highlight: (i) Hypha Mycodiverse library, from which we identified five purified compounds with promising anti-*Leishmania* activity (EC₅₀ ≤ 1.3 μM), (ii) Compounds and extracts collections from collaborators, from which we discovered new chemical and therapeutic classes, such as marinoquinolines, chalcones and belzil-farnesil amines, and potential candidates (EC₅₀ < 10 μM), representing molecules and scaffolds for chemical optimization, (iii) LOPAC library screening, from which we selected the nitro compound CB1954, that presented a broad-spectrum activity: against distinct strains and life cycle forms of *Leishmania* and others trypanosomatids, with EC₅₀ values from nano to micro molar and (iv) drugs combination, in which the calpain inhibitor MDL28170 present synergic effect in association with amphotericin B and miltefosine. We concluded that this novel methodological approach represents an important contribution for early stage anti-*Leishmania* drug discovery and the candidates identified can be further explored as an alternative for *Leishmaniasis* therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica mundial de casos de leishmaniose tegumentar (acima) e leishmaniose visceral (abaixo) reportados no ano de 2015, segundo a OMS.	19
Figura 2. Parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	23
Figura 3. Esquema do desenvolvimento de fármacos para leishmanioses.	32
Figura 4. Plataforma de triagem de compostos de alta performance.....	41
Figura 5. Mapa das placas de ensaio para triagens em alta escala	54
Figura 6. Esquema do ensaio desenvolvido para triagem de compostos contra o modelo modelo de infecção de macrófagos THP-1 por <i>Leishmania</i>	62
Figura 7. Estabelecimento da melhor densidade das células THP-1	64
Figura 8. Efeito da remoção do PMA depois da completa diferenciação celular.	65
Figura 9. Efeito dos diferentes meios de cultura na taxa de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania</i> e no perfil de infecção.....	67
Figura 10. Efeito dos diferentes períodos de incubação no perfil da infecção.....	68
Figura 11. Efeito da concentração de bicarbonato de sódio no meio de cultura de promastigotas de <i>Leishmania</i>	69
Figura 12. Efeito do número de passagens da cultura de promastigotas no perfil de infecção	70
Figura 13. Validação do modelo de infecção por <i>Leishmania</i> em células THP-1..	72
Figura 14. Interface do software comercial de análise Harmony (Perkim Elmer).	73
Figura 15. Imagem representativa das etapas do processamento de imagem através do software Harmony	75
Figura 16. Avaliação da sensibilidade de análise pelo software de processamento Harmony.	80
Figura 17. Curvas de dose-resposta para compostos referência contra o modelo de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção).	81
Figura 18. Validação do ensaio de alto conteúdo para parasitas intracelulares de <i>L. infantum</i>	82
Figura 19. Curvas de crescimento celular para promastigotas das diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	85
Figura 20. Perfil da infecção de cepas viscerais de <i>Leishmania</i> em células THP-1.	87
Figura 21. Painel de imagens representativas para os modelos de infecção de cepas de <i>Leishmania infantum</i>	88
Figura 22. Painel de imagens representativas para os modelos de infecção de cepas de <i>Leishmania donovani</i>	89

Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de DMSO na taxa de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1	91
Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de DMSO no número de parasitas intracelulares de <i>Leishmania</i> em células THP-1.....	92
Figura 25. Avaliação da taxa de multiplicação celular de amastigotas intracelulares de diferentes cepas de <i>Leishmania</i> infectando células THP-1..	94
Figura 26. Curvas dose-resposta para compostos referência contra o modelo de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1, após 96 horas de exposição às drogas (120 horas após infecção).	96
Figura 27. Dinâmica de atividade do composto anfotericina B para o modelo de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1.....	98
Figura 28. Dinâmica de atividade do composto miltefosina para o modelo de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1.....	100
Figura 29. Dinâmica de atividade do composto experimental VL-2098 para o modelo de infecção de <i>Leishmania</i> em células THP-1..	102
Figura 30. Distribuição dos controles infectados e não-infectados para a campanha de triagem da biblioteca Hypha's MycoDiverse™	104
Figura 31. Triagem primária da biblioteca de extratos naturais Hypha's MycoDiverse™ contra o modelo de infecção de <i>L. infantum</i>	105
Figura 32. Curvas dose-resposta dos extratos da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de <i>L. infantum</i> , após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção)..	108
Figura 33. Perfil de atividade das frações primárias isoladas dos extratos selecionados da triagem da biblioteca natural Hypha's MycoDiverse™	109
Figura 34. Curvas dose-resposta das frações secundárias obtidas a partir através da campanha de triagem da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de <i>Leishmania</i> , após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção).....	111
Figura 35. Fluxograma de trabalho para triagem de extratos naturais da biblioteca Hypha's MycoDiverse™.	114
Figura 36. Triagem primária da biblioteca de extratos naturais de plantas do Sudão, contra o modelo de alto conteúdo de <i>L. infantum</i>	115
Figura 37. Curvas dose-resposta das frações secundárias obtidas a partir da triagem de frações de plantas contra parasitas intracelulares de <i>L. infantum</i> , após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção)..	116

Figura 38. Estrutura química das marinoquinolinas A-F.	118
Figura 39. Triagem primária da biblioteca de marinoquinolinas e seus análogos..	119
Figura 40. Curvas dose-resposta para os <i>hits</i> selecionados a partir da triagem primária, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção).....	120
Figura 41. Estrutura química dos análogos de azaindóis.....	123
Figura 42. Estudos de relação de estrutura-atividade para os análogos de chalcona testados contra o modelo de <i>Leishmania</i>	126
Figura 43. Atividade biológica dos análogos de benzil-farmesil amina contra os modelos de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	129
Figura 44. Estrutura geral e análogos do inibidor da enzima esqualeno-sintase.	132
Figura 45. Triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de <i>L. infantum</i>	134
Figura 46. Triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de <i>L. donovani</i>	136
Figura 47. Perfil de atividade dos <i>hits</i> selecionados da campanha de triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de <i>Leishmania</i>	137
Figura 48. Perfil de frequência dos <i>hits</i> selecionados em relação a atividade e citotoxicidade..	138
Figura 49. Perfil terapêutico geral da biblioteca LOPAC versus perfil terapêutico dos <i>hits</i> selecionados da triagem primária contra os modelos de <i>Leishmania</i>	140
Figura 50. Estrutura química dos compostos selecionados a partir da triagem da biblioteca LOPAC®.	143
Figura 51. Atividade biológica dos compostos CB1954, Dilazep, MDL 28170 e SKF-95282 contra diferentes cepas e formas do ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i>	158
Figura 52. Curvas dose-reposta dos <i>hits</i> selecionados da biblioteca LOPAC® contra as formas de promastigotas, após 72 horas de exposição às drogas	159
Figura 53. Curvas dose-reposta dos <i>hits</i> selecionados da biblioteca LOPAC® contra as formas de amastigotas intracelulares, após 96 horas de exposição às drogas (72 horas, para <i>L. infantum</i> MHOM/BR/1972/BH046).	160
Figura 54. Isobogramas de combinação entre <i>hits</i> da biblioteca LOPAC com o composto referência anfotericina.	163
Figura 55. Isobogramas de combinação entre <i>hits</i> da biblioteca LOPAC com o composto referência miltefosina.	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio <i>in vitro</i> disponíveis para desenvolvimento de fármacos contra parasitas de <i>Leishmania</i>	36
Tabela 2. Parâmetros da análise de alto conteúdo para processar imagens obtidas no modelo de <i>Leishmania</i>	77
Tabela 3. Atividade biológica dos compostos referência para as diferentes cepas de <i>Leishmania</i>	96
Tabela 4. Atividade biológica dos extratos da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de <i>L. infantum</i>	107
Tabela 5. Atividade leishmanicida das frações secundárias ativas da biblioteca Hypha's MycoDiverse™.	112
Tabela 6. Atividade biológica dos derivados de azaindóis contra o modelo de infecção de <i>L. infantum</i> MHOM/BR/1972/BH046.	122
Tabela 7. Atividade biológica dos análogos de chalconas selecionados através do docking molecular contra o modelo de infecção de <i>L. infantum</i> em células THP-1.	125
Tabela 8. Parâmetros quantitativos das curvas de dose-resposta contra os modelos de amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> e <i>T. cruzi</i>	130
Tabela 9. Parâmetros quantitativos da triagem da biblioteca LOPAC.	133
Tabela 10. Atividade leishmanicida dos compostos selecionados da biblioteca LOPAC em da triagem confirmatória.	141
Tabela 11. Perfil farmacológico do composto CB1954.	146
Tabela 12. Perfil farmacológico do composto MDL 28170.	149
Tabela 13. Perfil farmacológico do composto Dilazep.	152
Tabela 14. Perfil farmacológico do composto SKF- 95282.	155
Tabela 15. Perfil de combinação da anfotericina B com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC, destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.	162
Tabela 16. Perfil de combinação da miltefosina com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC, destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.	164
Tabela 17. Atividade biológica dos compostos selecionados em diferentes modelos de tripanossomatídeos.	166

SUMÁRIO

1.Introdução.....	18
1.1. Leishmanioses: aspectos gerais e epidemiologia	18
1.2. <i>Leishmania</i> : uma breve revisão acerca do parasita	21
1.3. Leishmanioses: o amplo espectro de manifestações clínicas.....	24
1.3.1. Leishmaniose cutânea.....	25
1.3.2. Leishmaniose muco-cutânea	25
1.3.3. Leishmaniose Visceral.....	26
1.4. Tratamento: opções e limitações	27
1.5. Desenvolvimento de fármacos.....	31
1.6. Modelos de <i>Leishmania</i> para desenvolvimento de fármacos	35
1.6.1. O que nós temos de ensaios disponíveis hoje?	35
1.7. Outras questões envolvendo os modelos <i>in vitro</i> para leishmanioses	42
2.Objetivos.....	44
2.1. Objetivos gerais	44
2.2. Objetivos específicos	44
3.Metodologia.....	45
3.1. Culturas de células e parasitas	45
3.2. Compostos referência, bibliotecas químicas e preparação de amostras	47
3.3. Estabelecimento do ensaio biológico.....	48
3.3.1. Preparação e diferenciação da linhagem celular THP-1.....	48
3.3.2. Infecção com promastigotas axênicos de <i>Leishmania</i>	49
3.4. Ensaio de multiplicação celular com EdU	50
3.4.1. Multiplicação da célula hospedeira	50
3.4.2. Multiplicação de parasitas intracelulares.....	50
3.5. Ensaio de viabilidade de amastigotas intracelulares.....	51
3.6. Determinação da atividade biológica de moléculas contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i>	51
3.6.1. Plaqueamento e infecção	51
3.6.2. Preparação e adição dos compostos.....	52
3.6.3. Fixação e coloração das placas.....	55
3.7. O ensaio de “ <i>time-kill</i> ”	55
3.8. Estudos de combinação.....	55

3.9. Aquisição e análise de imagens - Sistema de alto conteúdo	56
3.10. Avaliação da inibição de crescimento em promastigotas de <i>Leishmania</i>	56
3.11. Avaliação da inibição de crescimento em amastigotas intracelulares de <i>T.cruzi</i>	57
3.12. Avaliação da inibição de crescimento em tripomastigotas sanguíneos de <i>T.brucei</i>	57
3.13. Análise de dados	58
3.13.1. Normalização dos resultados quantitativos	58
3.13.2. Comparação entre grupos e correlação.....	59
3.13.3. Controle de qualidade – Z’ – factor.....	59
3.13.4. Análise dos resultados das triagens	59
3.13.5. Análise dos resultados dos ensaios de combinação.....	60
3.13.6. Pesquisa dos compostos selecionados em plataformas online de busca	60
4.Resultados e discussão	61
SEÇÃO I: Desenvolvimento do ensaio baseado em imagem para triagem de compostos contra <i>Leishmania</i>	61
4.11. Estabelecimento e otimização do ensaio biológico.....	63
4.12. Validação do modelo de infecção de células THP-1 por promastigotas de <i>Leishmania</i>	70
4.13. Padronização e validação da aquisição de imagens e software de análise.....	73
4.14. Validação do ensaio baseado em imagem para triagem de compostos contra <i>Leishmania</i>	82
SEÇÃO II: Desenvolvimento de um painel de cepas viscerais de <i>Leishmania</i> para investigação do perfil de infecção e atividade de drogas referência	83
4.15. Padronização dos ensaios biológicos	84
4.16. Validação do painel de cepas	95
4.17. Dinâmica de atividade para as drogas referência	97
SEÇÃO III: Triagem das bibliotecas de compostos sintéticos e extratos naturais no modelo de amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> em células THP-1	103
4.18. Triagem da biblioteca de compostos naturais Hypha’s MycoDiverse™	103
4.19. Triagem da biblioteca de extratos naturais de plantas do Sudão.....	115
4.20. Triagem de compostos e extratos naturais enviados por colaboradores.....	117
4.20.1. Triagem de coleção de marinoquinolinas e seus análogos	117

4.20.2. Triagem da coleção de derivados de azaindóis - Colaboração com Prof. Hélio A. Stefani, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.....	121
4.20.3. Triagem de compostos análogos de chalconas – Colaboração com Profa. Carolina Horta, Universidade Federal de Goiás.....	123
4.20.4. Triagem da coleção de inibidores da biossíntese de esteróis (benzil farmesil amina) – Colaboração com Prof. Simon Bernhard Cämmerer, UNICAMP	127
SEÇÃO IV: Triagem da biblioteca LOPAC.....	133
4.21. Triagem da biblioteca LOPAC® contra os modelos de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i>	133
4.22. Estudo dos compostos selecionados do screening da biblioteca LOPAC quanto ao perfil farmacológico e químico, possíveis alvos e mecanismos de ação	143
4.22.1. CB1954.....	144
4.22.2. MDL 28170	147
4.22.3. Dilazep.....	149
4.22.4. SKF- 95282	153
4.23. Avaliação dos <i>hits</i> selecionados da triagem da biblioteca LOPAC no painel de cepas estabelecido	155
4.24. Combinação dos <i>hits</i> encontrados com compostos referência	161
4.25. Avaliação dos <i>hits</i> selecionados da triagem da biblioteca LOPAC em outras espécies de <i>Leishmania</i> , <i>T.brucei</i> e <i>T.cruzi</i>	165
5. Considerações finais	166
6. Referências	169
ANEXOS.....	200
Anexo I:	200
Anexo II:.....	201
Anexo III:	202
Anexo IV:	208
Anexo V:	209
Anexo VI:	210
Anexo VII	211
Anexo VIII:	212

1. Introdução

1.1. Leishmanioses: aspectos gerais e epidemiologia

As leishmanioses são, atualmente, algumas das doenças negligenciadas que mais despertam a atenção para a saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) as classificou como emergentes e descontroladas, estimando em 2 milhões o número de pessoas infectadas por ano. Desse número, 500 mil casos são de leishmaniose visceral (LV) e mais de um milhão de casos representam a forma tegumentar e suas divisões clínicas. Atualmente, cerca de 350 milhões de pessoas, em 98 diferentes países, estão em áreas de risco, sendo que destas, 12 milhões estão infectadas. No entanto, esses números ainda são bastante subestimados, visto que em algumas regiões não se tem dados de epidemiologia atualizados ou disponíveis. Além disso, em apenas 33 dos 98 países afetados, a notificação de casos é obrigatória e, não muito raramente, pacientes vem a óbito antes da doença ser diagnosticada. Enquanto que as áreas de maior prevalência para LV são Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (que representam 90% dos casos); os países com maiores concentrações de casos leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose muco-cutânea (LMC) são Afeganistão, Arábia Saudita, Bolívia, Brasil, Irã, Peru, Síria e Sudão (WHO, 2010; Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2013). A **figura 1** ilustra o número de casos reportados de ambas formas da doença, segundo o último levantamento realizado em 2015 (WHO, 2016a, 2016b)

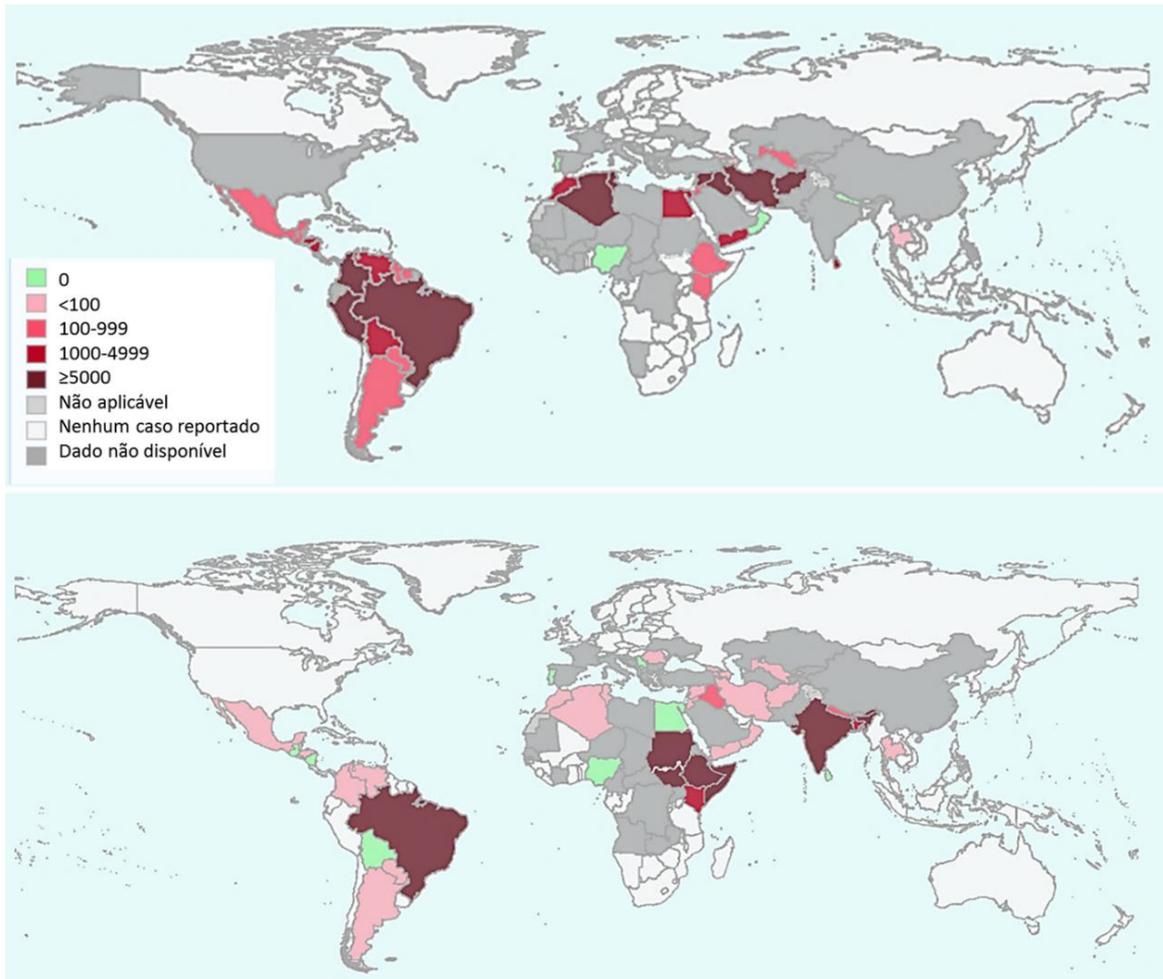


Figura 1. Distribuição geográfica mundial de casos de leishmaniose tegumentar (acima) e leishmaniose visceral (abaixo) reportados no ano de 2015, segundo a OMS. As cores do gráfico fazem referência ao número de novos casos, como indicado pela legenda. Fonte: adaptado de WHO,2016.

A distribuição das leishmanioses é dinâmica, o que significa que a maioria das áreas endêmicas passam por significativas flutuações de incidência ao longo do tempo. Recentemente, por exemplo, em países como Colômbia, Nicarágua e Paquistão, foi registrado aumento significativo no número de casos de LC, enquanto que Etiópia e Sudão sofreram epidemias da forma visceral da doença em áreas antes não reportadas. No entanto, de maneira geral, a doença vem sofrendo expansão geográfica no decorrer dos anos e isso está se dando, principalmente, à migração de pessoas para áreas endêmicas e ao processo de expansão da área urbana. (WHO, 2010; WHO, 2013).

Considerando o impacto mundial da doença, é estimado entre 20 e 40 mil o número de mortes anualmente causadas por LV, que ocorrem principalmente na Índia, no sudeste

asiático e na região sul do Sudão, onde casos com alta taxa de fatalidade são frequentes. Já para a LC, esse impacto não está claramente elucidado, uma vez que os indivíduos afetados pela doença moram principalmente em áreas remotas e/ou tem acesso restrito à assistência médica. No entanto, as formas cutâneas possuem um papel psicossocial importante, visto que devido as deformidades e complicações causadas pela doença, os pacientes podem frequentemente ser excluídos do convívio social ou afastados do ambiente de trabalho (WHO, 2013).

No Brasil, as LC e LMC são amplamente distribuídas em seu território, sendo que o país apresenta a maior concentração de casos da América Latina. Em 2003, casos autóctones haviam sido registrados em 27 estados brasileiros. No entanto, apesar do grande número de casos (aproximadamente 20 mil, em 2015), a doença não apresentou expansão desde 2000. Os estados de maior incidência são: Bahia, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Minas Gerais (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Quando à LV, um aumento no número de casos foi notado a partir da década de 90, destacando -se os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Minas Gerais. No ano de 2015, foram reportados 3.289 casos confirmados da doença, sendo que a região Nordeste somou 55% dos registros (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Segundo o último relatório da OMS, publicado em 2016, o Brasil é o único país que possui altas cargas de ambas manifestações: visceral e tegumentar (WHO, 2016).

As leishmanioses são doenças as quais a epidemiologia dependerá de diversos fatores, tais como: espécies do parasita e do vetor, as características ambientais das regiões de transmissão, a exposição da população ao agente etiológico no passado e o comportamento humano. Em diversos focos da doença, tais como Afeganistão, Brasil e Irã, as leishmanioses são antropozoonoses e, nesses casos, a inserção do homem em ciclos silvestres (como zonas rurais) poderia resultar em um maior risco de infecção. Entretanto, em outras regiões, como Bangladesh, Índia e Nepal, a transmissão é antroponótica e, por isso, o tratamento de indivíduos infectados é um aspecto chave para o controle da doença (WHO, 2010).

Outro fator importante na epidemiologia da doença é a leishmaniose canina, na qual os cães atuam como hospedeiros (assim como os humanos) e reservatórios. Em áreas endêmicas da América Latina, Mediterrâneo e Ásia Central, onde as leishmanioses são primeiramente zoonoses, esses animais possuem papel claro na manutenção e transmissão do parasita de *Leishmania*, no ciclo doméstico. É principalmente causada pela espécie *L. infantum*, tendo, portanto, maior impacto na manifestação visceral da doença. Nos cães susceptíveis, a doença se manifesta de forma severa, caracterizada por sinais viscerais e cutâneos; no entanto, é estimado que 85% dos animais infectados sejam assintomáticos (revisado por Alvar *et al.*, 2004; revisado por Gradoni, 2015).

Outros fatores que estão relacionados ao aumento do risco de infecção por *Leishmania* são (WHO, 2010):

- (i) Aspectos socioeconômicos, uma vez que condições de saneamento básico precárias podem elevar o número de vetores na região e uma nutrição escassa em nutrientes pode levar a um sistema imunológico debilitado;
- (ii) Má-nutrição, pois a falta de elementos nutricionais como proteínas, ferro e vitamina A aumentam o risco de infecções progredirem para manifestações mais severas;
- (iii) Migração populacional, pela introdução de pessoas não imunizadas em áreas endêmicas e em regiões antes não urbanizadas;
- (iv) Mudanças ambientais e climáticas, nas regiões dos extremos, pelo favorecimento de condições apropriadas para o vetor.

1.2. *Leishmania*: uma breve revisão acerca do parasita

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. São organismos unicelulares flagelos, que se apresentam em diversas formas morfológicas durante seu ciclo de vida, sendo as principais delas: (i) promastigota, o qual possui forma alongada e flagelo livre bem evidente, apresenta motilidade, é extracelular e está presente nos vetores invertebrados e (ii) amastigota, o qual possui morfologia ovalada, apresenta flagelo interiorizado, não possui motilidade, é intracelular obrigatório e está presente nos hospedeiros vertebrados. Embora os parasitos sofram importantes processos de diferenciação ao longo do ciclo de vida, uma estrutura bastante típica é mantida: o cinetoplasto, o qual consiste em uma mitocôndria única, contendo um aglomerado de moléculas de DNA circulares, denominado kDNA (revisado por Liu *et al.*, 2005; Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007; Rey, 2008).

O gênero *Leishmania* é subdividido em três grandes subgêneros: *Leishmania*, *Saroleishmania* e *Viannia*, compreendendo mais de 50 espécies, as quais são classificadas baseando-se em: distribuição geográfica, vetor associado, manifestação clínica e parâmetros genéticos e enzimáticos. As áreas de distribuição da doença tem sido classificadas em “Novo Mundo”, quando localizada nas Américas, e “Velho Mundo”, quando se trata da África, Ásia e Europa. Enquanto que todo o subgênero *Viannia* foi isolado no Novo Mundo e o subgênero *Saroleishmania* foi isolado no Velho Mundo, as espécies do subgênero *Leishmania* foram identificadas no Velho e/ ou Novo Mundo (WHO, 2010; Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007;

Akhoundi *et al.*, 2016).

Das espécies catalogadas, aproximadamente 20 são patogênicas em humanos, sendo parasitas heteroxenos, alternando seu ciclo biológico entre insetos vetores e mamíferos (**figura 2a**). A transmissão se dá, principalmente, quando vetores infectados (flebotomíneos fêmeas do gênero *Phlebotomus*, presentes na África, Ásia e Europa; e do gênero *Lutzomyia*, presentes nas Américas Central e do Sul) injetam os parasitas flagelados (**figura 2b**), denominados promastigotas metacíclicos, nas camadas subdermais da pele do hospedeiro durante a alimentação. Os promastigotas caem na corrente sanguínea e então sofrem fagocitose por células fagocíticas mononucleares. Sabe-se que parasitas do gênero *Leishmania* são direcionadas para os fagolisossomos (ou vacúolos digestivos) e, nesses compartimentos, se diferenciam para o estágio não-flagelado de amastigotas (**Figura 2c**). Essas formas, por sua vez, sofrem divisões celulares e são liberados na corrente sanguínea, onde poderão infectar novas células fagocíticas ou serem capturados pelo inseto flebotomíneo. Já no trato digestório do inseto, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, dando continuidade ao ciclo de transmissão do parasita (Handman, 1999; Sacks & Kamhawi, 2001; Kaye & Scott, 2011; revisado por Esch & Petersen, 2013).

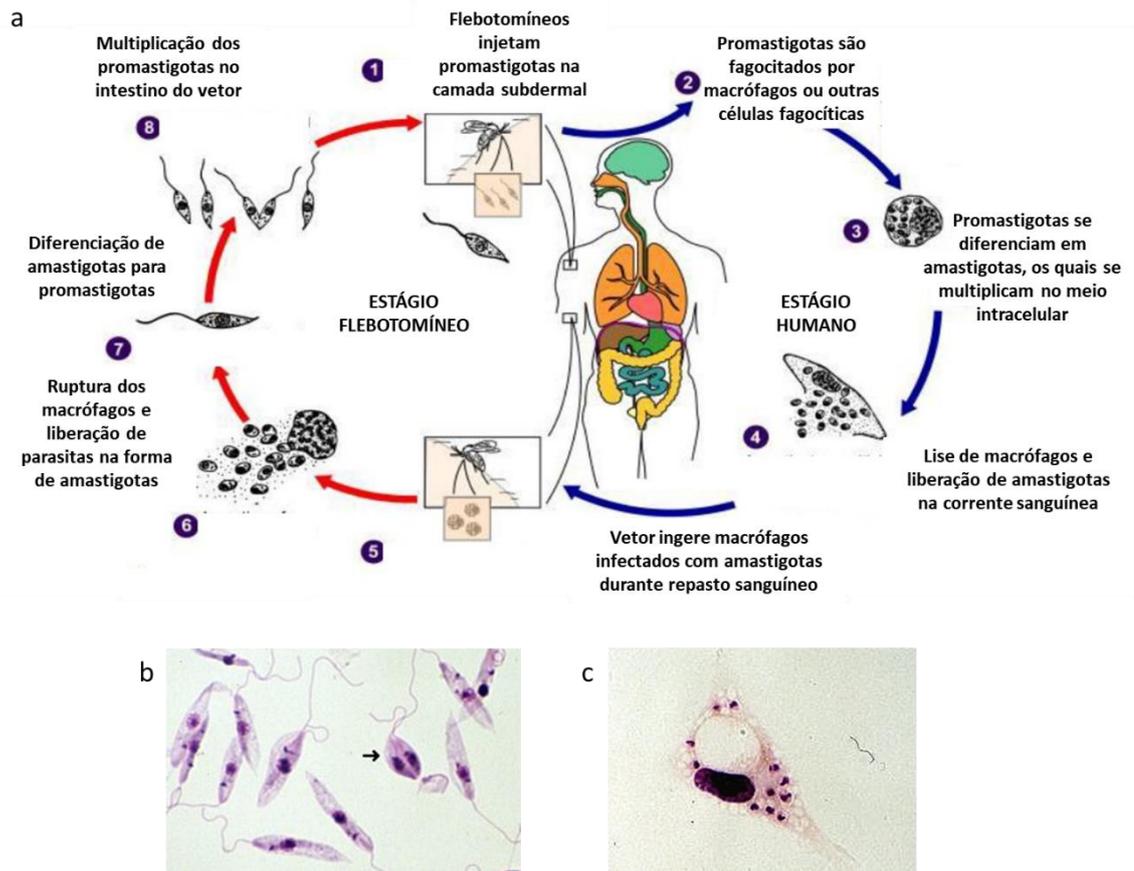


Figura 2. Parasitas do gênero *Leishmania* (a) Ciclo de vida do parasita *Leishmania*, demonstrando os estágios no vetor flebotomíneo e no hospedeiro vertebrado, nesse caso o humano. Fonte: adaptado de CDC, 2013. (b) Lâmina corada com giemsa mostrando as formas extracelulares e flageladas: promastigotas (100x) e (c) Lâmina corada com giemsa apresentando macrófagos infectados com amastigotas intracelulares (40x). A seta indica parasitas em divisão celular. Fonte: Keas, 1999.

Quanto às relações parasito-hospedeiro, após a entrada no organismo do hospedeiro vertebrado, promastigotas de *Leishmania* devem sobreviver à exposição de inúmeros componentes do sangue, como o sistema complemento, e de células do sistema imune presentes na pele. Embora estudos recentes reportarem que promastigotas metacíclicos e amastigotas são significativamente mais resistentes ao sistema complemento e possuem maior infectividade, uma rápida infecção bem-sucedida a células hospedeiras pode significar a sobrevivência do parasita (Sacks & Perkins, 1984; Brittingham *et al.*, 1995; revisado por Saporito *et al.*; 2013).

O parasita de *Leishmania* tem a capacidade de interagir e infectar uma ampla variedade de tipos celulares; no entanto, o modelo clássico de infecção se dá em macrófagos.

A fagocitose das formas promastigotas pelas células hospedeiras ocorre em um processo clássico mediado por receptor, envolvendo uma série de moléculas tanto do parasita quanto da célula hospedeira. Considerando o parasito, diversos estudos apontam a proteína GP63 como molécula-chave no reconhecimento do parasita pelas células, no início da fagocitose e na sobrevivência dos parasitos intracelulares (Brittingham *et al.*, 1995; revisado por de Moraes *et al.*, 2015; D. Liu & Uzonna, 2012).

No entanto, dependendo da via de ativação, os macrófagos são as principais células efetoras responsáveis pela eliminação de parasitos intracelulares, incluindo a *Leishmania*. Uma vez que são ativados, uma cascata de vias enzimáticas e metabólicas é desencadeada, tendo como resultado a acidificação dos fagolisossomos, a liberação de espécies reativas de oxigênio e a produção de óxido nítrico. Por isso, parasitos de *Leishmania* necessitam dispor de um vasto arsenal de estratégias para manipular as vias de ativação dos macrófagos, a fim de resistir a esse micro - ambiente hostil e completar seu ciclo de vida (diferenciação e multiplicação). A própria diferenciação dos promastigotas para amastigotas dentro das células hospedeiras já é entendida como um mecanismo de evasão, visto que essas formas suportam melhor compartimentos ácidos e são resistentes à lise enzimática por hidrolases lisossomais. Além disso, já foi reportado que os amastigotas são capazes de modular processos como a inibição da produção de óxido nítrico, evitando o estresse oxidativo, a inibição da produção de citocinas inflamatórias, a inibição da apresentação adequada de moléculas em células apresentadoras de antígenos, entre outros eventos (revisado por de Moraes *et al.* 2015).

1.3. Leishmanioses: o amplo espectro de manifestações clínicas

As leishmanioses são um conjunto de doenças que abrangem um amplo espectro de manifestações clínicas, variando de casos assintomáticos até letais. O perfil e o curso da infecção por *Leishmania*, bem como a manifestação clínica associada, é um processo bastante complexo que consta de um vasto número de variáveis. É uma interação que dependerá não só de fatores intrínsecos do hospedeiro, como o sistema imunológico e as características genéticas (Blackwell *et al.*, 2009; Jeronimo *et al.*, 2007; Sakthianandeswaren, Foote, & Handman, 2009; Singh *et al.*, 2012), mas também de fatores inerentes ao parasito, como a virulência das diferentes espécies e cepas (Naderer, Vince & McConville, 2004), e a fatores do vetor (Warburg *et al.*, 1994; Maia *et al.*, 2011; revisado por McCall *et al.*, 2013).

Entre as diferentes manifestações clínicas, as principais são caracterizadas: (i) por úlceras pontuais na pele (leishmaniose cutânea – LC), (ii) pela degeneração das mucosas

(leishmaniose muco-cutânea – LCM) e (iii) por infecções sistêmicas (leishmaniose visceral – LV) (Desjeux, 2004; Piscopo & Mallia Azzopardi, 2007; Kevric, Cappel & Keeling, 2015). A seguir, uma breve descrição acerca de cada uma delas.

1.3.1. Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea é a mais comum das manifestações clínicas e se caracteriza por uma ou mais lesões na pele do indivíduo. Inicia-se como pequenas pápulas eritematosas, geralmente na região da picada do vetor flebotomíneo, as quais vão progredindo de tamanho até se tornarem lesões ulceradas. O período de incubação até a aparição dos primeiros sintomas pode variar de duas semanas a vários meses, dependendo da espécie do parasita e da localização geográfica (revisado por Kevric, Cappel & Keeling, 2015).

No “Velho Mundo”, a doença é causada principalmente por cinco espécies: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani*, sendo que as infecções se resolvem espontaneamente dentro de um ano. Já no “Novo Mundo”, é causada por múltiplas espécies dos dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, as quais vão apresentar quadros clínicos variáveis: enquanto que nas infecções causadas por *L. mexicana* ocorrem cura espontânea dentro de 4 meses, para as espécies de *L. brasiliensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, a resolução da infecção pode levar um período de 6 meses (WHO, 2010).

Quadros de leishmaniose cutânea podem evoluir para formas mais severas, tais como: difusa, disseminada e recidivante. A manifestação difusa, comumente associada a *L. amazonensis*, caracteriza-se pela disseminação de nódulos por toda a extensão do corpo do indivíduo. Nesses casos, pode-se observar um alto número de parasitos nas lesões, que parece ser devido à resposta imunológica deficiente. Além disso, os pacientes são frequentemente não responsivos a tratamentos. A forma disseminada, por sua vez, causada por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, apresenta-se como múltiplas lesões papulares, principalmente em regiões como cabeça e tronco; enquanto que a manifestação recidivante, causada por espécies do “Velho Mundo”, leva a um quadro de cronicidade, com a formação de uma lesão única na face do indivíduo (Convit *et al.*, 1993; Hajjarian *et al.*, 2013; revisado por Hartley *et al.*, 2014).

1.3.2. Leishmaniose muco-cutânea

O termo “Muco-cutâneo” é empregado corretamente apenas no “Novo Mundo”, sendo essa manifestação causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis*. Essas

espécies possuem a capacidade de causar metástase nos tecidos de mucosa, na região da boca e do trato respiratório superior, pela disseminação de parasitas via sistema linfático ou circulatório. Acredita-se que esta forma da doença seja uma seqüela severa da leishmaniose cutânea e que ocorre em cerca de 1 – 10% dos indivíduos infectados. O período entre a forma cutânea e a manifestação nas mucosas pode variar de alguns meses a anos depois da cicatrização das lesões da pele (WHO, 2010; revisado por Marra, Chiappetta & Vincenti, 2014).

Os casos mais comuns da doença se apresentam como lesões no septo cartilaginoso nasal, que progridem para ulceração da mucosa e posterior perfuração do septo. Outras manifestações mais severas da leishmaniose muco-cutânea podem envolver lábios, palato, faringe, laringe, entre outras regiões do rosto; sendo que, os estágios mais avançados da doença podem levar à severa mutilação, com obstrução e destruição dos órgãos (Marsden, 1986; WHO, 2010; Diniz, Costa, & Gonçalves, 2011).

Outros agravantes são: (i) rara cura espontânea da leishmaniose muco-cutânea, (ii) difícil tratamento, uma vez que frequentemente pacientes não respondem às terapias disponíveis e (iii) infecções oportunistas e secundárias, principalmente causadas por bactérias, que podem progredir para quadros de septicemia e óbito (revisado por Marra, Chiappetta & Vincenti, 2014).

1.3.3. Leishmaniose Visceral

Dentre o amplo espectro de manifestações clínicas causadas por *Leishmania*, a forma mais severa é denominada leishmaniose visceral, a qual é fatal se não tratada. Causada pelas espécies de *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (sinonímia de *L. infantum*), essa doença se caracteriza pela infecção sistêmica e crônica, afetando principalmente órgãos como o baço, o fígado e a medula óssea. O período de incubação pode variar de dias até anos, tendo o aparecimento dos sintomas de maneira gradual (revisado por Piscopo & Mallia Azzopardi, 2007; WHO, 2010).

A maioria dos casos é assintomático ou com sub sintomatologia, entretanto alguns fatores podem desencadear a manifestação da doença, tais como: nutrição deficiente, coinfeção com outros patógenos, fatores genéticos do hospedeiro e supressão do sistema imunológico (muito comum em pacientes HIV positivos). Como são resultado de uma gama de fatores, as manifestações clínicas são bastante variáveis. No entanto, os principais sintomas e sinais clínicos são: febre intermitente, mal-estar, perda de peso, palidez, anorexia, esplenomegalia, hepatomegalia e, em alguns casos, linfadenopatia. Quando não tratada, a LV

pode levar a: hemorragia, anemia severa, suscetibilidade a infecções secundárias e óbito, o qual ocorre dentro de um prazo médio de dois anos. As crianças abaixo de 10 anos são as principais afetadas nas áreas endêmicas, sendo que nesse grupo de indivíduos ainda pode ocorrer diarreia e retardo de crescimento (revisado por Murray *et al.*, 2005; Nail & Imam, 2013).

Outras variações da LV podem ocorrer em determinadas regiões do globo, como a leishmaniose dérmica Pós-Kala azar (PKDL) e a leishmaniose viscerotrópica. A primeira, decorrente de infecções por *L. donovani*, ocorre em uma pequena proporção de indivíduos na África e na Índia, após a resolução do quadro de LV. É caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele de carácter macular, maculo-papular ou nodular, que tomam toda a extensão do corpo do paciente (Islam *et al.*, 2013; Ramesh *et al.*, 2015). Já a segunda, é uma forma ainda mais rara, causada por *L. amazonensis* e *L. tropica*, a qual se apresenta como manifestações clínicas não-específicas, incluindo sintomas e sinais clínicos como febre, náusea, hepatoesplenomegalia e dores abdominais (Magili *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 2009).

1.4. Tratamento: opções e limitações

Atualmente, algumas opções de terapia estão disponíveis para tratamento da leishmanioses, as quais podem variar de acordo com a manifestação clínica (e espécie de *Leishmania*) e localização geográfica. Além de ser incontestável a importância para a melhora/cura do indivíduo, o tratamento bem-sucedido ainda representa uma medida chave no controle da doença, uma vez que vacinas contra esse patógenos não foram ainda desenvolvidas. No entanto, o arsenal de alternativas é, sobretudo, insatisfatório e apresenta diversas limitações, como: toxicidade, severos efeitos adversos, dificuldade de administração e longos períodos de tratamento em ambiente hospitalar, alto custo e desenvolvimento de resistência pelos parasitas. Além disso, as drogas podem apresentar atividades antiparasitárias variáveis em diferentes espécies (Croft & Olliaro, 2011; revisado por Kevric, Cappel & Keeling, 2015).

Os compostos antimoniais pentavalentes foram introduzidos na década de 40 e vem sendo usados como primeira escolha de terapia para LC, LCM e LV, no mundo todo, com exceção da Índia, onde tiveram que ser substituídos em resultado ao surgimento de resistência, e na Guiana Francesa, onde a maioria absoluta de casos é causada por *L. guyanensis* e apresentam alta taxa de falha de tratamento (Sundar *et al.*, 2000; Romero, Guerra *et al.*, 2001; Kevric, revisado por Cappel & Keeling, 2015). Atualmente, duas formulações são utilizadas: o estibogluconato de sódio, que é administrado de forma intravenosa, e o antimoniato de meglumine, cuja administração é intramuscular. Além disso, a aplicação intralesional é uma

opção terapêutica para casos de leishmaniose cutânea. O tratamento recomendado consiste em cursos prolongados e frequentes de administração da droga, que variam de 3 a 4 semanas (revisado por Kevric, Cappel & Keeling, 2015). Entre os efeitos adversos, pode-se salientar: sintomas gastrointestinais, fadiga, dor muscular, além de sintomas bastante graves, como cardiopatia (Matoussi *et al.*, 2007), pancreatite (Gasser *et al.*, 1994) e nefrotoxicidade (Rodrigues *et al.*, 1999). Por isso, o paciente em tratamento deve ser constantemente monitorado através de eletrocardiogramas, painéis metabólicos completos e avaliação de enzimas pancreáticas (revisado por Kevric, Cappel & Keeling, 2015).

Apesar do longo período em uso, a exata estrutura química dos compostos antimoniais permanece desconhecida, por possuírem estado amorfo. O mecanismo de ação e os possíveis alvos para esse medicamento não estão claramente elucidados; embora três modelos de mecanismos são sugeridos: (i) o composto agiria como pró- droga, a qual sofreria uma redução biológica para uma forma trivalente tóxica, levando o parasita a um processo de apoptose (Fairlamb & Cerami, 1992; Sereno *et al.*, 2001; Shaked-Mishan *et al.*, 2001; Tovar *et al.*, 1998), (ii) o composto teria atividade leishmanicida intrínseca, através da formação de complexos com biomoléculas contendo ribose, o que levaria a uma inibição da enzima DNA topoisomerase I (Chakraborty & Majumder, 1988; Lucumi *et al.*, 1998) e (iii) o composto teria atividade indireta sobre sistema imune do hospedeiro: na resposta inata, resultando na liberação de ROS por células infectadas; e na resposta adaptativa, modulando a liberação de citocinas específicas (revisado por Haldar *et al.*, 2011).

Embora tenha apresentado grande porcentagem de cura globalmente (80 - 100%) na década de 90, alguns fatores tem limitado seu uso atualmente, como a resistência reportada em várias regiões do globo, como Índia, Peru e Sudão, bem como a grande variação de atividade da droga, que parece depender da espécie do parasita, da manifestação clínica e da região geográfica (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Llanos-Cuentas *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2006; Valencia *et al.*, 2012).

A anfotericina B, por sua vez, foi inicialmente introduzida em regiões da Índia, para tratamento de pacientes com LV refratários aos compostos antimoniais, sendo que esse medicamento tornou-se a primeira linha de terapia em regiões endêmicas, onde casos de resistência aos antimoniais foram reportados (Jha *et al.*, 1995; Thakur *et al.*, 1993). Apesar da grande taxa de cura alcançada com a anfotericina B (98% em todas as regiões do globo), o tratamento baseado na formulação com desoxicolato, consiste em um curso prolongado de administração parental, que varia de 15 a 30 dias. Além disso, apresenta limitações

consideráveis, tais como a nefrotoxicidade associada ao uso prolongado do medicamento, o que resulta na necessidade de monitoramento médico do paciente (revisado por Singh *et al.*, 2016).

Na tentativa de aperfeiçoar as características farmacocinéticas do medicamento bem como evitar os possíveis efeitos adversos causados pela toxicidade, formulações alternativas já foram desenvolvidas, como a anfotericina B encapsulada em lipossomos ou associada a lipídios, as quais preservam a atividade do composto e garantem o direcionamento da molécula para células específicas do organismo (revisado por Singh *et al.*, 2016). Diversos estudos demonstram que essas novas formulações possuem a mesma eficácia (>96%) quando comparadas à formulação padrão, com a vantagem de que requerem menor período de tratamento e apresentam efeitos adversos mais brandos (Sinha & Bhattacharya, 2014; Sundar *et al.*, 2001). Em estudo realizado por Sundar & Chakravarty, 2010, em Bihar – Índia, por exemplo, tratamentos com uma única administração de anfotericina B lipossomal alcançaram uma taxa de cura de 96%, com pequenos efeitos adversos e baixas taxas de recaída (Sundar & Chakravarty, 2010). Recentemente, o mesmo resultado foi observado em Bangladesh, onde uma eficácia de 97% foi obtida através da administração única de anfotericina B lipossomal a 10mg/kg (Mondal *et al.*, 2014). Apesar disso, essas alternativas terapêuticas ainda apresentam alto custo e necessitam de estruturas refrigeradas para a manutenção das formulações, o que restringe/inviabiliza sua implementação na maioria das áreas endêmicas.

Quanto ao mecanismo de ação da anfotericina B, a atividade leishmanicida do medicamento vem sendo atribuída à interação da molécula com componentes da membrana plasmática do parasita, mas especificamente com o ergosterol, que resultaria na formação de poros na membrana e, conseqüentemente, no aumento da permeabilidade e lise celular (Kamiński, 2014; Saha, Mukherjee, & Bhaduri, 1986; Singh, Kumar, & Singh, 2012).

A miltefosina foi registrada como o primeiro tratamento oral para leishmaniose e, por isso, apresentou um grande avanço na quimioterapia para a doença. Primeiramente usada no tratamento de câncer de mama e outros tipos de cânceres sólidos, as primeiras evidências científicas de atividade anti-*Leishmania* ocorreram nas décadas de 80 e 90 (Croft *et al.*, 1987; Croft, Snowdon, & Yardley, 1996). Como se tratava de uma droga já aprovada para uso humano, foi possível acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos e os primeiros testes clínicos para tratamento de leishmaniose foram realizados no final da década de 90 (Jha *et al.*, 1999; Sundar *et al.*, 1998). Diversos resultados promissores foram obtidos nas fases II e III dos ensaios clínicos, mostrando que a administração oral da miltefosina, em um curso de tratamento de 28 dias, levou a uma taxa de cura de 94% - 97% em crianças e adultos (Bhattacharya *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2000; Sundar *et al.*, 2006). Isso resultou na sua aprovação para uso

terapêutico na Índia, em 2002, na Alemanha, em 2004, na Colômbia em 2005 e em Bangladesh, em 2006. Além disso, foi licenciada na Europa, em 2005, para tratamento de pacientes co-infectados com o vírus HIV (Dorlo *et al.*, 2012; Jha *et al.*, 1999; Shyam Sundar *et al.*, 1998).

Apesar da facilidade do tratamento domiciliar, bem como as altas taxas de eficácia do fármaco no subcontinente indiano, o medicamento apresenta alguns limitantes, como: os efeitos gastrointestinais e hepáticos severos, o potencial teratogênico, o que limita seu uso em mulheres grávidas ou em fase de amamentação e a baixa aderência dos pacientes, devido ao longo regime de tratamento. Outro fator preocupante é o fato de que a miltefosina possui uma longa meia-vida no organismo, o que favoreceria o desenvolvimento de resistência por parte dos parasitas. Estudos feitos na Índia (Sundar *et al.*, 2012) e no Nepal (Rijal *et al.*, 2013) alarmam para uma diminuição na eficácia da miltefosina, embora a primeiro momento o tratamento tenha apresentado uma taxa de cura promissora. Além disso, a atividade do medicamento é sugerida ser dependente da espécie e a existência de cepas resistentes já foi reportada (revisado por Chakravarty & Sundar, 2010; Decuypere *et al.*, 2012; Mebrahtu *et al.*, 1989).

A atividade leishmanicida da miltefosina não está claramente elucidada, mas diferentes estudos indicam que esse fármaco possui mais de um mecanismo de ação, incluindo o metabolismo de lipídios (Rakotomanga *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2014) e processos de apoptose (Marinho *et al.*, 2011; Paris *et al.*, 2004; Verma & Dey, 2004). Além disso, trabalhos sugerem que essa molécula pode apresentar ação indireta na célula hospedeira, estimulando a produção de óxido nítrico (Dorlo, *et al.*, 2012; Wadhone *et al.*, 2009).

A pentamidina e a paromomicina também vem sendo reportadas como alternativa de tratamento. A primeira é usada como segunda linha de tratamento, quando a falha terapêutica com antimoniais e anfotericina B se manifesta. O curso de tratamento baseia-se na aplicação intravenosa ou intramuscular do medicamento, em um curso de 3 – 5 semanas (Amato *et al.*, 1998; van der Meide *et al.*, 2009). No entanto, sua alta toxicidade, baixa eficácia quando comparada a outras alternativas e seu custo tem limitado seu uso como monoterapia (revisado por K. Singh, Garg, & Ali, 2016). Além disso, sua atividade parece variar de acordo com a região geográfica e espécie causadora da doença (Andersen *et al.*, 2005; Lightburn *et al.*, 2003). Seu mecanismo de ação parece ser baseado na interação direta da molécula com o kDNA do parasita, que resultaria na inibição da enzima DNA topoisomerase II (Cortázar, Coombs, & Walker, 2007; Pućkowska *et al.*, 2012). Já a paromomicina é usada na formulação tópica, para tratamento de leishmaniose cutânea (Iraji & Sadeghinia, 2005; Kim, *et al.*, 2009), ou via intramuscular, para tratamento das manifestações viscerais (Musa *et al.*, 2010; Shyam Sundar

et al., 2009). Apesar de estudos clínicos realizados no Quênia, Sudão e Índia apontarem para uma alta taxa de cura acima de 80% em casos de LV, as principais desvantagens de seu uso são a toxicidade severa (principalmente, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade) e o longo regime de tratamento (Kim *et al.*, 2009). Além disso, como já mencionado anteriormente, estudos evidenciam a diferença de resposta dependente da região geográfica (Hailu *et al.*, 2010). Acredita-se que a atividade leishmicida do composto esteja relacionada à inibição de síntese proteica nos ribossomos e a processos de respiração celular (Chawla *et al.*, 2011; Fernández, Malchiodi, & Algranati, 2011).

No Brasil, o tratamento é gratuito e está disponível na rede de serviços do Sistema Único de Saúde (SUS). A escolha dos medicamentos para uso deverá considerar, por exemplo, a manifestação clínica, faixa etária do paciente, gravidez, contraindicações e comorbidades. Para as manifestações tegumentares, é altamente recomendável o uso do fármaco antimoniato de glucamina como primeira linha de tratamento; enquanto que, para leishmaniose visceral, a recomendação é baseada em três fármacos: o antimoniato de glucamina, a anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B. Apesar dos maiores benefícios da anfotericina B lipossomal (menor toxicidade, alta eficácia), o alto custo do medicamento, quando comparado às outras duas opções, limita seu uso para condições específicas: pacientes com insuficiência renal, hepática ou cardíaca, transplantados renal, hepático ou cardíaco, gestantes, indivíduos HIV positivos, falha terapêutica ou pacientes com hipersensibilidade aos outros medicamentos (Ministério da Saúde, 2014). Embora a miltefosina não esteja no portfólio de indicações terapêuticas no Brasil, o medicamento vem apresentando bons resultados para tratamento de leishmaniose cutânea. Estudos feitos em Manaus e Bahia demonstraram que a miltefosina foi segura, bem tolerada e com taxa de cura próxima a 75% para tratamento de LC (Machado *et al.*, 2010; Chrusciak-Talhari *et al.*, 2011).

Em resumo, apesar de algumas alternativas de tratamento para as leishmanioses estarem disponíveis, elas ainda apresentam diversos entraves e estão distantes de serem ideais. Nesse contexto, a ausência de um tratamento eficaz, seguro, de baixo custo e viável para regiões endêmicas (principalmente, de fácil administração) tem nos apontado para a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas ou o melhoramento das existentes.

1.5. Desenvolvimento de fármacos

Diversas abordagens vem sendo aplicadas para identificar novos candidatos com atividade antiparasitária, incluindo: a identificação de novas entidades químicas através de

triagens de bibliotecas químicas e naturais, a longo prazo, (Siqueira-Neto *et al.*, 2012; Sykes & Avery, 2015) e as estratégias em mais curto prazo, tais como terapia combinada, novas formulações para drogas em uso e o reposicionamento de fármacos (Alirol *et al.*, 2013; revisado por Andrews *et al.*, 2014; Hamill, 2013; Trinconi, *et al.*, 2014).

Considerando a expressiva demanda de tempo e investimento financeiro do *pipeline* clássico de desenvolvimento de fármacos (**figura 3**), as estratégias a curto prazo tem sido trazidas como uma solução promissora para acelerar o processo de identificação de candidatos (DiMasi, Hansen, & Grabowski, 2003; Pink *et al.*, 2005).

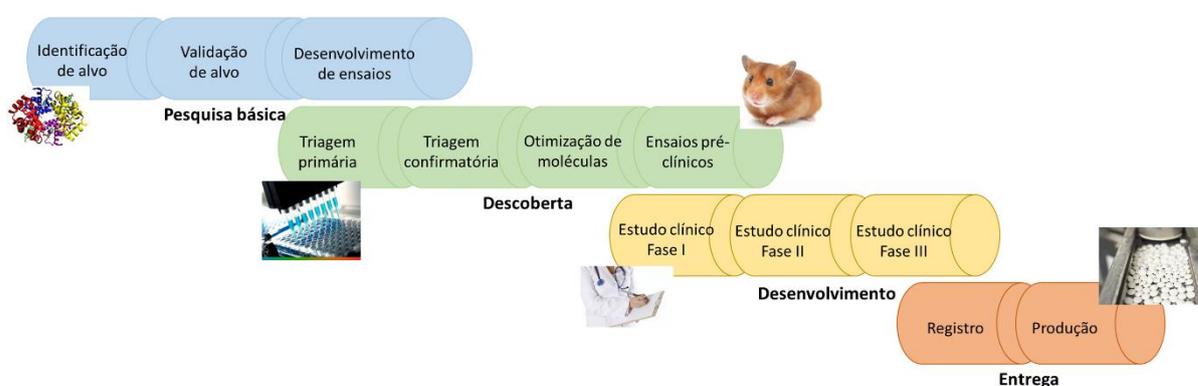


Figura 3. Esquema do desenvolvimento de fármacos para leishmanioses. O processo geralmente inicia-se com ensaios onde os compostos são avaliados pela sua atividade contra um alvo específico (ensaios baseados em alvo), ou contra todo o parasita (ensaios de viabilidade celular). Nos casos de ensaios baseados em alvo, estudos biológicos e bioquímicos são realizados previamente para identificação e validação dos alvos moleculares. Os compostos ativos, denominados “*hits*”, são otimizados quimicamente, na tentativa de desenvolver moléculas mais eficazes e menos tóxicas. Compostos otimizados ou objetos de otimização (“*leads*”) geralmente requerem estudos mais detalhados que visam o aumento da eficácia e a melhoria das propriedades farmacocinéticas. No caso da maior parte das doenças infecciosas, incluindo leishmaniose, também é essencial, nesta etapa, a demonstração de atividade *in vivo* em modelos animais da doença; só assim, os “*leads*” que atenderem a diversos pré-requisitos como atividade otimizada (mais potente e, se possível, eficaz do que o “*hit*” inicial), perfil farmacocinético apropriado com o tratamento que se busca desenvolver, e eficácia *in vivo*, tornam-se candidatos a drogas e passam para as fases pré-clínica e clínica. Os compostos que forem aprovados nessas últimas etapas são então registrados e produzidos para comercialização.

A terapia combinada, por exemplo, já foi empregada no tratamento de doenças parasitárias, objetivando, principalmente, aumentar a eficácia terapêutica, diminuir o período de tratamento e custo e evitar possível toxicidade causada por altas concentrações dos compostos (Bhattarai *et al.*, 2007; Mpia & Pepin, 2002; Sundar *et al.*, 2011). Considerando as leishmanioses, estudos clínicos realizados em Bihar, Índia, demonstraram que combinações de anfotericina B com miltefosina ou paromomicina apresentaram taxas de cura similares a monoterapia padrão (anfotericina B lipossomal, durante 31 dias), apesar do curso de tratamento significativamente mais curto, de 7 a 10 dias (Sundar *et al.*, 2011). Além disso, acredita-se que essa abordagem pode prevenir ou adiar a emergência de resistência em parasitas, pelo fato de diferentes moléculas apresentarem distintos mecanismos de ação e diferentes alvos metabólicos (van Griensven *et al.*, 2010).

Outra abordagem que também representa valiosa contribuição nesse contexto é o reposicionamento de fármacos (Pinazo *et al.*, 2010; Sundar & Olliaro, 2007). Como é baseada no uso de medicamentos que estão no mercado ou em fase clínica para novas doenças ou indicações, esta alternativa acelera o processo de identificação de fármacos, levando a uma economia de tempo, custos e recursos humanos. Além disso, informações a respeito da segurança clínica, farmacodinâmica, farmacodinâmica e potenciais alvos geralmente já estão disponíveis na literatura. No tratamento de leishmanioses, de fato, tem-se diversos exemplos de fármacos reposicionados, como a anfotericina B, primeiramente utilizada como antifúngico, a miltefosina, descoberta para tratamento de câncer de mama, e a paromomicina (revisado por Andrews *et al.*, 2014). Mais recentemente, outras moléculas reposicionadas estão sendo testadas em modelos *in vitro* e *in vivo*, objetivando a identificação de novos candidatos a fármacos. Nesse contexto, estão: o tamoxifeno (Eissa, Amer & El Sawy, 2011; Miguel, Yokoyama-Yasunaka & Uliana, 2008) e inibidores de quinases, como sunitinib, sorafenib e lapatinib (Durieu *et al.*, 2016; Sanderson, Yardley & Croft, 2014), utilizados em terapias antitumorais, e os nitroimidazóis, que são usados como antibacterianos e antiparasitários (S. Wyllie *et al.*, 2012).

Quanto às abordagens a longo prazo, também conhecida como *de novo drug discovery*, destaca-se as triagens de bibliotecas sintéticas e naturais compostas de centenas a milhares de moléculas. Na triagem de alta performance, também chamada de triagem de alta escala (HTS, do inglês “*high throughput screening*”), uma extensa biblioteca de moléculas é testada contra o parasita como um todo (ensaios de viabilidade sem alvo pré-definido) ou contra estruturas específicas desse parasita isoladas (baseado em um alvo) (Pink *et al.*, 2005; Siqueira-Neto *et al.*, 2010; Frearson *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2013;). O objetivo é identificar e selecionar

compostos com efeito biológico contra o parasita em questão. Como permite a triagem em paralelo de centenas a milhares de compostos, em um período relativamente curto de tempo, a tecnologia de HTS permite otimizar o processo de desenvolvimento de drogas (revisado por Zang *et al.*, 2012).

Tanto o HTS baseado em alvos quanto a triagem fenotípica, também denominada triagem de alto conteúdo (do inglês “*high content screening*” ou HCS), vem sendo reportado como uma tecnologia altamente eficiente na identificação de compostos com atividades antiparasitária, incluindo contra o parasita de *Leishmania* (Annang *et al.*, 2015; Khare *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2015). Siqueira-Neto e colegas testaram aproximadamente 26.500 compostos contra promastigotas de *Leishmania* e encontraram cerca de 120 candidatos ativos contra *L. major* e *L. donovani*, os quais apresentaram atividade antiparasitária satisfatória e não foram tóxicos para células humanas nas condições testadas. Desta forma, o HTS pode representar uma alternativa para o desenvolvimento de candidatos a drogas mais eficazes, seguras e de baixo custo para tratamento das leishmanioses (Siqueira-Neto *et al.*, 2010). Claramente, o processo de desenvolvimento de um novo fármaco possui grande complexidade e custo, envolvendo áreas multidisciplinares e profissionais com diferentes expertises. Nesse contexto, tem-se que as fases iniciais de busca e estudo de alvos, desenvolvimento e otimização de ensaios, bem como algumas triagens são feitos pela academia, enquanto que as etapas mais avançadas do processo são realizadas pela indústria farmacêutica. Portanto, é de extrema necessidade que se tenha uma rede integrada dessas partes para a existência de um processo eficiente de desenvolvimento de fármacos (revisado por Hughes *et al.*, 2011)

Embora o desenvolvimento de fármacos para leishmanioses tenha passado por um avanço considerável nos anos recentes, ainda sim o ciclo de inovação é um processo desafiador que possui diversos gargalos. Primeiramente, o sistema de descobrimento e desenvolvimento de fármacos demanda alto investimento e, porque as doenças negligenciadas não representam um mercado rentável, a indústria farmacêutica tem demonstrado pouco interesse nesse campo (Pedrique *et al.*, 2013; Trouiller *et al.*, 2002). Estudos publicados na *Lancet Global Health* reportaram que, de 2000 a 2011, dos 850 novos produtos terapêuticos licenciados, apenas 4% foram exclusivamente direcionados para as doenças negligenciadas, incluindo 25 novas indicações/formulações, 8 vacinas e outros produtos biológicos. Considerando as leishmanioses, apenas duas alternativas foram aprovadas durante o período do estudo, miltefosina e paromomicina, as quais são novas indicações para drogas já existentes; no entanto, nenhum produto novo foi de fato desenvolvido. Além disso, quando observamos o número de testes clínicos registrados nos bancos de dados da OMS e do NIH, temos que o contexto não

tende a mudar: das 148.445 terapias em fase de desenvolvimento, apenas 1% é dedicado a doenças negligenciadas (Pedrique *et al.*, 2013). Apesar disso, segundo a OMS, é estimado que as doenças negligenciadas ainda atingem mais de um bilhão de pessoas, distribuídas em 149 diferentes países.

Ainda nesse contexto, a maioria das pesquisas de prospecção de candidatos para doenças negligenciadas é realizada na academia e/ou em pequenos institutos de pesquisa, sendo um processo fragmentado e não-interligado. Como resultado, poucos compostos são de fato levados para as fases mais avançadas do processo de desenvolvimento de fármacos. Além disso, existe a falta de um banco de dados central para concentrar resultados positivos e negativos de grupos de pesquisa. Isso acarreta, por exemplo, no teste redundante de bibliotecas de composto no mesmo modelo, resultando em perda de recurso financeiro e tempo (Goupil & McKerrow, 2014; Pécoul *et al.*, 2004).

Recentemente, esses gargalos tem sido superados devido aos avanços alcançados pelas iniciativas entre instituições públicas e privadas (do inglês, *public-private – partnership (PPP) initiatives*), as quais conectam o conhecimento dos centros acadêmicos e a expertise das indústrias em uma eficiente rede de operação. Nesse contexto, a academia é responsável por atividades tais como desenvolvimento de novos ensaios *in vitro* e *in vivo*, a identificação e validação de alvos e o desenvolvimento/aperfeiçoamento de ferramentas para triagens; enquanto que a indústria fornece principalmente as bibliotecas químicas e naturais, a infraestrutura, o *know-how* técnico e o suporte financeiro. Exemplos disso são as propostas implementadas por iniciativas como DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*), NIH (*National Institutes of Health*) e *Wellcome Trust* (Chatelain & Ioset, 2011; Gustavsen & Hanson, 2009).

1.6. Modelos de *Leishmania* para desenvolvimento de fármacos

1.6.1. O que nós temos de ensaios disponíveis hoje?

Em relação às etapas iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos para leishmanioses, os ensaios *in vitro* para identificação de candidatos ativos necessitam ser, além de biologicamente relevantes, fáceis de manipulação, robustos, reprodutíveis e facilmente analisados e quantificados. Avanços significativos foram alcançados nesse campo e, atualmente, diversos ensaios *in vitro* para avaliação de potenciais candidatos estão disponíveis, incluindo testes focados em: (i) formas axênicas do parasita, considerando promastigotas

(Vacchina & Morales, 2014) e amastigotas (Nühs *et al.*, 2015); (ii) ensaios de amastigotas intracelulares baseados em fluorescência ou colorimetria, como parasitas geneticamente modificados, expressando genes repórteres GFP (do inglês *green fluorescent protein*) (Chan *et al.*, 2003; Bolhassani *et al.*, 2011) e luciferase (Ashutosh *et al.*, 2005), e (iii) ensaios de amastigotas intracelulares baseados em imagem (De Muylder *et al.*, 2011; Siqueira-Neto *et al.*, 2012; Aulner *et al.*, 2013; De Rycker *et al.*, 2013). As características dos principais ensaios estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Ensaios *in vitro* disponíveis para desenvolvimento de fármacos contra parasitas de *Leishmania*.

Ensaios	Vantagens	Desvantagens	Referência
Promastigotas	<ul style="list-style-type: none"> - Menor complexidade - Fácil adaptação para automação - Menor custo 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor relevância biológica - Perda de compostos específicos para amastigotas - Perda de compostos que atuam na célula hospedeira - Alto número de falsos positivos 	<ul style="list-style-type: none"> De Muylder <i>et al.</i>, 2011 Siqueira – Neto <i>et al.</i>, 2012
Amastigotas axênicos	<ul style="list-style-type: none"> - Menor complexidade - Fácil adaptação para automação - Maior semelhança com amastigotas intracelulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Perda de compostos que atuam na célula hospedeira - Carência de informações de citotoxicidade - Correspondência limitada com modelo intracelular 	<ul style="list-style-type: none"> De Rycker <i>et al.</i>, 2013 Nühs, <i>et al.</i>, 2015 Peña, <i>et al.</i>, 2015
Amastigotas intracelulares – metodologias clássicas	<ul style="list-style-type: none"> - Custo relativamente baixo - Fase clinicamente relevante - Informações a respeito da citotoxicidade do composto 	<ul style="list-style-type: none"> - Estabelecimento de cepas modificadas - Laborioso 	<ul style="list-style-type: none"> Bolhassani <i>et al.</i>, 2011 Ashutosh <i>et al.</i>, 2005
Amastigotas intracelulares - Ensaios fenotípicos (HCS)	<ul style="list-style-type: none"> - Resultado multiparamétrico - Biologicamente relevante - Imagem do modelo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Armazenamento de dados - Equipamentos necessários - Complexidade do sistema - Alto custo 	<ul style="list-style-type: none"> Siqueira-Neto <i>et al.</i>, 2012 Aulner <i>et al.</i>, 2013

1.6.1.1. Promastigotas e amastigotas axênicos

Triagens com as formas axênicas de promastigotas e amastigotas tem sido reportadas como uma abordagem rotineira para identificação de candidatos com atividade leishmanicida (De Rycker *et al.*, 2013). Pela sua relativa simplicidade e fácil automação, em comparação com os ensaios intracelulares, essa abordagem permite um alto *throughput* e reprodutibilidade. Além disso, considerando coleções de bibliotecas constituídas de milhares de amostras, a estratégia pode representar o primeiro passo de seleção, com o objetivo de limitar o número de candidatos para serem testados em ensaios mais refinados (Vacchina & Morales, 2014; Nühs, 2015). Nesses casos, a atividade dos compostos testados é determinada em função da inibição de crescimento dos parasitas, que é avaliada diretamente por contagem da cultura ou, indiretamente por ensaios metabólicos, utilizando colorimetria ou fluorescência. Os protocolos mais comumente empregados são: teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), teste de Alamar blue (ou resazurina) e testes baseados na atividade da enzima fosfatase ácida (revisado por Zulfiqar, Shelper & Avery, 2017).

No entanto, protocolos baseados em parasitas axênicos podem apresentar limitações substanciais. Considerando os ensaios com promastigotas, uma vez que existem consideráveis diferenças entre as formas presentes no inseto e no hospedeiro vertebrado, esses testes podem levar a uma seleção de candidatos, os quais não tem relevância para o estágio do ciclo celular causador da doença, ou a uma perda de moléculas com atividade específica para as formas amastigotas (revisado por Gupta & Nishi, 2011). O trabalho publicado por De Muylder *et al.*, 2011, evidencia altos índices de falsos positivos, sendo que, de 59 *hits* selecionados nos modelos de promastigotas, apenas 26 foram detectados pelos modelos de amastigotas intracelulares. Além disso, foi identificado um composto que apresentou atividade especificamente para o estágio de amastigotas do parasita (De Muylder *et al.*, 2011). Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Siqueira- Neto *et al.* 2012, os quais mostram que do set compostos selecionados no *screening* primário contra promastigotas de *Leishmania*, apenas cerca de 4% foram confirmados no modelo de amastigotas intracelulares (Siqueira – Neto *et al.*, 2012).

Comparado aos modelos de promastigotas, o uso de amastigotas axênicos pode representar uma alternativa mais interessante, uma vez que se trata de um sistema mais biologicamente relevante (uso da forma do ciclo de vida do parasita associado à doença). Além disso, comparando-se as atividades de compostos obtidas nos ensaios de promastigotas, amastigotas axênicos e amastigotas intracelulares, uma maior similaridade foi observada entre

os dois últimos modelos (Callahan *et al.*, 1997). No entanto, diversos estudos mostram que as formas axênicas ainda sim se diferenciam dos parasitas intracelulares, em termos de expressão de proteínas e suscetibilidade a drogas (Holzer, McMaster, & Forney, 2006; Pescher, Blisnick, Bastin, & Späth, 2011).

Considerando as grandes triagens, ambos os modelos axênicos não geram informações a respeito da citotoxicidade e seletividade do composto em questão. Além disso, nesses casos, não é possível avaliar se os compostos podem acessar os parasitas intracelulares (isso é, atravessar as membranas da célula hospedeira e possuir estabilidade química no pH ácido dos vacúolos parasitóforos), e, por isso, uma etapa posterior de avaliação no modelo parasita e célula hospedeira é necessário (Durieu *et al.*, 2016). Por fim, essa abordagem pode não revelar compostos que requerem ativação intracelular, como pró-drogas, ou compostos que interferem na interação parasito – hospedeiro (revisado por Gupta & Nishi, 2011).

Como alternativa, Nühs e colegas sugerem uma abordagem baseada em cascata, onde compostos são testados, primeiramente, no modelo de amastigota axênico, seguido de confirmação no modelo de amastigota intracelular. Diferente de outros ensaios previamente publicados, nesse caso, os pesquisadores selecionaram, a partir do modelo axênico, candidatos com atividade citocida, excluindo moléculas com atividade citostática. Com essa nova abordagem, uma maior taxa de tradução para os modelos intracelulares foi obtida: quando a seleção de *hits* foi baseada em compostos com os dois perfis de atividade (citocida e citostática), apenas 22% dos candidatos foram confirmados em ensaios intracelulares; no entanto, através da seleção de moléculas exclusivamente com ação citocida, obteve-se uma taxa de confirmação de 49% (Nühs, *et al.*, 2015).

1.6.1.2. Ensaios com amastigotas intracelulares – metodologias frequentemente utilizadas

Diversas estratégias vem sendo empregadas na tentativa de desenvolver ensaios mais biologicamente relevantes, visando os modelos de amastigotas intracelulares. Nesses casos, a avaliação da atividade de moléculas é feita por contagem manual (porcentagem de infecção ou razão de amastigotas/número de células) (Miguel *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009), ou por métodos de colorimetria e fluorescência (Ashutosh *et al.*, 2005; Bolhassani *et al.*, 2011; Buckner & Wilson, 2005).

A abordagem clássica de contagem com lâminas, contendo células infectadas com parasitas de *Leishmania*, coradas com giemsa é utilizada amplamente em laboratórios, uma vez

que possui baixo custo, fácil manipulação e não necessita de estruturas ou equipamentos sofisticados, quando comparada com outras estratégias (Miguel *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009). No entanto, a mesma representa uma técnica laboriosa intensiva, subjetiva e incompatível com *throughput* maiores que alguns poucos compostos (<10) por semana, o que, conseqüentemente, limita a triagem de grandes bibliotecas de compostos (Miguel *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009; revisado por Dube, Gupta & Singh, 2009).

Outra abordagem é o uso de métodos baseados no reagente fluorescente Alamar blue, no qual a sobrevivência de parasita após determinado tratamento é medida indiretamente: macrófagos infectados são lisados e os amastigotas extracelulares recuperados são transformados para promastigotas extracelulares replicativos, os quais são quantificados por fluorescência (Jain *et al.*, 2012; Paape *et al.*, 2014). Apesar da estratégia apresentar vantagens como robustez, simplicidade, baixo custo e relativa facilidade de execução, ainda apresenta (i) vários protocolos de lavagem e lise celular, o que pode acarretar o acúmulo de erros no resultado final, (ii) não diferencia situação de grande infecção e baixo número de amastigotas intracelulares *versus* baixa infecção e grande número de amastigotas intracelulares, (iii) não fornece informações a respeito da seletividade do composto.

O termo gene repórter é usado para definir um gene que possui fenótipo facilmente detectado e mensurado e, por isso, pode ter grande aplicação em ensaios *in vitro* e *in vivo* de descoberta de fármacos contra *Leishmania*. As abordagens baseadas em genes repórteres permitem a rápida quantificação de crescimento de amastigotas intracelulares de *Leishmania* e a avaliação de agentes com atividade leishmanicida (revisado por Monte-Alegre, Ouaiissi, & Sereno, 2006). Esses métodos ainda produzem dados quantitativos de forma objetiva, aumentam a eficiência do processo e diminuem a necessidade de trabalho manual. Atualmente, diferentes genes repórteres estão disponíveis, incluindo métodos baseados em fluorescência, como GFP (*green fluorescent protein*) (Bolhassani *et al.*, 2011), e métodos catalíticos colorimétricos, como luciferase (Ashutosh *et al.*, 2005) e β -galactosidase (Okuno, Goto, Matsumoto, Otsuka, & Matsumoto, 2003). Bolhassani e colegas, por exemplo, construíram parasitas de *Leishmania* expressando o gene da proteína GFP de forma estável e abundante, em ambos os estágios de promastigota e amastigota, os quais foram utilizados para monitorar a infecção em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os parasitas modificados mantiveram as mesmas características da cepa selvagem, em relação à infectividade, e se apresentaram apropriadas para ensaios de triagens de compostos, bem como para estudos de interações parasito-hospedeiro em nível celular (Bolhassani *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram alcançados com a utilização de isolados de campo de *L. donovani* expressando o gene repórter da luciferase. Nesse

trabalho, uma excelente correlação foi obtida entre número de parasitas e atividade da luciferase, mostrando a alta sensibilidade do protocolo. O sistema estabelecido foi otimizado para ensaios de grande escala e, hoje, é rotineiramente aplicado em triagens de *high-throughput*, no Instituto Central de Pesquisa em Drogas, na Índia (Ashutosh *et al.*, 2005).

Apesar do grande avanço alcançado a partir da utilização das técnicas com genes repórteres, ainda sim, essa estratégia carrega algumas limitações: (i) necessidade de constante seleção de drogas para manter os níveis de expressão do gene, o que pode ser problemática, uma vez que as drogas de seleção podem interagir com os compostos testados, (ii) modificações no metabolismo geral das cepas modificadas, resultando em, por exemplo, menor taxa de crescimento e multiplicação celular, entre outros e (iii) necessidade de construção de cepas modificadas para cada novo isolado que se queira estabelecer no laboratório (revisado por Gupta & Nishi, 2011).

1.6.1.3. Ensaios com amastigotas intracelulares - o ensaio fenotípico baseado em imagem – *high content screening*

O *screening* fenotípico, também chamado de *high content screening (HCS)* é baseado em uma plataforma composta de vários componentes, os quais atuam de forma integrada para geração de resultados multiparamétricos, os quais serão utilizados para investigação de processos celulares e suas alterações por diversos agentes, químicos ou genéticos (Buchser *et al.*, 2004; Korn & Krausz, 2007). Baseando-se em nossa plataforma (**figura 4**), os componentes são: (i) ensaio biologicamente relevante, o qual é capaz de representar adequadamente, o sistema celular e a doença estudada; (ii) reagentes e corantes que permitem monitorar, detectar e estudar fenômenos celulares; (iii) microscópio automatizado, que será responsável pela aquisição de imagens. O equipamento deve apresentar robustez, sensibilidade, flexibilidade e velocidade; (iv) software de análise, que processará as imagens adquiridas, para obtenção de resultados quantitativos; (v) software de análise de dados, para organização, processamento e estudo dos resultados obtidos e (vi) plataforma de gerenciamento de dados, de extrema necessidade, uma vez que a metodologia gera uma grande quantidade de informações relacionadas a um determinado ensaio.

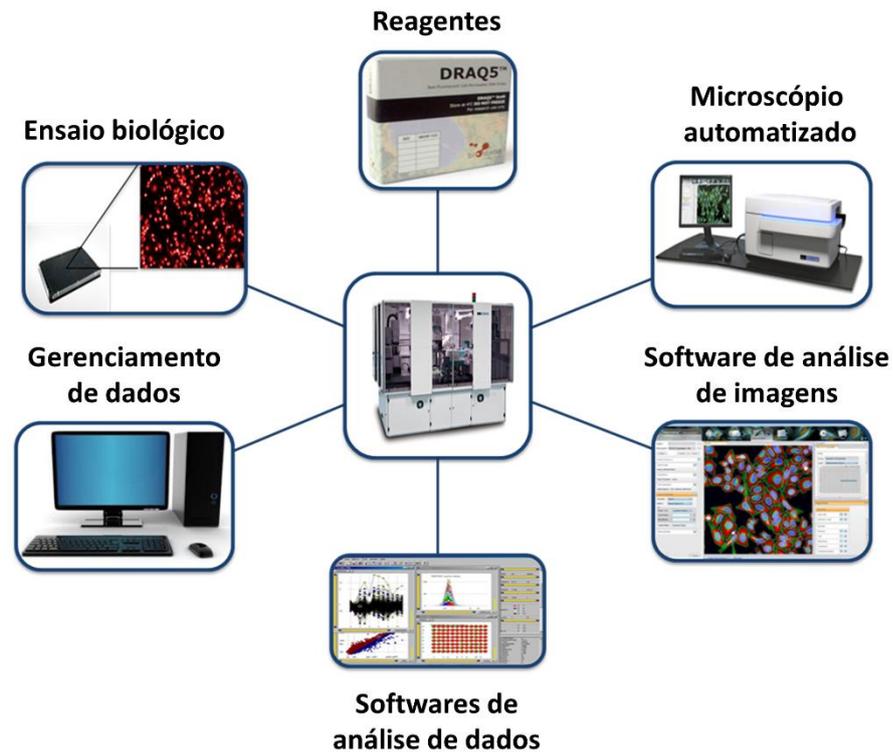


Figura 4. Plataforma de triagem de compostos de alta performance. Componentes necessários para a abordagem de HCS: ensaio biológico, o qual deve apresentar robustez, sensibilidade e reprodutibilidade; corantes/reagentes que permitam monitorar o ensaio biológico, fornecendo os resultados necessários; microscópio automatizado, para adquirir imagens dos poços das placas de maneira rápida e eficaz; software de análise de imagens, para processamento das imagens e aquisição de dados quantitativos; software de análise de dados, para organização do grande volume de dados obtidos, e uma plataforma de gerenciamento de dados, para armazenamento dos resultados.

Especificamente para estudos envolvendo *Leishmania*, desde o trabalho de Siqueira-Neto *et al.*, 2012, no qual é descrito o primeiro ensaio baseado em imagem contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*, variações do modelo vem sendo empregadas e, atualmente, diversos protocolos estão disponíveis, mostrando-se eficazes na identificação de agentes com atividade antiparasitária (Siqueira-Neto *et al.*, 2012, Annang *et al.*, 2015; Dagley, Saunders, Simpson, & McConville, 2015; Khare *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2015). Dentre eles, destaca-se o estudo feito por Khare *et al.*, 2016, que, utilizando-se de ensaios baseados em fluorescência e em imagens, foi capaz de não só identificar moléculas ativas *in vitro* e *in vivo*

contra *L. donovani*, mas também demonstrar a estrutura do proteosoma como um potencial alvo terapêutico (Khare *et al.*, 2016).

Leishmania spp. exibe uma biologia de grande complexidade sendo que sua interação com o hospedeiro, bem como as estruturas essenciais para sua sobrevivência no interior das células fagocíticas, não foram claramente elucidadas (Forestier, Machu, Loussert, Pescher, & Späth, 2011; Kaye & Scott, 2011; Naderer & McConville, 2007, 2011). Isso, em parte, faz com que a identificação e validação de um alvo específico seja um processo mais dificultoso. Tendo isso em vista, a escolha pelo HCS se torna mais adequada para o desenvolvimento de drogas contra esse parasita. Nesse caso, todos os alvos potenciais são expostos aos compostos testados, levando ao aumento da probabilidade de se encontrar moléculas ativas e com diferentes mecanismos de ação (Gilbert, 2013).

Outros aspectos favoráveis do HCS são: a estratégia não depende de validação prévia dos alvos, o que agiliza o processo de forma considerável; os compostos podem agir em vias que ainda não foram descritas na literatura ou que ainda não foram reconhecidas como alvo potencial; os compostos podem agir em mais de uma via simultaneamente (Haney *et al.*, 2006; Korn & Krausz, 2007). Além disso, o trabalho de Swinney & Anthony, 2011, mostra que além do sucesso das abordagens fenotípicas ser superior aos observados nos ensaios baseados em alvos, em termo de descoberta de novas moléculas, a estratégia focada em proteínas pode contribuir para as altas taxas de “*attrition*” no processo de identificação de compostos (Swinney & Anthony, 2011). No segmento da microbiologia, essa estratégia vem apresentando sucesso superior à estratégia baseada em alvos, pois o objetivo nesses casos é extinguir ou impedir o crescimento do microorganismo – o que geralmente ocorre via diferentes alvos. Assim sendo, as chances de sucesso podem aumentar consideravelmente quando todos os alvos potenciais são testados simultaneamente (Ang & Pethe, 2016; Bickle, 2010; Brodin & Christophe, 2011).

Apesar dos avanços alcançados pelo estabelecimento das estratégias baseadas em imagem, as plataformas de triagem apresentam algumas limitações, tais como: necessidade de grande infraestrutura, incluindo microscópios automatizados e sistema de armazenamento de dados, necessidade de pessoas treinadas, custo operacional maior quando comparado a outras técnicas, entre outras. Além disso, essa abordagem ainda necessita ser otimizada, gerando metodologias, principalmente, mais robustas e reprodutíveis.

1.7. Outras questões envolvendo os modelos *in vitro* para *Leishmania*

Uma questão abordada nos ensaios *in vitro* em grande escala para *Leishmania* spp. é a célula hospedeira utilizada. Macrófagos primários são raramente utilizadas nos processos iniciais de triagem, visto que se tratam de uma população heterogênea de células as quais não sofrem divisão celular, o que poderia impactar a reprodutibilidade e *throughput* dos ensaios. Nesse caso, como alternativa, as linhagens celulares, como THP-1, RAW 264.7, U937 e J774A.1 são frequentemente utilizadas. A cultura celular de THP-1, linhagem monocítica de leucemia humana, representa uma opção atrativa ao isolamento de macrófagos. Uma vez diferenciados, os macrófagos THP-1 formam uma monocamada homogênea de células que não se dividem *in vitro* (Tsuchiya et al., 1980). Como apresentam grande similaridade com macrófagos primários e possuem rendimento satisfatório (Daigneault et al., 2010; Park et al., 2007), essas células são o padrão ouro, considerando as triagens em alta escala. (Siqueira-Neto et al., 2012; Dagley et al., 2015; Khare et al., 2016; Peña et al., 2015). No entanto, ensaios sugerem que o perfil de infecção bem como a atividade leishmanicida de compostos pode ser dependente da célula hospedeira, o que poderia gerar implicações do processo de seleção de moléculas (Seifert, Escobar, & Croft, 2010).

Outro fator que poderia ter papel importante na descoberta de fármacos é a espécie e a cepa utilizada na padronização e performance dos ensaios de triagem. Trabalhos prévios tem evidenciado que a atividade de determinado fármaco ou candidato pode ser variável, visto as diferenças na sensibilidade intrínseca à droga por espécies/cepas. Essa variação foi notada mesmo para compostos referência, como demonstrado por Escobar et al., 2002, onde os valores de EC₅₀ obtidos para a miltefosina variaram entre 2,6 a 37,1 µM, considerando diferentes espécies de *Leishmania* (Escobar et al., 2002). O mesmo perfil foi observado para um painel de cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, quando tratadas com anfotericina B (Miguel et al., 2011). Um melhor entendimento da variação na suscetibilidade/tolerância a drogas, considerando diferentes cepas e espécies, pode ter importantes implicações clínicas, como demonstrado por Faraut – Gambarelli e colaboradores. Nesse trabalho, parasitas extraídos de pacientes infectados e tratados com miltefosina foram cultivados *in vitro* e valores de EC₅₀ para o medicamento foram determinados. Houve uma correlação significativa entre os resultados *in vitro* e o sucesso ou falha clínica do tratamento: todas cepas relacionadas às falhas terapêuticas requereram maior concentração de miltefosina para eliminar da infecção nos ensaios (Faraut-Gambarelli et al., 1997). Em outro estudo mais recente, feito em regiões endêmicas da Colômbia, foi mostrado que a suscetibilidade aos compostos antimoniais e à miltefosina diferiram-se entre cepas de uma mesma espécie e entre espécies, isoladas de diferentes regiões geográficas ou períodos de tempo (Fernandez et al., 2014). Além disso, essa variação de

atividade foi observada em outros tripanossomatídeos. Moraes *et al.*, 2014, alertou para a grande diferença de atividade de determinados compostos para um painel de cepas de *Trypanosoma cruzi* (Moraes et al., 2014).

No entanto, embora espécies/cepas possam apresentar diferentes comportamentos de infecção e de resposta a drogas, considerando as etapas iniciais do desenvolvimento de fármacos, existe um número limitado de ensaios disponíveis (geralmente baseados no modelo de *L. donovani*) e testes considerando diferentes cepas/espécies são, frequentemente, ignorados. Portanto, existe a necessidade de expandir o portfólio de ensaios *in vitro*, estabelecendo outras cepas/espécies do parasita, para melhor entendimento da atividade de moléculas candidatas e realizar uma melhor priorização de compostos.

Por fim, outras questões envolvendo os ensaios de HCS para *Leishmania* são também discutidas: (i) a baixa taxa de translação entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, (ii) a falta de consenso por parte da comunidade científica quanto aos modelos de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica e (iii) falta de padronização técnica e metodológica, o que dificulta a comparação de resultados obtidos em diferentes grupos de pesquisa (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

Diversas iniciativas tem propiciado o avanço dos ensaios *in vitro* e *in vivo* para estudo das leishmanioses aplicados a descoberta de novos fármacos nos anos recentes, sobretudo na última década. Contudo, ainda é imprescindível a otimização desses ensaios e sua aplicação de maneira integrada e estruturada no processo de identificação de moléculas com atividade anti-*Leishmania*.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um ensaio otimizado baseado em imagem para o modelo de infecção da *Leishmania*, bem como realizar a prospecção *in vitro* de potentes candidatos a drogas para leishmaniose visceral, que sejam eficazes, não tóxicos e com certo grau de seletividade.

2.2. Objetivos específicos

1. Desenvolvimento, otimização e validação de um ensaio de HCS para triagem de compostos contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*;
2. Realização do HCS: triagem de amostras naturais e sintéticas de diferentes fontes, em “screening” primário, seguido por seleção dos “hits” e confirmação de atividade (determinação de EC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade);
3. Construção de um painel de cepas viscerais de *L. infantum* e *L. donovani*;
4. Avaliação da atividade de compostos selecionados contra um painel de cepas do complexo *L. donovani*;
5. Determinação da atividade de compostos selecionados contra diferentes formas do ciclo de vida;
6. Estudo da atividade anti-*Leishmania* da combinação de hits selecionados com fármacos referência;
7. Determinação da atividade antiparasitária dos compostos selecionados contra outras espécies de tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

3. Metodologia

3.1. Culturas de células e parasitas

- **Linhagem celular THP-1:** a linhagem celular, derivada do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda, (adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Xerém - RJ, Brasil) foi cultivada em frascos T175 (20 mL) a 37°C e 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Hyclone) suplementado com 20% de soro fetal bovino – FBS (Gibco), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em densidade entre 2x10⁵/mL a 8x10⁵/mL, sendo o repique feito de 2 – 3 vezes por semana. As culturas foram mantidas por cerca de dez passagens (entende-se por passagem o número de repiques feitos na cultura).

- **Linhagem celular U-2 OS:** a linhagem celular, derivada de tecido ósseo de uma adolescente de 15 anos com osteosarcoma (adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Xerém-RJ, Brasil) foi cultivada em frascos T175 (20 mL) a 37°C e 5% de CO₂, em meio DMEM alta glicose (Hyclone) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco). As culturas foram mantidas em densidade de 2x10⁵/mL

até a completa confluência, sendo o repique foi feito 2 vezes por semana. Para o repique, células foram lavadas com PBS e tratadas com 5 mL de Tripsina-EDTA (Gibco) 0,05% e incubadas a 37°C por 3 – 5 minutos. Células foram recuperadas após a adição de 10 mL de meio DMEM completo e ressuspensas para a densidade correta. As culturas foram mantidas por cerca de vinte passagens.

- **Culturas de parasita do gênero *Leishmania***: na rotina de triagens, promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 (gentilmente cedidos por Prof. Ricardo Fujiwara, UFMG, Belo Horizonte – MG, Brasil), *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8 (gentilmente cedidos por Profa. Silvia Uliana, USP, São Paulo -SP, Brasil), *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75, *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV (obtidos da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, CLIOC, Rio de Janeiro – RJ, Brasil), *L. donovani* MHOM/IN/95/9515 e *L. donovani* MHOM/SD/62/1S (obtidos do Bei Resources, University Boulevard, Manassas – VA, Estados Unidos) foram cultivados em frascos T175 (25 mL) a 26°C, sob rotação de 30 rpm e protegidos da luz; em meio 199 (Sigma-Aldrich) enriquecido com 40 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 4,62 mM de bicarbonato de sódio (Sigma- Aldrich), 0,1 mM de adenina (Sigma-Aldrich) e 0,0001% de biotina (Sigma-Aldrich); suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Culturas foram mantidas em fase logarítmica (entre $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ / mL), sendo que os repiques foram feitos a cada três dias. As culturas foram mantidas por, no máximo, seis passagens.

Em ensaios de padronização e otimização, promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 foram cultivados em diferentes condições, onde foram variados os meios de cultura e a concentração de bicarbonato no meio de cultura. Quanto aos ensaios com meios de cultura distintos, foram testados os seguintes meios: (i) RPMI 1640, contendo 25 mM de HEPES e L-glutamina (Hyclone); (ii) Scheneider (Sigma-Aldrich), (iii) Grace's (Vitrocell) e (iv) LIT (do inglês, *liver infusion tryptose*), todos suplementados com 10% de FBS e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os parasitas foram cultivados em frascos T75 (10 mL) a 26°C, sob rotação de 30 rpm e ausência de luz. Os repiques foram feitos a cada três dias de cultura, como mencionado anteriormente.

Para ensaios do efeito do bicarbonato no meio de cultura, promastigotas de *Leishmania infantum* MHOM/BR/1972/BH046 foram descongelados cultivados em meio 199 preparado como descrito acima, no entanto, com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio: 0,3; 1,0 e 3,0 g/L de meio 199 preparado ou na ausência de bicarbonato de sódio. Os

parasitas foram cultivados em frascos T75 (10 mL) a 26°C, sob rotação de 30 rpm e ausência de luz. Os repiques foram feitos a cada três dias de cultura, como mencionado anteriormente.

- **Culturas de *Trypanosoma cruzi*:** a cepa Y (DTU TcII) de *T. cruzi* foi gentilmente cedida pelo Prof. Sérgio Schenkman, UNIFESP, São Paulo – SP, Brasil. As formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK2, previamente infectadas com *Trypanosoma cruzi* (10 parasitas/célula). Culturas infectadas foram mantidas em meio DMEM baixa glicose (Vitrocell) suplementado com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, and 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C e 5% CO₂, por 6 a 7 dias, quando parasitas foram recuperados e usados para infectar novas células. As culturas foram mantidas por cerca de 10 ciclos de infecção.

- **Culturas de *Trypanosoma brucei*:** a cepa referência de *Trypanosoma brucei brucei* Lister 427 (gentilmente cedidas por Prof. Sérgio Schenkman, UNIFESP, São Paulo – SP, Brasil) foi cultivada em meio HMI-9, composto por: 2x IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's media) (Sigma – Aldrich), 1 mM de hipoxantina (Sigma – Aldrich), 0.16 mM de timidina (Sigma – Aldrich), 50 µM de ácido dissulfônico batocuproína (Sigma – Aldrich), 1.5 mM de L-cisteína (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma – Aldrich) e 0.0014% de β-mercaptoetanol (v/v) (Sigma – Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, and 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C e 5%CO₂. Culturas foram mantidas em fase logarítmica (5x10⁴ a 1x10⁶/mL), sendo os repiques feitos a cada dois dias. Culturas foram mantidas por cerca de 20 passagens.

3.2. Compostos referência, bibliotecas químicas e preparação de amostras

- **Compostos referência:** soluções estoques dos compostos referência anfotericina B, Miltefosina e Pentamidina (Sigma-Aldrich), bem como o composto experimental VL-2098 (gentilmente cedido pela instituição Drugs for Neglected diseases *initiative* - DNDi), foram preparadas à concentração de 10 mM, diluindo-se o pó em DMSO 100% (Sigma-Aldrich). Alíquotas únicas (aproximadamente 20 µL) foram preparadas e mantidas a -20°C pelo período de, no máximo, três meses, quando novas amostras foram preparadas. Alíquotas foram usadas uma única vez, evitando possíveis efeitos de degradação por processos de congelamento e descongelamento contínuos.

- **Biblioteca comercial LOPAC®1280:** adquirida da empresa Sigma- Aldrich, a biblioteca é composta de 1.280 compostos, do tipo *small molecules*, biologicamente ativos. A biblioteca (concentração de 10 mM em DMSO 100%) composta por 16 placas de 96 poços foi reformatada manualmente para 4 placas de poliestireno para armazenamento de compostos de 384 poços (Greiner), sendo que as amostras foram rearranjadas das colunas 3 a 20 das novas placas. Placas foram mantidas devidamente seladas a -20°C.

- **Hypha MycoDiverse™:** cedida pela empresa Hypha Discovery, Reino Unido, através do projeto “*NMTryp, new medicines for trypanomatic infections*”, da comissão europeia, a biblioteca é composta aproximadamente por 11.000 extratos derivados de fungos. As amostras, previamente preparadas e diluídas em DMSO 100%, foram reformatadas em placas de 384 poços. As placas foram mantidas devidamente seladas a -20°C.

- **Biblioteca de frações de HPLC de extratos naturais de plantas do Sudão:** cedidas pelo Instituto de Pesquisa de Plantas Aromáticas e Mediciniais, no Centro Nacional para Pesquisa, Sudão, através do projeto “*NMTryp, new medicines for trypanomatic infections*”, da comissão europeia, a biblioteca é composta por 3000 produtos naturais, resultantes do fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*, HPLC) de 137 extratos de plantas. As amostras, previamente preparadas e diluídas em DMSO 100%, foram reformatadas em placas de 384 poços. As placas foram mantidas devidamente seladas, a -20°C.

- **Biblioteca de amostras de colaboradores:** compostos sintéticos ou extratos naturais enviados por diferentes colaboradores foram preparados a partir do pó ou óleo, na concentração de 10 ou 20 mM (quando a massa molecular era conhecida) ou na concentração de 10 mg/mL, para amostras de massa molecular desconhecida), em DMSO 100%. Dependendo do volume de amostra preparada, alíquotas de 30 a 100 µL foram feitas e mantidas protegidas da luz, a -20°C. Alíquotas foram usadas, no máximo, duas vezes, evitando possíveis efeitos de degradação por processos de congelamento e descongelamento contínuos.

3.3. Estabelecimento do ensaio biológico

3.3.1. Preparação e diferenciação da linhagem celular THP-1

As células THP-1 foram cultivadas de maneira a alcançarem a densidade, volume e fase logarítmica do crescimento no dia de uso para ensaio (de 6 a 8×10^5 células/mL). As células foram contadas em câmaras de Neubauer em microscópio óptico e a densidade correta para ensaio foi estimada, dependendo do número de placas a serem preparadas. A cultura foi então centrifugada e ressuspensa em meio RPMI suplementado com 20% de FBS e 100 U/mL de penicilina, and 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, contendo 50ng/mL do éster de forbol PMA (do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma-Aldrich), em diferentes densidades celulares de THP-1: 1,6; 2,8 e $4,0 \times 10^5$ /mL. As células foram cultivadas manualmente em placas de poliestireno de 384 poços, próprias para ensaio celular (Greiner μClear), em um volume de 25 μL /poço. Assim, o número de células/poço foi 4.000, 7.000 e 10.000, respectivamente para cada densidade plaqueada. No total, 48 poços para cada densidade foram preparados em cada uma das duas placas de ensaio. Placas foram incubadas por 48 ou 72 horas, sendo então fixadas com paraformaldeído (PFA) (Sigma-Aldrich) 4%, por 20 minutos, seguido por coloração com Draq 5 5 μM (Biostatus), por 15 minutos.

Para determinação do efeito da remoção do reagente PMA do meio de cultura, células THP-1 foram contadas e ressuspensas em meio RPMI 1640, contendo 50 ng/mL de PMA, para plaqueamento em placas de 384 poços. No total, quatro placas foram preparadas, com 100 poços/placa. Após período de diferenciação de 48 horas, metade dos poços da placa foram lavados com PBS por três vezes e meio RPMI 1640 fresco sem suplementação de PMA foi adicionado. A partir desse momento, a cada 24 horas, placas foram fixadas com PFA 4% e encaminhadas para coloração com Draq5 5 μM ou para o ensaio de multiplicação celular (descrito abaixo).

3.3.2. Infecção com promastigotas axênicos de *Leishmania*

Para ensaios de estabelecimento do sistema biológico, *L.infantum* cepa MHOM/BR/1972/BH046 foi usada como padrão. No dia da infecção (48 horas após diferenciação das células THP-1), parasitas cultivados em diferentes meios (M199, RPMI 1640, Schneider, Grace's e LIT) por 6 dias foram usados para infectar macrófagos THP-1. Parasitas foram contados e ressuspensos em meio RPMI 1640, suplementado com 20% de FBS, em densidade de $1,4 \times 10^7$ /mL. As culturas preparadas foram então colocadas novamente a 26°C e rotação de 30 rpm durante o período de 45 minutos, anterior à infecção. Foram adicionados 25 μL de cultura em todos os poços, exceto para colunas que representavam o controle não-infectado, onde adicionou-se 25 μL de meio RPMI completo.

O mesmo protocolo de infecção foi utilizado para: (i) avaliação do melhor período de incubação das culturas de promastigotas antes da infecção, nos quais foram utilizados parasitas de 5, 6 e 7 dias de cultura em meio 199; (ii) avaliação da concentração de bicarbonato de sódio no meio de cultura de promastigotas; (iii) avaliação do efeito de passagens contínuas na cultura de promastigotas, onde usou-se parasitas de diferentes passagens: P3, P6, P9, P12, P15 e P18, cultivados em meio 199.

3.4. Ensaio de multiplicação celular com EdU

3.4.1. Multiplicação da célula hospedeira

Para avaliação do impacto da remoção do reagente PMA na taxa de multiplicação celular da THP-1, células foram diferenciadas e cultivadas em 4 placas de 384 poços e, após 48 horas de diferenciação, em metade dos poços preparados, o reagente PMA foi removido, por sucessivas lavagens e substituição por meio RPMI 1640 fresco (volume final = 25 μ L). A cada 12 horas anterior à fixação, 25 μ L de meio RPMI 1640 contendo o nucleotídeo análogo a timidina, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) (kit de ensaio Click- iT[®] - Thermo Fisher) a 100 μ M foram adicionados ao meio. A concentração final de EdU foi de 50 μ M. A cada 24 horas, após a lavagem e substituição do meio em alguns poços, uma placa foi fixada e tratada com o kit de reação, como descrito pelo fabricante. Brevemente, a cultura passou por processos de fixação com 4% de PFA e permeabilização com 0,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), seguido por incubação com o coquetel de reação (kit de ensaio Click- iT[®] - Thermo Fisher) contendo o corante Alexa 488, por 30 minutos, protegido da luz. Por fim, culturas foram tratadas com o corante Hoechst 5 μ g/mL (Thermo Fisher), para coloração dos núcleos celulares.

3.4.2. Multiplicação de parasitas intracelulares

Células THP-1 diferenciadas com PMA, por 48 horas, foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* (50 parasitas/célula), previamente cultivados em meio 199 por 4 ou 6 dias, dependendo da cepa. No total, foram preparadas 6 placas de 384 poços. Após 24 horas de infecção, a cultura passou por 3 processos de lavagem com PBS e seguido de adição de EdU 200 μ M (kit de ensaio Click- iT[®] - Thermo Fisher) e DMSO em diferentes concentrações, ambos diluídos em meio RPMI suplementado com PMA a 25 ng/mL. As concentrações finais de DMSO foram: 0; 0,125; 0,5 e 1%. A partir desse momento, uma placa

foi fixada a cada 24 horas e alguns poços foram tratados com o kit de reação, como descrito acima.

3.5. Ensaio de viabilidade de amastigotas intracelulares

Células THP-1 previamente diferenciadas, foram mantidas em frascos T75 por 48 horas a 37°C e 5% CO₂, seguido por infecção com promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046, na proporção de 50 parasitas/célula. Após 24 h de infecção, a cultura foi lavada com meio de cultura, ao menos cinco vezes, para remoção de parasitas extracelulares. Meio RPMI 1640 contendo 25 ng/mL de PMA foi adicionado à cultura. Após um período de incubação de 96 horas, células infectadas foram removidas com auxílio de um *cell scraper*, e centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos. O pellet recuperado passou, então, por agitação em vórtex, para ruptura mecânica das células hospedeiras, seguido por ressuspensão em meio 199 e centrifugação a 1200 rpm. O sobrenadante recuperado foi colocado em frascos de cultura T25 e incubadas a 26 °C e sob agitação de 30 rpm. A cultura foi avaliada diariamente e, observando-se parasitas com morfologia similar a promastigotas (presença de flagelo externo e motilidade), foi repicada e expandida para posterior infecção em células THP-1. Para a infecção, macrófagos previamente diferenciados, foram cultivados em placas de 384 poços e infectados com promastigotas de 6 dias de cultura, na proporção de 50 parasitas/célula. No total, 5 placas foram preparadas, as quais foram fixadas e submetidas para imageamento a cada 24 horas, após a infecção.

3.6. Determinação da atividade biológica de moléculas contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*

3.6.1. Plaqueamento e infecção

Após os ensaios de padronização e otimização do sistema biológico, o protocolo desenvolvido foi usado para as triagens de bibliotecas de compostos e extratos. Nesse contexto, as células THP-1 foram cultivadas em frascos T175 de maneira a alcançarem a densidade, volume e fase logarítmica do crescimento no dia de uso para ensaio, dependendo da quantidade de placas a serem preparadas. As células foram contadas em câmaras de Neubauer e, então, ressuspensa em meio RPMI, contendo 50 ng/mL de PMA na densidade de 7.000 células/poço ($2,8 \times 10^5$ células/mL). As células foram plaqueadas manualmente em placas de poliestireno

pretas de fundo transparente de 384 poços (Greiner), em um volume de 25 µL/poço. A cultura foi mantida sob agitação constante, com auxílio de um agitador magnético, para garantir a homogeneidade do número de células inter e entre placas. Além disso, em um mesmo dia de experimento, foi estabelecido um número máximo de 15 placas a serem preparadas, para evitar possíveis variações entre placas na taxa de infecção. Para infecção, promastigotas de 4 ou 6 dias de cultivo (dependendo da espécie) foram contados e ressuspensos no mesmo meio das células hospedeiras. Foram adicionados 25 µL/poço da cultura às placas, na proporção de 50 parasitas/célula ($1,4 \times 10^7$ /mL), exceto nos poços do controle não-infectado, geralmente na coluna 24. Nesses poços, foram adicionados 25 µL de meio completo apenas. Como para as células THP-1, a cultura permaneceu sob agitação constante durante o plaqueamento, com auxílio de um agitador magnético.

3.6.2. Preparação e adição dos compostos

- Ensaios com compostos referência

Primeiramente, amostras congeladas foram mantidas à temperatura ambiente para descongelamento, por aproximadamente 30 minutos. Placas de polipropileno (Greiner) foram, então, preparadas manualmente, transferindo-se os compostos referência para os poços das placas. As curvas dose-resposta, as quais continham de 10 a 15 pontos do composto referência serialmente diluídos por um fator de 2, em DMSO 100%, foram feitas com o auxílio de pipetas de 16 canais (Thermo Fisher). Além disso, DMSO (veículo) foi adicionado nas colunas 1,2 (onde colocaremos os controles negativos) e coluna 24 (onde colocaremos o controle não-infectado) enquanto que anfotericina B (controle) a 2mM em DMSO 100% foi adicionada na coluna 23.

A partir dessas placas, foram preparadas placas intermediárias, onde soluções foram diluídas 33,33x em PBS (concentração de DMSO = 3%), em volume variável, dependendo da quantidade de placas de ensaio a serem preparadas. Compostos foram adicionados às placas 24 horas após a infecção. Para isso, 10µL do conteúdo dos poços foi transferido manualmente para as placas de ensaio, sendo que anterior à transferência, o líquido foi misturado três vezes. As placas de ensaio preparadas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 72 ou 96 horas, dependendo da cepa/ espécie.

- Ensaios de triagens de alta escala

Para as triagens de bibliotecas, amostras foram testadas em concentração/diluição única. Além das placas contendo as amostras, mais três placas são preparadas, para controle do experimento. São denominadas “placas controle” e foram preparadas manualmente, com auxílio de pipetas de 16 canais. As placas controles são: (i) duas placas de curvas dose-resposta da anfotericina B, preparadas como descrito anteriormente e (ii) uma placa contendo DMSO 100% em todos os poços. Além disso, preparou-se uma placa contendo os controles das placas de compostos: controles negativos (DMSO 100%, para os controles infectados e não tratados – geralmente nas colunas 1 e 2) e controles positivos (2mM de anfotericina B em DMSO 100%, para o controle infectado tratado, coluna 23, e DMSO 100% para o controle não – infectado, coluna 24). Placas intermediárias foram preparadas, diluindo-se 0,6µL das placas estoques em 19,6µL de PBS, previamente adicionados às placas (fator de diluição = 33,33x). As placas intermediárias são preparadas para evitar a adição de 100% DMSO diretamente nas placas de ensaio, o que poderia causar danos às células infectadas, mesmo em pequenos volumes. Compostos foram testados em concentração única (diluição de 200x), sendo adicionados às placas 24 horas após a infecção.

Foram transferidos, então, 10µL do conteúdo das placas intermediárias para as placas de ensaio. A transferência de compostos sempre segue a seguinte ordem: Placa DRC 1, Placa de DMSO, Placa de composto 1, Placa de composto 2, Placa de composto *n*, Placa DRC 2. Nas placas de ensaio, os controles e compostos foram diluídos 200x em relação às placas estoque, sendo a concentração final de DMSO igual a 0,5% em todos os poços. O volume final na placa de ensaio foi 60µL. Os mapas das placas estoques estão apresentados na **figura 5**. As placas de ensaio preparadas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 48, 72 ou 96 horas, dependendo da biblioteca triada.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO		
B	DMSO	DMSO	Anf D1	Anf D2	Anf D3	Anf D4	Anf D5	Anf D6	Anf D7	Anf D8	Anf D9	Anf D10											ANF	DMSO	
C	DMSO	DMSO	Anf D1	Anf D2	Anf D3	Anf D4	Anf D5	Anf D6	Anf D7	Anf D8	Anf D9	Anf D10												ANF	DMSO
D	DMSO	DMSO	Anf D1	Anf D2	Anf D3	Anf D4	Anf D5	Anf D6	Anf D7	Anf D8	Anf D9	Anf D10												ANF	DMSO
E	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
F	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
G	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
H	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
I	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
J	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
K	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
L	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
M	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
N	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
O	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO
P	DMSO	DMSO																						ANF	DMSO

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	DMSO																							
B	DMSO																							
C	DMSO																							
D	DMSO																							
E	DMSO																							
F	DMSO																							
G	DMSO																							
H	DMSO																							
I	DMSO																							
J	DMSO																							
K	DMSO																							
L	DMSO																							
M	DMSO																							
N	DMSO																							
O	DMSO																							
P	DMSO																							

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
B	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
C	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
D	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
E	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
F	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
G	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
H	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
I	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
J	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
K	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
L	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
M	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
N	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
O	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				
P	DMSO	DMSO	Comp.	DMSO																				

Figura 5. Mapa das placas de ensaio para triagens em alta escala. As placas preparadas são: 2 placas de DRC, 1 placa contendo DMSO em todos os poços e as placas contendo as amostras a serem triadas. As placas de DRC e de compostos ainda possuem: os controles negativos - infectados e não tratados (vermelho) e os controles positivos – infectados e tratados com anfotericina B (amarelo) e não – infectados (verde). Anf D1 = anfotericina, na primeira diluição. Comp= compostos.

- Ensaio confirmatório contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*

As amostras que apresentaram atividade nos ensaios primários (concentração única), foram denominados *hits* e retestados em curvas dose-resposta. Para isso, retornamos às placas ou tubos estoques, localizamos as amostras selecionadas e retiramos o volume necessário para preparação das placas intermediárias, no modelo de dose-resposta. Cada amostra foi serialmente diluída em 10 pontos, por um fator de 2, diretamente em PBS com 3% DMSO, para preparação da placa intermediária (fator de diluição – 33,33x). Após mistura do líquido, 10 µL do conteúdo foi transferido para a placa de ensaio, as quais foram colocadas a 37°C e 5% CO₂ por 48, 72 ou 96 horas.

3.6.3. Fixação e coloração das placas

Após o período de incubação, placas foram fixadas com 4% de PFA, por 20 minutos, protegidas da luz, seguido por coloração com 5µM de Draq5, por 15 minutos. As placas então foram prosseguidas para imageamento, como descrito a seguir.

3.7. O ensaio de “*time-kill*”

Células THP-1 previamente diferenciadas foram plaqueadas a uma densidade de 7.000 células/poço em placas de ensaio de 384 poços. Após 48 horas, parasitas de diferentes cepas foram adicionados nos poços a uma razão de 50 parasitas/célula, seguido pela adição dos compostos anfotericina B, miltefosina, pentamidina e VL-2098 após 24 horas de infecção, previamente preparados em dose-resposta, como descrito anteriormente. As placas de ensaio foram preparadas, colocando-se 2 ou 3 cepas/placa (8 colunas/cepa), sendo que, no total, foram preparadas 14 placas. A cada 24 horas após a infecção (0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a adição dos compostos), duas placas foram fixadas com 4% PFA, coradas com Draq 5 e prosseguidas para imageamento, como descrito a seguir.

3.8. Estudos de combinação

O perfil de interações entre os compostos foi determinado usando o modelo de combinação de drogas à razão constante, onde os dois compostos são combinados em diferentes proporções, baseando-se nos valores de EC₅₀ pré-determinados. Para cada interação estudada,

diferentes combinações de compostos foram usadas (razões de $EC_{50} = 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5$), sendo que cada uma das combinações foi preparada em dose-resposta (10 pontos, em um fator de diluição = 2) em placas de 384 poços. Células THP-1 foram, então, diferenciadas com PMA 50ng/mL e plaqueadas a uma densidade de 7.000 células/poço em placas de ensaio de 384 poços e, após 48 horas, promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 foram adicionados nos poços a uma razão de 50 parasitas/célula. Após 24 horas de infecção, o conteúdo das placas estoque de combinação foi diluído em PBS (fator de diluição 33,33x) e transferido para as placas de ensaio. Foi usado o mesmo protocolo de diluição e transferência de compostos descrito no item 3.6.2. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% CO₂ e prosseguidas para fixação, coloração e processamento.

3.9. Aquisição e análise de imagens - Sistema de alto conteúdo

Imagens de fluorescência foram adquiridas pelo sistema de *High Content Screening* Operetta (Perkin Elmer), versão 3,1, usando a objetiva de 20x WD e excitação de 647 nm/emissão de 681 nm. Anterior às leituras, os parâmetros de aquisição foram determinados, tais como: tempo de exposição, foco, mapa da placa e número de poços para obtenção. Para cada poço, 4 imagens foram adquiridas, as quais foram processadas e analisadas pelo software Harmony (Perkin Elmer). Os parâmetros de detecção e processamento foram ajustados para: identificação dos núcleos das células hospedeiras, segmentação das células hospedeiras, detecção de parasita de maneira individual e seleção das células infectadas.

3.10. Avaliação da inibição de crescimento em promastigotas de *Leishmania*

Os compostos testados foram diluídos serialmente por um fator de 2 (15 pontos de diluição) em DMSO nas placas estoque, - a fim de se obter um padrão de curva dose-resposta. Uma placa de diluição intermediária foi preparada utilizando uma pipeta manual de 16 canais, transferindo-se 0,6 µL do conteúdo da placa estoque para a placa contendo 19,4 µL de PBS (fator de diluição de 33,33x). Foram, então, transferidos 10µL da solução de compostos para a placa de ensaio de 384 poços. Promastigotas de *Leishmania* na fase logarítmica de crescimento foram ressuspensos em meio 199 na densidade de 1×10^6 parasitas/mL (em 50 µL) e dispensados nas placas de ensaio, as quais foram incubadas por 72 horas a 26 °C e sob agitação de 30 rpm. Após esse período, os parasitas foram lisados com tampão de lise, contendo 30 mM de Tris HCl, pH 7; 7,5 mM de EDTA; 0,012% de saponina e 0,12% de Triton X-100, e o corante

SYBR Green (Life Technologies), diluído 1:200, foi adicionado em todos os poços, como descrito para ensaios de *T. brucei*, por Faria *et al.*, 2015. As placas foram agitadas e incubadas protegidas da luz, por uma hora, seguido pela leitura no leitor de placas EnSight (Perkin Elmer) com excitação em 485 nm/emissão em 530 nm (Faria *et al.*, 2015).

3.11. Avaliação da inibição de crescimento em amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

Ensaio de atividade antiparasitária contra o modelo de *T. cruzi* foram realizados como descrito por Moraes *et al.*, 2014. As células U-2 OS recém tripsinizadas foram contadas e ressuspensas em meio DMEM alta glicose (Highclone), suplementado com FBS 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, na densidade de $1,75 \times 10^4$ células/mL. A cultura foi então semeada em placas de 384 poços, no volume de 40 µL/poço (700 células/poço) e, após 24 horas, a infecção foi feita com o sobrenadante de culturas de tripomastigota de *T. cruzi* ($1,4 \times 10^4$ parasitas/poço e 10 µL). Após 24 horas de infecção, os compostos foram diluídos serialmente por um fator de 2 (10 pontos de diluição) em 100% DMSO nas placas estoque, - a fim de se obter um padrão de curva dose-resposta. A placa intermediária foi preparada utilizando uma pipeta manual de 16 canais, transferindo-se 1,2 µL do conteúdo da placa estoque para a placa contendo 18,8 µL de PBS (fator de diluição de 16,66x). Foram então transferidos 10 µL da solução de compostos para a placa de ensaio, atingindo um volume final de 60 µL/poço e concentração final de DMSO a 1%. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 96 horas e, então, foram fixadas com PFA 4% e seguidas para coloração com o reagente Draq5 (Moraes *et al.*, 2014). Imagens foram adquiridas e analisadas como descrito no item 3.10.

3.12. Avaliação da inibição de crescimento em tripomastigotas sanguíneos de *T. brucei*

Os ensaios foram realizados como descrito em Faria *et al.*, 2015. Brevemente, os compostos testados foram diluídos serialmente por um fator de 2 (15 pontos de diluição) em 100% DMSO nas placas estoque. A placa intermediária foi preparada utilizando uma pipeta manual de 16 canais, transferindo-se 0,6 µL do conteúdo da placa estoque para a placa contendo 19,4 µL de PBS (fator de diluição de 33,33x). Foram então transferidos 10 µL da solução de compostos para a placa de ensaio de 384 poços. Parasitas na fase de crescimento logarítmico foram ressuspensos em meio HMI-9 na densidade de 8×10^3 parasitas/mL e dispensados em placas de 384 poços. As placas de ensaio foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% CO₂ e,

então, foram prosseguidas para coloração e leitura, como descrito no item 3.10 (Faria *et al.*, 2015).

3.13. Análise de dados

3.13.1. Normalização dos resultados quantitativos

A análise das imagens adquiridas pelo sistema de alto conteúdo Operetta resulta em valores de número de células, número de células infectadas e a média do número de parasitas/célula infectada para as quatro imagens de cada poço. A *taxa de infecção* foi definida como a razão do número de células infectadas pelo número total de células (x100, para se obter o valor em percentagem). Os valores de taxa de infecção foram então normalizados, considerando os controlos negativos (células tratadas apenas com DMSO) e os controlos não-infectados, para determinar a *atividade normalizada*, a qual é expressa como a percentagem de inibição de parasitas em comparação com os controlos. A atividade normalizada foi obtida pela fórmula abaixo:

$$\text{Atividade normalizada} = [1 - (TI_A - TI_{NI}) / (TI_I - TI_{NI})] \times 100$$

Onde: TI_A = taxa de infecção do poço tratado com a amostra a ser testada

TI_{NI} = média dos valores de taxa de infecção dos controlos não-infectados

TI_I = média dos valores de taxa de infecção dos controlos com DMSO

A taxa celular representa a razão entre o número de células no poço do composto testado e a média do número de células dos controlos infectados da placa.

3.13.2. Comparação entre grupos de amostras e correlação

A comparação entre grupos de amostras foi feita utilizando-se o teste ANOVA; enquanto que a correção entre grupos foi feita pelo teste Spearman. Ambos os testes foram realizados com o software licenciado Graphpad Prism.

3.13.3. Controle de qualidade – Z' – factor

Durante a fase de desenvolvimento e validação do ensaio de HCS e realização da campanha de triagem, os experimentos foram rotineiramente submetidos a controle de qualidade dos dados obtidos. O principal parâmetro de controle de qualidade de ensaios de HCS é o “Z'-factor” (Zhang, Chung & Oldenburg, 1999), um fator estatístico adimensional que indica a qualidade de um ensaio ou de uma campanha de triagem por HCS, pelo grau de “separação” entre controles positivos e negativos. Os valores de Z'-factor foram calculados baseados no parâmetro de taxa de infecção, como mostrado na fórmula a seguir:

$$Z'\text{-factor} = 1 - \frac{3(dp_N + dp_P)}{|M_N - M_P|}$$

Onde: dp_N = desvio padrão do controle negativo

dp_P = desvio padrão do controle positivo

M_N = média de infecção dos controles negativos

M_P = média de infecção dos controles positivos

3.13.4. Análise dos resultados das triagens

A partir dos dados de *screening* primário, as amostras testadas foram avaliadas considerando dois parâmetros: atividade normalizada e taxa celular. Os dados foram processados e analisados pelo software licenciado Spotfire, para construção de gráficos de atividade normalizada *versus* taxa celular e, assim, realizar a seleção dos *hits*.

A partir dos ensaios de dose-resposta, os valores de atividade normalizada e taxa celular foram processadas com o software licenciado Graphpad Prism, para geração de curvas dose-resposta e determinação dos valores de EC_{50} e CC_{50} por interpolação. Para a proposta do estudo, EC_{50} foi definida como a concentração de composto correspondente a 50% de atividade (nesse caso, inibição da infecção) e CC_{50} como a concentração de composto capaz de reduzir em 50% a taxa

celular. Potência é relacionada com a EC₅₀ do composto, enquanto que a eficácia é associada à atividade máxima do composto observada nas curvas dose-resposta). O índice de seletividade indica a razão entre CC₅₀ e EC₅₀, sendo que quando não foi possível calcular o valor de CC₅₀, o índice de seletividade foi determinado como maior do que a razão entre a maior concentração testada e o valor de EC₅₀.

3.13.5. Análise dos resultados dos ensaios de combinação

A partir das interações realizadas, valores aparentes de EC₅₀ foram determinados para cada combinação em particular, como descrito no item 3.13.4, e utilizados para determinação das concentrações inibitórias fracionais (FIC, *do inglês fractional inhibitory concentrations*), as quais foram calculadas como expresso na equação seguinte:

$$\text{FIC} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ para o composto em combinação}}{\text{EC}_{50} \text{ para o composto}}$$

Os valores de FIC foram utilizados para construção dos gráficos no modelo de isoblograma, utilizando-se o software Graphpad Prism. Além disso, para cada combinação, foi calculada a somatória dos valores de FIC, que representa o valor de FIC do composto A mais o valor de FIC do composto B. A média das somatórias foi, então, obtida levando em consideração todas as combinações de dois compostos, e usada para determinação e classificação do perfil da interação dos compostos. Em nossos ensaios, as interações foram classificadas como previamente sugerido (Odds, 2003):

- Somatória dos valores de FIC < 0,5: sinergismo
- Somatória dos valores de FIC > 0,5 e ≤ 4: associação aditiva (indiferente)
- Somatória dos valores de FIC > 4: antagonismo

3.13.6. Pesquisa dos compostos selecionados em plataformas *online* de busca

A busca de informações dos compostos selecionados das campanhas de triagem foi feita na literatura, considerando a molécula química dos mesmos, utilizando-se as seguintes plataformas de busca: Drug bank, Pubchem, TriTrypDB, SwissADME e SwissTargetPrediction.

4. Resultados e discussão

Para facilitar a leitura e o entendimento, os resultados obtidos no desenvolvimento do projeto foram divididos em quatro sessões. Na primeira Seção, será abordado o desenvolvimento e validação do ensaio baseado em imagem para amastigotas intracelulares de *Leishmania*, considerando o estabelecimento do modelo biológico e a otimização do processamento de imagens pelo software de análises. Na Seção II, serão descritos os ensaios biológicos para desenvolvimento de um painel de cepas de *Leishmania*, evidenciando principalmente as diferenças encontradas nos perfis de infecção e na atividade de drogas referência. A Seção III será dedicada às triagens de bibliotecas, constituídas de amostras naturais e sintéticas, proveniente de diferentes colaboradores, visando a prospecção de candidatos com atividade anti-*Leishmania*. Por fim, na Seção IV, será apresentada a triagem da biblioteca LOPAC contra os modelos de duas espécies de *Leishmania*, destacando as diferenças entre o perfil de *hits* encontrados contra *L. infantum* e *L. donovani* e os ensaios secundários com os *hits* selecionados.

SECÃO I: Desenvolvimento do ensaio baseado em imagem para triagem de compostos contra *Leishmania*

Atualmente, diversos protocolos de ensaios fenotípicos para triagem de compostos contra as formas amastigotas de *Leishmania* estão disponíveis na literatura (Siqueira-Neto *et al.*, 2012; Aulner *et al.* 2013; Dagley *et al.*, 2015). Esses ensaios configuram um grande avanço no desenvolvimento de fármacos para esse parasita, uma vez que permitem a junção de um modelo biologicamente relevante, em termos de manifestação clínica da doença e tratamento, e a eficiência das abordagens *high throughput*. Nesses casos, nos é fornecida uma informação multiparamétrica do modelo de infecção, onde podemos analisar não só atividade do composto contra o parasita estudado, mas também os efeitos tóxicos do mesmo na célula hospedeira. Apesar de todas as vantagens, essa abordagem ainda possui algumas limitações tais como: (i) altas taxas de falhas de experimento, decorridas da grande variação de infecção inter e entre placas; (ii) baixa taxa de confirmação de atividade dos compostos selecionados das triagens; (iii) uso de uma espécie/cepa única, geralmente *L. donovani*, levando a uma seleção de *hits* que prioriza compostos com atividade espécie-específica.

Nesse contexto, baseado em protocolos já reportados na literatura, foi desenvolvido um ensaio fenotípico otimizado para triagem de compostos contra amastigotas intracelulares de parasitas do gênero *Leishmania*. O ensaio proposto consiste no uso de promastigotas de *L. infantum* de fase estacionária para infectar macrófagos THP-1 diferenciados e a posterior quantificação da taxa de infecção após o tratamento. Com o objetivo de estabelecer uma metodologia mais robusta, sensível e reprodutível, diversas otimizações foram realizadas no modelo, focando: no modelo de infecção, para determinação do melhor protocolo de cultivo das células e parasitas, de infecção e de exposição a drogas, e no ajuste do software comercial Harmony (Perkim Elmer), para estabelecimento de uma apropriada análise de imagens (**figura 6**).

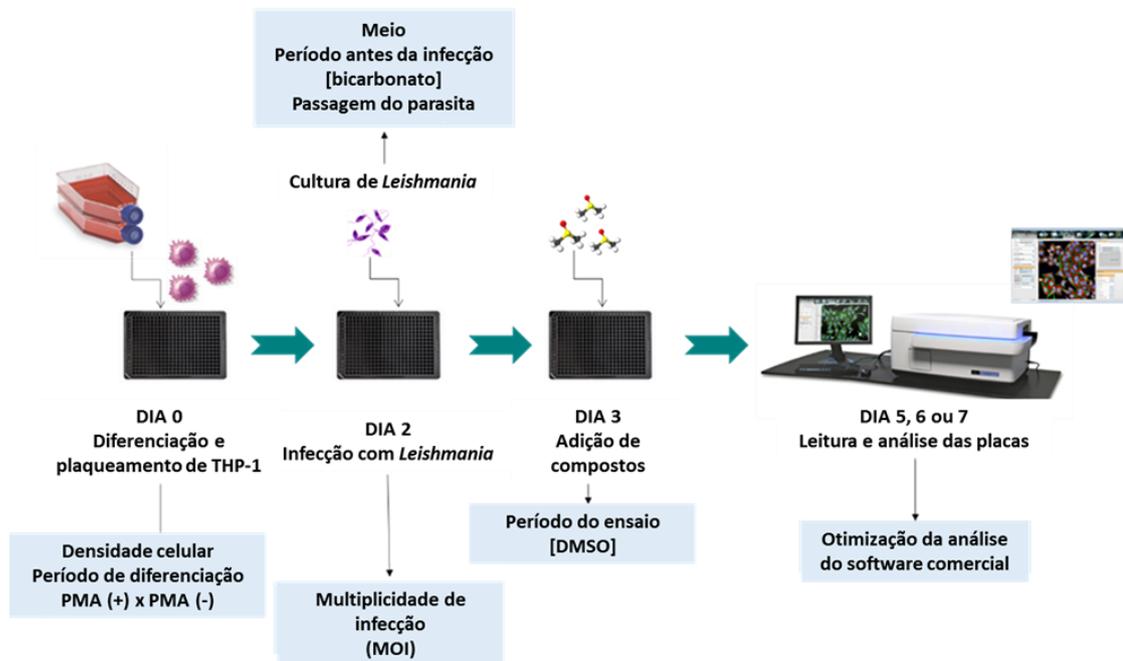


Figura 6. Esquema do ensaio desenvolvido para triagem de compostos contra o modelo de infecção de macrófagos THP-1 por *Leishmania*. As informações destacadas nos quadros azuis indicam os parâmetros otimizados durante o desenvolvimento do ensaio. Brevemente, considerando o modelo biológico, os seguintes parâmetros foram definidos: (i) para a célula hospedeira: densidade celular, período e melhor protocolo de diferenciação anterior à infecção, (ii) para o parasita: composição do meio de cultivo, passagem da cultura, período de incubação antes da infecção, (iii) para a infecção e tratamento: multiplicidade de infecção, concentração de DMSO tolerável pelo sistema e período de exposição aos compostos/ extratos. Em termos do software de aquisição e análise de imagens, foram estabelecidos os melhores parâmetros para obtenção e processamento das imagens.

4.11. Estabelecimento e otimização do ensaio biológico

Considerando o sistema biológico, os melhores parâmetros de cultivo e ensaio para a célula hospedeira e parasita foram determinados. Dentre as linhagens e células primárias de macrófagos disponíveis, selecionamos a linhagem THP-1 pela relevância biológica, uma vez que ela é de origem humana e possui grande semelhança a macrófagos primários (Daigneault *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007), bem como pela facilidade de manutenção e alto rendimento, que é essencial em ensaios de alta escala. Além disso, essas células não se multiplicam após diferenciadas, formando uma monocamada celular, característica importante para ensaios baseados em imagem. Por fim, essas células vem sendo frequentemente reportadas para estudos de infecção de *Leishmania* e para triagem de moléculas contra parasitas intracelulares (Gebre-Hiwot *et al.*, 1992; Karin Seifert, Escobar & Croft, 2010; Siqueira-Neto *et al.*, 2012; Aulner *et al.* 2013; Dagley *et al.*, 2015).

Primeiramente, a cultura de THP-1 foi diferenciada com o éster de forbol PMA 50 ng/mL e semeada em placas de 384 poços, nas densidades de 4.000, 7.000 e 10.000 células/poço, a fim de definir a melhor condição para análise de imagens (**figura 7**). Observamos que a densidade intermediária forneceu um número de amostra (células) adequado para as análises estatísticas (~1.000 células/evento) e gerou imagens as quais permitiram uma correta segmentação celular pelo software utilizado. Além disso, houve formação de aglomerados celulares na densidade de 10.000 células/poço, o que afetou negativamente a individualização de células pelo software de análise.

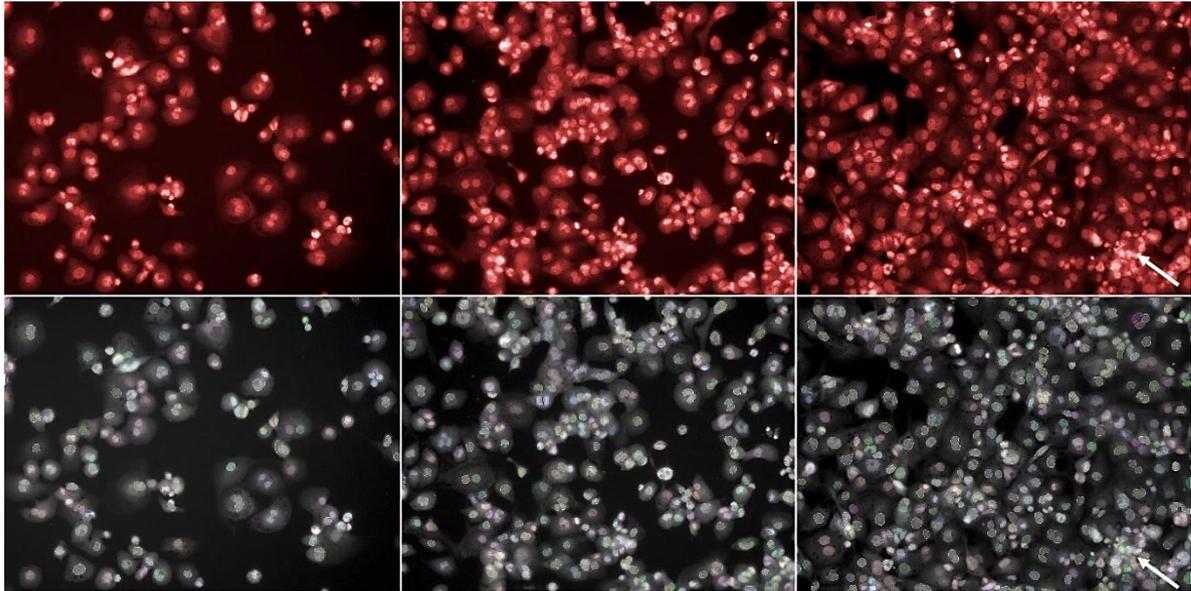


Figura 7. Estabelecimento da melhor densidade das células THP-1. Seleção da melhor densidade celular para placas de 384 poços: 4000 (esquerda), 7000 (centro) e 10.000 (direita) células. As imagens foram adquiridas no microscópio automatizado Operetta: na porção superior estão apresentadas as imagens brutas obtidas (coradas com Draq5), enquanto que na porção inferior está indicada a segmentação dos núcleos celulares. As setas indicam a formação de agregados celulares, resultado da alta densidade de célula. Magnificação: 20x.

Posteriormente, o efeito de diferentes tratamentos com PMA no nível de diferenciação das células THP-1 foi avaliado. Os parâmetros foram: o tempo de tratamento com PMA e a manutenção ou não do reagente no meio de cultura após o período de diferenciação. O período de incubação de 48 horas foi suficiente para a diferenciação da linhagem em células *macrophage-like*, pois, a partir desse momento, já foi possível observar células aderentes e espalhadas, com citoplasma aumentado, e baixa taxa de multiplicação celular. Além disso, a manutenção do PMA, mesmo após a conclusão da diferenciação em 48 horas, foi essencial para manter a morfologia similar a macrófagos (**figura 8a**). Culturas, das quais o PMA foi removido, apresentaram um menor número médio de células no poço, sugerindo que uma quantidade significativa de células perdeu a aderência depois da remoção do reagente (**figura 8b**). Essas culturas ainda se apresentaram mais similar a células monocíticas indiferenciadas, como demonstrado por: menor área citoplasmática (**figura 8c**), mudanças na morfologia da célula (**figura 8d**) e maior taxa de multiplicação celular (**figura 8e**). Portanto, nestas condições, a manutenção do reagente PMA no meio de cultura garantiu que as células diferenciadas se mantivessem fisiologicamente similares a macrófagos, durante toda a duração do ensaio biológico.

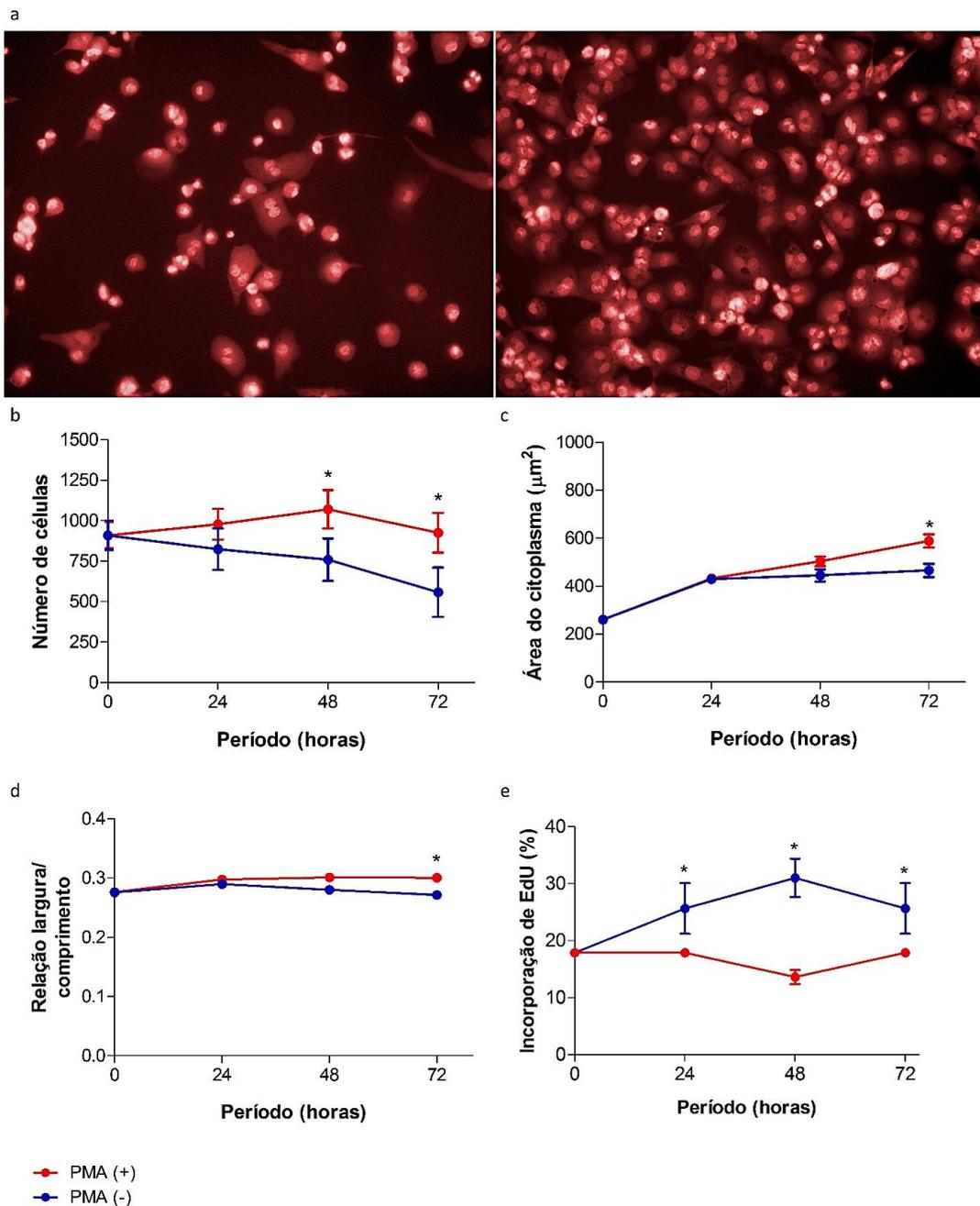


Figura 8. Efeito da remoção do PMA depois da completa diferenciação celular. (a) Após 48 horas de diferenciação, células foram mantidas na ausência (esquerda) e presença (direita) do reagente PMA. Para as culturas sem PMA, depois do período de tratamento de 48 h, placas foram lavadas com PBS e meio RPMI fresco foi adicionado à cultura. Imagens foram adquiridas 72 horas após a remoção do reagente. Magnificação: 20x. (b), (c), (d) e (e) Diferenças entre as culturas com (PMA (+)) e sem (PMA (-)) no número de células, na área citoplasmática, na razão entre comprimento e largura do citoplasma e multiplicação celular, respectivamente. Asteriscos indicam diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0.0001$). $n = 2$

Para estabelecer a condição mais apropriada para a cultura de promastigotas de *Leishmania* e otimizar, se possível, a metaciclogênese e infectividade, *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 foi usada como modelo padrão, a qual foi avaliada considerando diferentes condições: (i) composição do meio de cultura, (ii) período de incubação da cultura de promastigotas antes da infecção, (iii) concentração de bicarbonato de sódio no meio de cultura e (iv) número de passagens dos cultivos.

Atualmente, diversos meios de cultivo são usados para manutenção de promastigotas de *Leishmania*, os quais são determinantes para o rendimento celular, a viabilidade da cultura e a infectividade dos parasitas (Castelli *et al.*, 2014; Childs, McRoberts & Moussa, 1979; Childs, Foster & McRoberts, 1978; Merlen *et al.*, 1999). Mais especificamente, estudos feitos por Santarem *et al.*, 2014, mostram que parasitas cultivados em meios de cultura distintos podem apresentar mudanças na expressão de genes metacíclicos, resultando em diferentes níveis de infectividade *in vitro* e *in vivo* (Santarem *et al.*, 2014). Tendo isso em vista, meios de cultura que estavam disponíveis em nosso laboratório – 199, RPMI 1640, Schneider, Grace's e LIT – foram testados, a fim de estabelecer a condição mais apropriada para a rotina de *screening* e aumentar os níveis de infecção em células THP-1. Para avaliar isso, foram analisados o crescimento do parasita, tempo de duplicação e perfil de infecção (**figura 9**). Os meios 199, Schneider e LIT promoveram um rápido crescimento celular, nos quais as culturas atingiram a fase estacionária no quarto dia após o inóculo inicial; enquanto que os parasitas cultivados nos meios Grace's e RPMI 1640 apresentaram uma dinâmica de crescimento mais lenta, alcançando a fase exponencial nos dias 4 e 5, respectivamente. Também, pudemos observar que o parasitas de *Leishmania* em meio Schneider não toleraram longos períodos em cultura, sendo que a morte celular inicia-se por volta do dia 7 de cultivo (**figura 9a e 9b**).

Posteriormente, promastigotas foram usados para infectar células THP-1 diferenciadas e, após 72 horas, a taxa de infecção e número de parasitas/célula infectada foram avaliados (**figura 9c e 9d**). O meio RPMI 1640 levou a uma menor taxa de infecção ($63,9 \pm 5,61$), comparado aos outros meios testados, que apresentaram taxa de infecção próximo ou superior a 70%; no entanto, nenhuma diferença significativa foi observada no número de amastigotas intracelulares ($5,52 \pm 0,37$) ($p > 0,0001$). O meio 199 foi selecionado como meio padrão, porque ele proporcionou um rápido crescimento de promastigotas, quando comparado aos meios RPMI e Grace's, o que é essencial para uma rotina de triagens, bem como manteve a cultura em fase estacionária, sem que houvesse morte celular, o que não observamos no cultivo com meio Schneider. Além disso, gerou uma alta taxa de infecção ($> 70\%$) e um

aumentado número de parasitas intracelulares (média de 6 parasitas/célula infectada). Ainda, quando comparado ao meio LIT, em dias diferentes de ensaio, o meio 199 apresentou menores taxas de variação, como pode ser observado pelo pequeno desvio mostrado nos gráficos de taxa de infecção e número de parasitas/célula infectada.

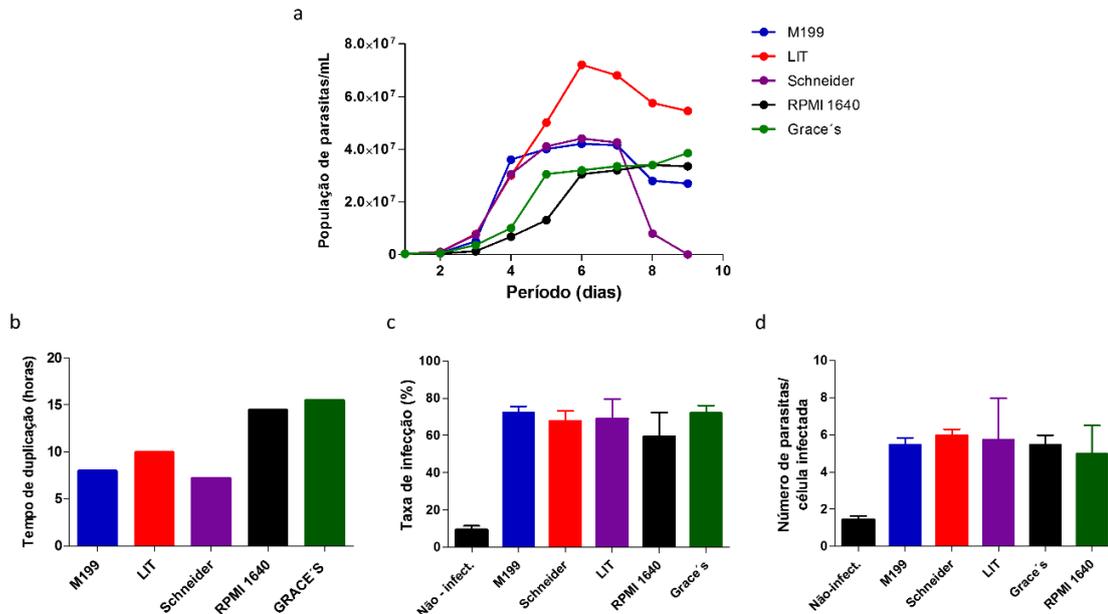


Figura 9. Efeito dos diferentes meios de cultura na taxa de crescimento de promastigotas de *Leishmania* e no perfil de infecção. (a) e (b) Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania* cultivados em diferentes meios e tempo de duplicação, respectivamente. Culturas a 5×10^5 /mL foram colocadas em frascos de cultura T25 (5mL) e avaliadas diariamente por contagem direta em microscópio óptico, durante 10 dias de experimento. (c) e (d) Efeito dos diferentes meios de cultivo no perfil de infecção, considerando a taxa de infecção e número de parasitas intracelulares. n=2.

Estudos prévios demonstraram que o uso de culturas de promastigotas entre a fase logarítmica tardia e o começo da fase estacionária resultaram em um enriquecimento das formas metacíclicas na cultura, o que levou a maiores taxas de infecção *in vitro* (da Luz *et al.*, 2009; Siqueira-Neto *et al.*, 2012). Portanto, o efeito de diferentes períodos de incubação antes da infecção foi avaliado (**figura 10**), com a finalidade de determinar o dia com maior proporção de parasitas viáveis e infectivos. Parasitas de 5 e 6 dias de cultura geraram taxas mais altas de infecção (74 e 72%, respectivamente), comparado a promastigotas de 7 dias, os quais resultaram

em 65% de infecção. O mesmo perfil foi observado para o número de parasitas intracelulares ($p > 0,0001$).

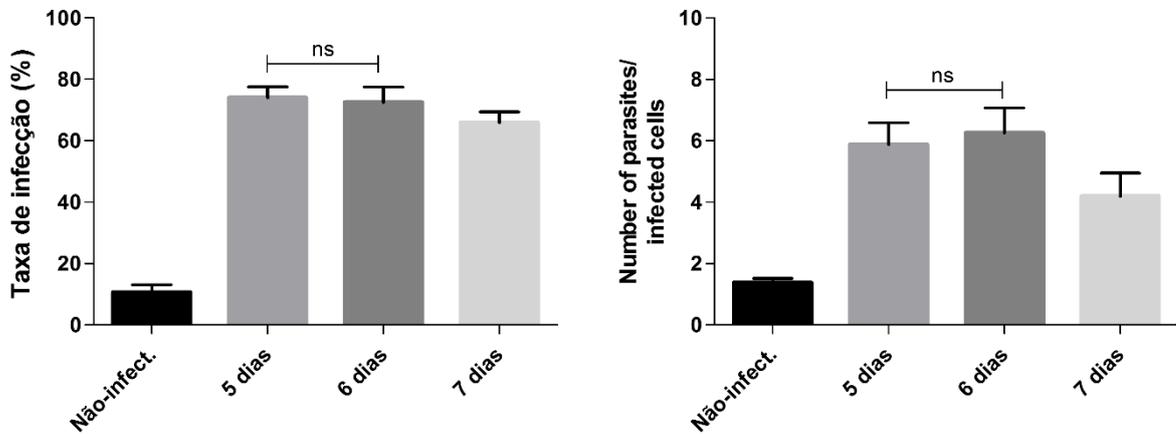


Figura 10. Efeito dos diferentes períodos de incubação no perfil da infecção. Parasitas provenientes de 5, 6 ou 7 dias de cultura foram usados para infectar células THP-1 e, após 72 horas, a taxa de infecção e o número de amastigotas foram avaliados. $n=3$ (10 poços/dia). $p > 0,0001$.

Com o objetivo de confirmar o impacto do pH na cultura de *Leishmania* e, possivelmente, enriquecer as formas infectivas na cultura de promastigotas através da acidificação natural do meio, parasitas foram cultivados em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio e foram avaliados quanto a crescimento, metaciclogênese e infectividade em macrófagos (**figura 11**). Parasitas cultivados na ausência ou na concentração de bicarbonato de 0,3 g/L apresentaram altas taxas de crescimento e alcançaram a fase estacionária apenas nos dias 5 ou 6. Essas culturas também geraram taxas de infecção em cerca de 90%, nas quais um grande número de parasitas (entre 9 e 13 parasitas/célula) foi mantido ao longo do período do ensaio. Resultados obtidos no trabalho feito por Luz *et al.*, 2009, demonstraram que parasitas pré-condicionados em meios ácidos com pH 5,4 resultaram em uma adequada metaciclogênese e altos níveis de infecção em macrófagos primários (Luz *et al.*, 2009). Dessa forma, é razoável propor que a ausência ou baixa concentração de bicarbonato levou a uma natural acidificação do meio, o que resultou em um aumento das formas metacíclicas na cultura e, conseqüentemente, em altas taxas de infecção. Apesar da ausência de bicarbonato apresentar um aumento modesto no número de parasitas intracelulares, em comparação a concentração de

0,3 e 1 g/L, optamos pelo uso da concentração de 0,3 g/L do reagente, reduzindo eventuais mudanças de pH do meio, quando estocado por longo período.

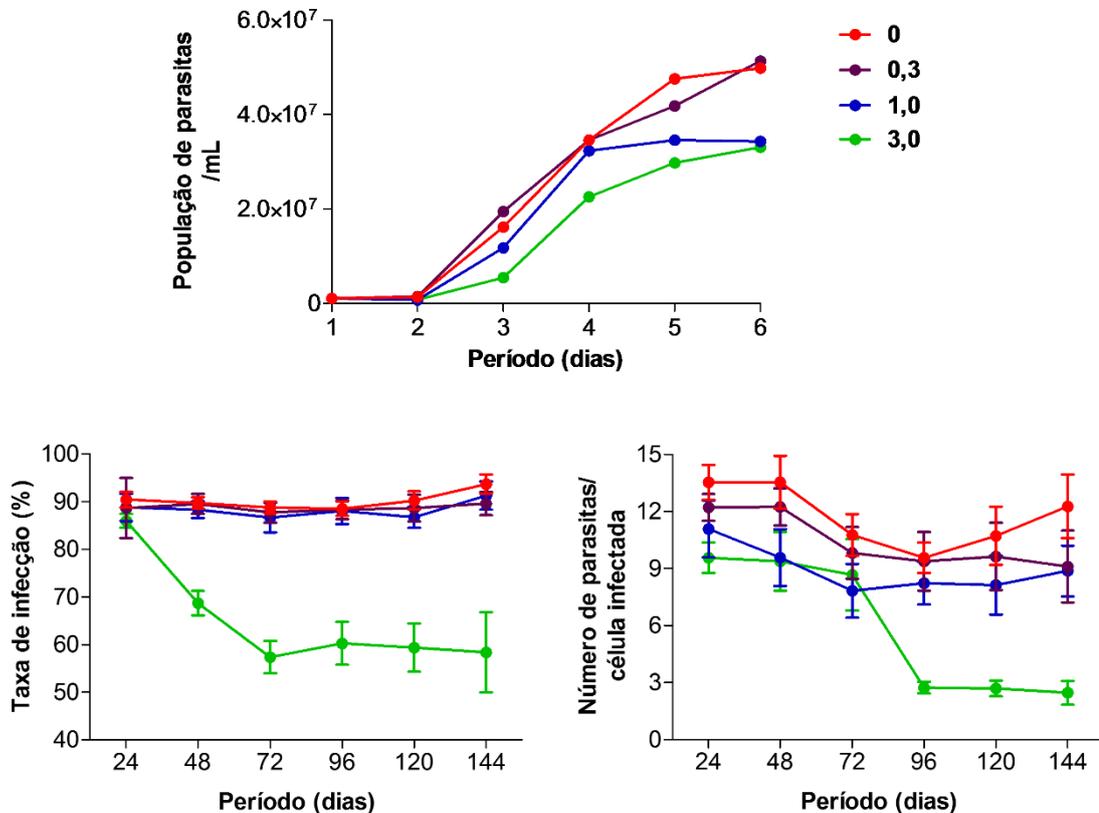


Figura 11. Efeito da concentração de bicarbonato de sódio no meio de cultura de promastigotas de *Leishmania*. Promastigotas axênicos foram cultivados em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio por 6 dias, como mostrado na legenda: 0 (vermelho); 0,3 (roxo); 1,0 (azul) e 3,0 g/L (verde) (gráfico superior). Então, promastigotas foram usados para infectar macrófagos THP-1 e a taxa de infecção (inferior, esquerdo) e o número de amastigotas intracelulares (inferior, direito) foram estimados durante 144 horas de ensaio. n= 2. p> 0.0001.

Como mostrado em outros estudos, a manutenção de promastigotas em cultura por longo período pode levar a mudanças em processos biológicos do parasita de *Leishmania*. Moreira *et al.*, 2012, demonstrou que passagens contínuas do promastigotas *in vitro* induziram uma baixa taxa de infecção, como resultado da perda da capacidade de diferenciação do parasita (Moreira *et al.*, 2012). Além disso, outros trabalhos reportam uma diminuição da expressão das proteínas de membrana específicas para as formas metacíclicas, MSP (do inglês, *major surface*

protease) e PSA (*promastigote surface antigen*), em parasitas mantidos em cultura por longo período (Lei, Romine & Beetham, 2010). Para avaliar o efeito das passagens em nosso sistema, culturas de passagem P3 a P18 foram utilizadas para infectar células THP-1 (**figura 12**). Interessantemente, considerando a taxa de infecção, não foi observada diferença estatística entre as passagens de cultura ($p > 0,0001$). Apesar do número de parasitas intracelulares ser maior em infecções feitas com promastigotas de P9, o aumento notado nesse parâmetro não foi um evento dependente da passagem. Acreditamos que essa diferença nos dados obtidos, quando comparado aos resultados encontrados na literatura, se deve ao fato de que, no nosso laboratório, as culturas de promastigotas foram sempre repicadas antes de atingirem a fase estacionária de crescimento. No entanto, como foi feita apenas uma avaliação fenotípica no perfil de infecção (avaliação de taxa de infecção e número médio de parasitas/célula), sem considerar possíveis modificações genéticas no parasita ou mudanças na resposta imune, decidimos pelo uso de parasitas até a passagem 6, para garantir uma maior homogeneidade nas culturas usadas nos experimentos.

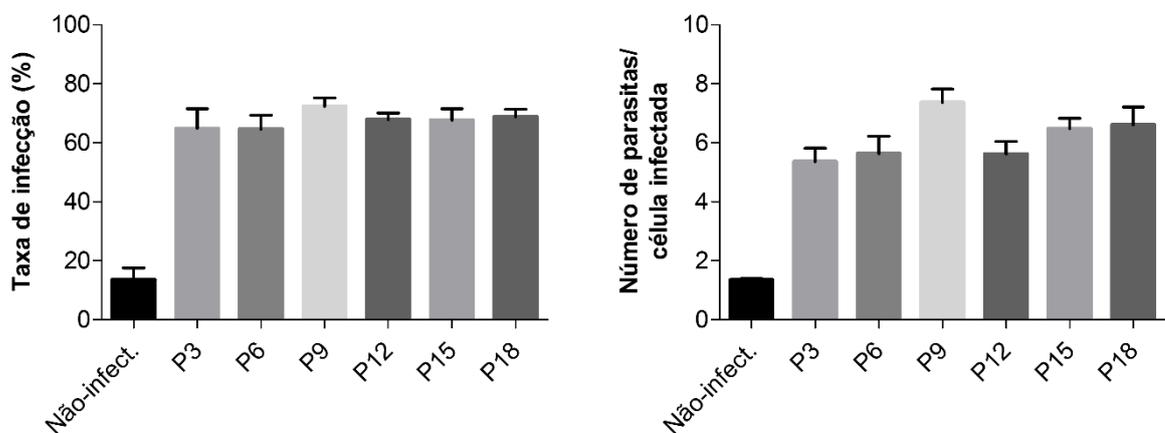


Figura 12. Efeito do número de passagens da cultura de promastigotas no perfil de infecção. Dados fazem referência ao sistema após 72 horas de infecção. $n=2$. $p > 0.0001$

4.12. Validação do modelo de infecção de células THP-1 por promastigotas de *Leishmania*

Como o protocolo visa a seleção de compostos ativos contra amastigotas intracelulares, nós investigamos se a infecção observada correspondia a parasitas que, de fato, haviam se diferenciado para a forma amastigota, estavam viáveis e em multiplicação no interior das células hospedeiras. Dessa forma, o ensaio se mostra mais biologicamente relevante e

podemos, conseqüentemente, realizar uma seleção mais apropriada de compostos/ extratos candidatos, como já demonstrado em trabalhos previamente reportados (Tegazzini *et al.*, 2016). Através de lâminas preparadas com giemsa, foi possível observar a presença de parasitas intracelulares similares às formas amastigotas, com morfologia oval e ausência de flagelo exteriorizado, a partir de 24 horas de infecção (dado não mostrado). Para evidenciar a presença de parasitas viáveis e em replicação, o ensaio de incorporação de EdU foi realizado (**figura 13a**). O ensaio é baseado no análogo de timidina (EdU), o qual é incorporado em fitas de DNA recentemente sintetizadas, e sua posterior detecção por fluorescência. Esta por sua vez, ocorre graças à reação química catalisada por *copper*, entre uma azida (corante Alexa 488) e um alquino (reagente EdU). Observando a infecção no decorrer do período de 120 h de ensaio, a taxa de infecção permaneceu constante em cerca de 80% (**figura 13b**), enquanto houve uma pequena diminuição do número de parasitas intracelulares, a partir de 48 horas de infecção (**figura 13c**). Estes dados sugerem que a queda no número de parasitas intracelulares seja decorrente da morte de promastigotas não infectivos (não-metacíclicos), os quais não foram capazes de se diferenciar para as formas amastigotas. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por DaMata *et al.*, 2015, que observou uma queda de infecção por *L. guyanensis* em macrófagos primários, em 48 h de infecção (DaMata *et al.*, 2015). Após 48 a 72 horas de infecção, foi possível observar a incorporação do análogo, indicando que os promastigotas de fato se diferenciaram para amastigotas, os quais estavam em multiplicação dentro dos macrófagos. Nesse período, a taxa de amastigotas com marcadores de fluorescência foi determinada em 30 – 40% (**13d**).

Avaliamos também a capacidade dos amastigotas intracelulares de completarem seu ciclo de vida, ou seja, se diferenciarem em formas promastigotas e infectarem novas células hospedeiras. Para isso, células THP-1 diferenciadas foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* e, após 24 h de infecção, a cultura foi lavada ao menos cinco vezes, para garantir a remoção dos parasitas extracelulares. Após 96 h de infecção, células hospedeiras infectadas foram rompidas mecanicamente e a recuperação de amastigotas intracelulares foi feita, os quais foram mantidos em meio 199. Nesse momento, observamos parasitas com morfologia ovalada e tamanho reduzido, sem motilidade, similar às formas amastigotas. Não foi notada a presença de parasitas com flagelo exteriorizado e com motilidade.

A cultura foi monitorada diariamente e, após quatro dias, foi possível observar parasitas apresentando motilidade e morfologia típica das formas promastigotas (corpo alongado e flagelo externo). Os promastigotas recuperados continuaram infectivos e foram capazes de infectar células THP-1, produzindo uma alta e consistente infecção (> 80%), com

número aumentado de parasitas intracelulares (média de 7 a 13 amastigotas/macrófago infectado), a qual foi comparável com a infecção observada na metodologia padrão (com promastigotas que não passaram pelo processo de recuperação).

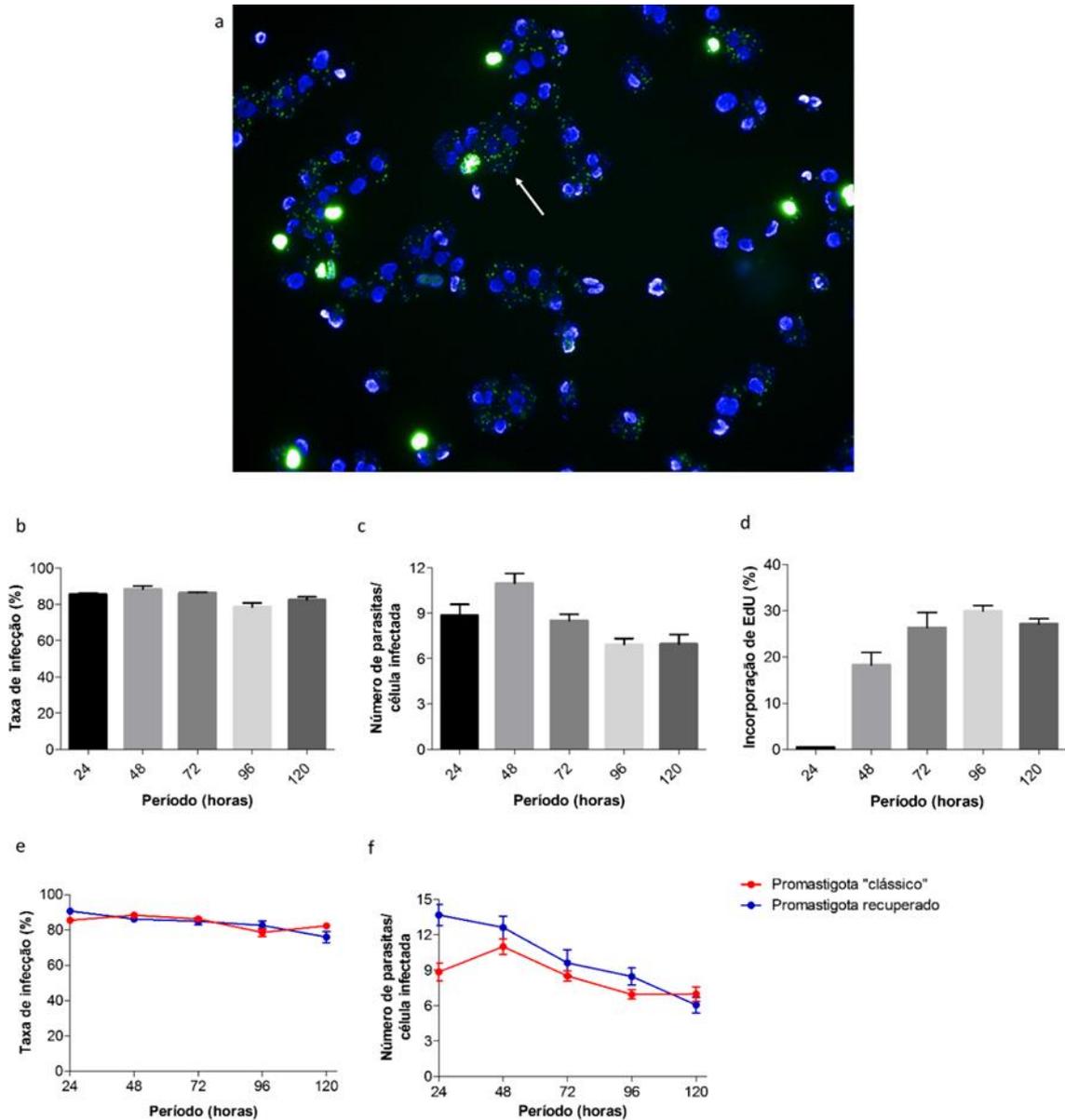


Figura 13. Validação do modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1. (a) Figura ilustrando as formas em replicação de amastigotas intracelulares de *Leishmania*, após 72 horas de infecção (48 h de incorporação de EdU). Núcleos do parasita e célula hospedeira estão mostrados em cor azul (Hoechst) e núcleos em replicação estão apresentados em cor verde (Alexa 488). A seta branca destaca amastigotas em replicação. O perfil de infecção foi avaliado quanto a taxa de infecção (b), número de parasitas intracelulares (c) e taxa de formas em replicação (d). Comparação do perfil de infecção produzido por promastigotas “clássicos”

(que não passaram pelo processo de recuperação) e promastigotas recuperados, considerando (E) taxa de infecção e (F) número de parasitas intracelulares. Gráficos apresentam dados de dois experimentos independentes.

4.13. Padronização e validação da aquisição de imagens e software de análise

Após 72 horas de infecção, placas foram fixadas, coradas e prosseguidas para leitura e análise através do microscópio automatizado Operetta. A **figura 14** ilustra a interface do software de aquisição e análise licenciado Harmony. Considerando a leitura das placas, os melhores parâmetros de aquisição foram estabelecidos, tais como: foco, filtro de excitação/emissão, tempo de aquisição, mapa da placa e número de imagens (campos) / poço (definido como o menor número de imagens que representava estatisticamente o poço como todo). A leitura de cada placa levou em média 50 minutos (1 placa = 384 poços e 4 imagens/poço).

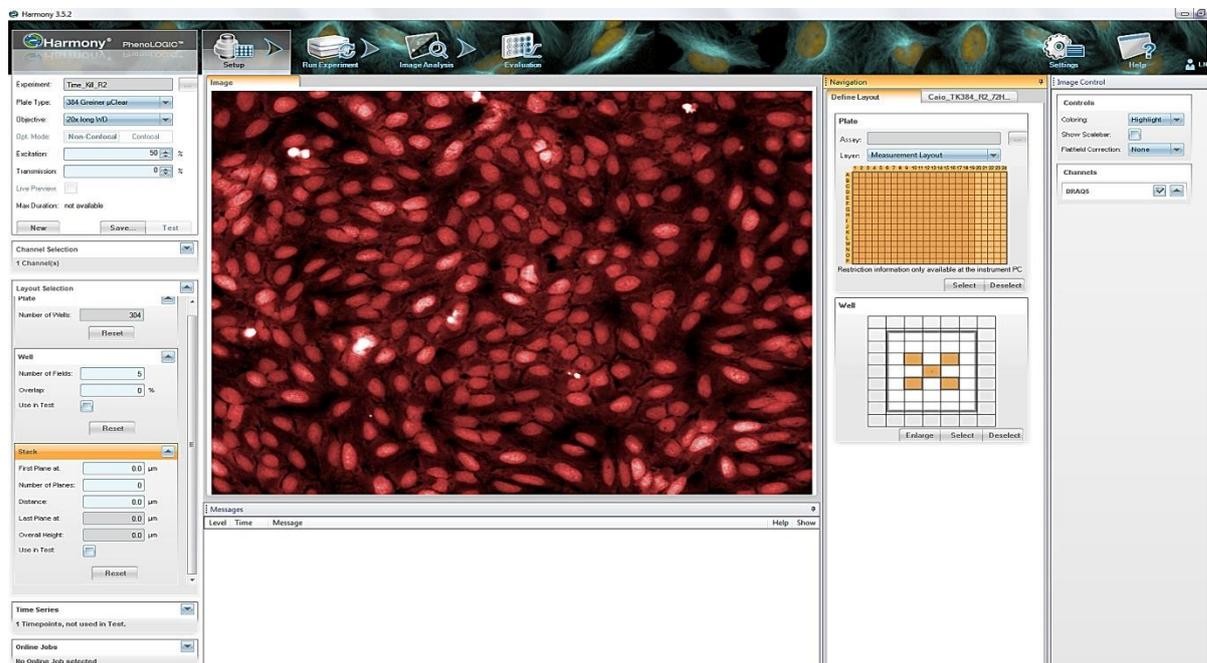


Figura 14. Interface do software comercial de análise Harmony (Perkim Elmer). Os parâmetros estabelecidos para leitura e aquisição das imagens foram: foco, filtro de excitação/emissão, tempo de aquisição, mapa da placa de ensaio e número de imagens/poço.

Após a aquisição, as imagens foram submetidas para a análise pelo software comercial Harmony®, o qual contém uma interface constituída de diversas etapas de processamento (denominados *building blocks*) que podem ser apropriadamente ajustadas considerando a necessidade do ensaio. Para as análises de alto conteúdo do modelo de infecção de *Leishmania*, o software foi adaptado para fornecer *readouts* específicos: número de células hospedeiras, número de células infectadas e número médio de parasitas/célula infectada. O fluxo da análise de imagens estabelecido compreende os seguintes passos (**figura 15**):

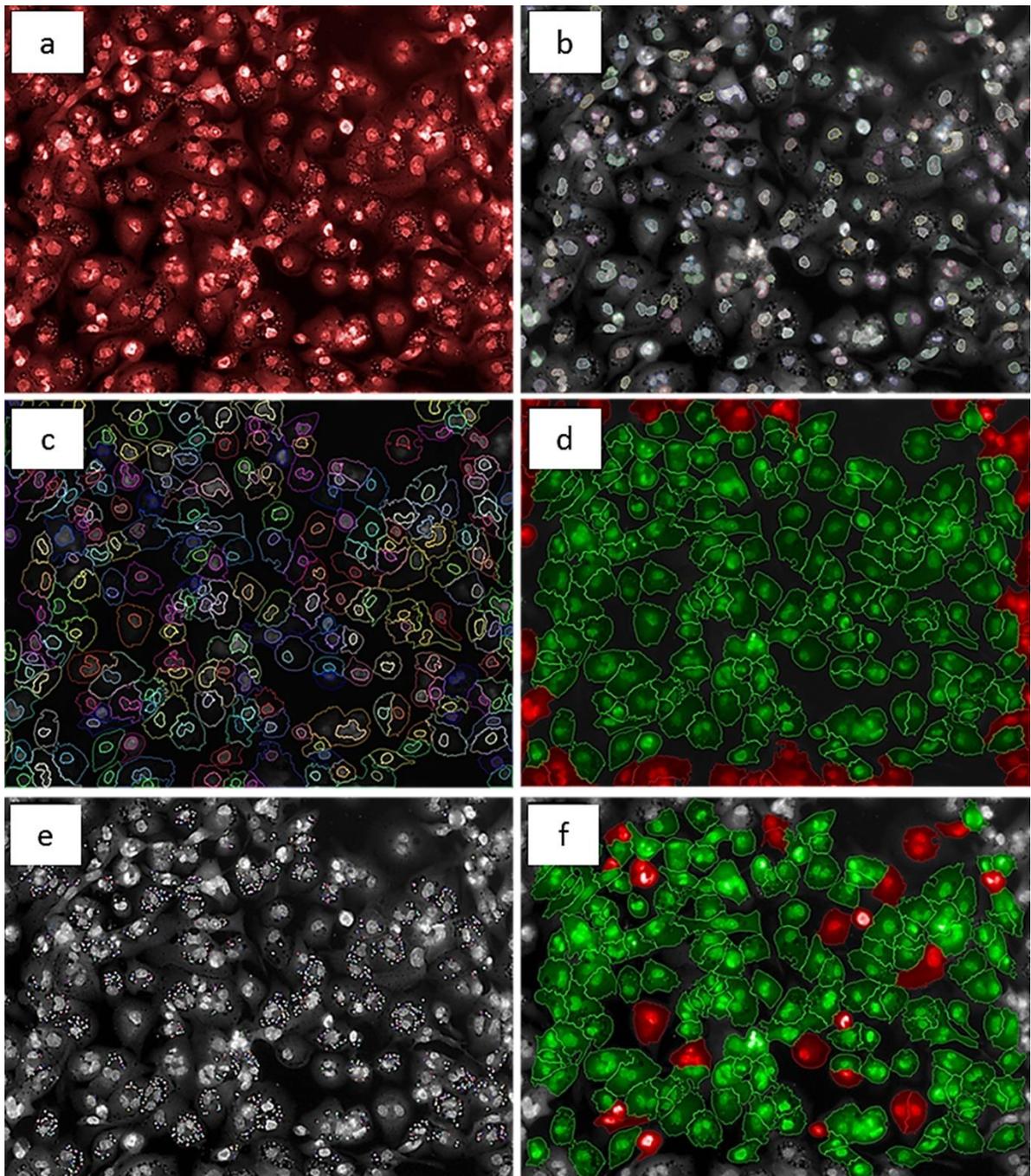


Figura 15. Imagem representativa das etapas do processamento de imagem através do software Harmony. Os passos do processamento seguem: (a) Imagem adquirida, (b) detecção do núcleo das células hospedeiras, (c) Delimitação do citoplasma de cada célula hospedeira, (d) Remoção das células da borda, que não possuem todo o citoplasma contido na imagem, (e) Detecção de spots – parasitas intracelulares e (f) Seleção das células infectadas do total de indivíduos.

- *Raw image* (**figura 15a**): representa a imagem original adquirida pelo Operetta. Parâmetros tais como tempo de exposição, excitação (intensidade da luz) e altura do plano focal foram precisamente determinados, com a finalidade de gerar imagens de alta qualidade para as análises subsequentes. Optamos pelo uso do corante Draq 5[®] (Biostat), pois com um único fluoróforo pudemos realizar a marcação de ambos os núcleos da célula hospedeira e parasita, com sinal de fluorescência relativamente alto, bem como a marcação da região citosólica em intensidade menor. Com isso, não houve a necessidade de uso de marcadores secundários para o citosol (Siqueira-Neto *et al.*, 2012).
- *Find nuclei* (**figura 15b**): responsável pela detecção, delimitação e quantificação dos núcleos das células hospedeiras na imagem. A detecção é baseada na diferença de intensidade do sinal de fluorescência da área do núcleo em comparação com as demais regiões da imagem. Com o objetivo de estabelecer o melhor método de detecção, foram testados quatro *scripts* disponíveis no software, ajustando as configurações (parâmetros) de análise e visualizando a detecção. Quando erros de detecção eram notados, outro script foi selecionado. Após escolha do método ideal (método B), nós realizamos um fino ajuste nos subníveis de configuração para aperfeiçoar a detecção, baseando-se em características de tamanho, espaçamento entre células, limites mínimos de intensidade de sinal e contraste;
- *Find cytoplasm* (**figura 15c**): atua na seleção e delimitação da área citoplasmática na imagem. O citoplasma da célula é detectado como a região marginal ao núcleo celular que possui sinal de intensidade superior ao sinal de fundo (*background*). Dentre os seis scripts disponíveis na plataforma, o uso do método B forneceu uma segmentação mais precisa dos citoplasmas individuais. O refinamento foi aplicado nesse passo de processamento para definir o limite de detecção de intensidade;

- *Select population* (**figura 15d**): cria uma subpopulação a partir da população existente. A primeira seleção de população foi aplicada para remover as células presentes da borda da imagem, as quais não possuíam a totalidade da área citoplasmática no campo de imagem;
- *Find spots* (**figura 15e**): responsável pela detecção, seleção e contagem dos parasitas individuais no interior das células hospedeiras. Os *spots* são detectados como uma pequena região circular com área reduzida cuja elevada intensidade de sinal se destaca do sinal de fundo, dentro dos limites da região do citoplasma previamente definidas. Os spots representam o sinal do DNA marcado do parasito proveniente do núcleo e do cinetoplasto – indistinguíveis sob esta magnificação. Nesse passo, o método C, depois de ajustamento adequado, foi capaz de precisamente detectar parasitas individuais na imagem, sem identificar um número excessivo de falsos positivos (comumente gerados por diferenças naturais do contraste no citoplasma ou presença de detritos celulares). Nos níveis subsequentes de processamento, nós determinamos as propriedades dos *spots* para detecção: tamanho (raio), contraste mínimo, intensidade e mínima distância entre dois pontos para serem considerados indivíduos diferentes. Todos os parâmetros foram estabelecidos por observação e a acurácia do método de detecção foi determinada por comparação com contagem manual. Para evitar possíveis falsos positivos na detecção de *spots*, imagens dos controles negativo e positivo foram usadas;
- *Select population II* (**figura 15f**): seleciona os indivíduos infectados existentes no campo de imagem. O uso do método “filtro por propriedades” foi adaptado para considerar como células infectadas aquelas que apresentassem número de *spots* ≥ 1 ;
- *Define results*: última etapa de processamento da imagem, onde foram definidos quais os resultados seriam explorados. O usuário tem a possibilidade de selecionar uma vasta série de *outputs*, tais quais as informações descritivas das etapas de análise bem como os dados quantitativos gerados a partir de fórmulas matemáticas. Nós estabelecemos os seguintes *outputs* quantitativos: número de células hospedeiras, número de células infectadas e número médio de *spots* por célula infectada. Esses resultados foram gerados para todas as imagens adquiridas em cada poço da placa. Os parâmetros definidos estão representados na tabela 2.

Para avaliar a sensibilidade do software de análise na detecção de parasitas individuais e quantificar as diferenças na carga parasitária entre os controles negativo (infectado), positivo (anfotericina a 10 μM) e poços não- infectados, células THP-1 foram infectadas com diferentes multiplicidades de infecção (do inglês, *multiplicity of infection* - MOI) de 10, 30 e 50 e, após 72 horas, a infecção e o número de parasitas intracelulares foram analisados. Células não infectadas apresentaram um sinal baixo de detecção (cerca de 10% de

taxa de infecção e 2 parasitas/célula infectada), indicando baixas taxas de falso-positivo (**figura 16a e 16b**). Além disso, a análise estabelecida se mostrou sensível ao identificar diferentes cargas parasitárias, como demonstrado pelos gráficos de taxa de infecção (**figura 16a**), número de parasitas intracelulares (**figura 16b**) e frequência (**figura 16c**).

Apesar do composto referência ser capaz de eliminar 100% da infecção na concentração de 10 μ M, como confirmado visualmente por inspeção de extensa quantidade de imagens, a detecção de *spots* nos controles tratados foi relativamente mais alta (~18%), do que nas células não-infectadas devido ao sinal projetado pelas bordas dos vacúolos citoplasmáticos. Em outras palavras, o composto referência foi eficaz na redução da infecção intracelular para níveis indetectáveis; no entanto, o tratamento com essa droga causou mudanças fenotípicas discretas nos macrófagos que foram detectadas como parasitas (falsos negativos). Por isso, os controles não-infectados foram usados para os cálculos de normalização e a fórmula do Z'-factor.

Tabela 2. Parâmetros da análise de alto conteúdo para processar imagens obtidas no modelo de *Leishmania*.

Building block	Objetivo	Parâmetro	Especificações	Configuração
<i>Find nuclei</i> (Método B)	Detecta o núcleo da célula hospedeira Conta a população total	<i>Common threshold</i>	Define o nível mínimo de intensidade de <i>pixel</i> para a área do núcleo	0,5
		Área	Ajusta o tamanho mínimo da área do núcleo	>60 μ m
		<i>Split factor</i>	Define se os objetos maiores serão divididos em dois ou mais objetos maiores	7,0
		<i>Individual threshold</i>	Determina a intensidade do limite de sinal para cada objeto	0,65
<i>Find cytoplasm</i> (Método A)	Segmentar individualmente a região celular	<i>Individual threshold</i>	Determina a intensidade do limite de sinal para cada objeto individualmente	0,15

Tabela 3. (Continuação)

<i>Select population I</i>	Exclui as células cuja área está fora dos limites da imagem	Filtros comuns	Remove os objetos à margem da imagem processada	-
<i>Find spots (Método C)</i>	Detecta os <i>spots</i> Quantifica os parasitas intracelulares	Raio	Ajusta o limite máximo do raio	$\leq 1,44$
		Contraste	Configura o limite mínimo para o contraste utilizado na detecção de <i>spots</i>	0,12 – 0,14
		<i>Uncorrected spot to region intensity</i>	Configura o limite inferior do <i>spot</i> em relação a intensidade da região	0,9 – 1,1
		Distância	Determina o limite mínimo para a distância entre <i>local máxima</i> de dois pontos adjacentes	0,9
		<i>Spot peak radius</i>	Define o raio da área sobre a qual o pico de intensidade do <i>spot</i> está integrado	0
<i>Select population II</i>	Detectar células infectadas na população total	Filtro por propriedade	Define como o <i>software</i> irá determinar se uma célula está ou não infectada	≥ 1
<i>Define results</i>	Fornecer os resultados multiparamétricos, configurados pelo usuário		Determina quais <i>outputs</i> serão gerados após a análise de imagens	

Nós optamos pelo MOI de 50 para os próximos experimentos de triagem pois o mesmo forneceu um perfil típico de infecção e produziu uma clara janela entre controles infectados e não-infectados. Além disso, a detecção de *spots* pelo software de análise não foi prejudicada. Apesar do MOI de 50 ser considerado relativamente alto comparado a outros dados publicados (Siqueira-Neto *et al.*, 2012), nenhum processo de enriquecimento/purificação das formas metacíclicas na cultura foi realizado

Visto que as bibliotecas de compostos/extratos são frequentemente diluídas em DMSO, foi investigada a concentração máxima do reagente tolerada pelo sistema biológico, a qual não interferiria na taxa de infecção e número de parasitas no interior da célula hospedeira (**figura 16d**). Células THP-1 infectadas com *Leishmania* foram expostas a diferentes concentrações de DMSO (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%) e a infecção foi avaliada após 48 horas de exposição. Foi possível observar que mesmo baixas concentrações de DMSO, como 0,25 e 0,5%, afetaram as taxas de infecção. Enquanto que as culturas tratadas com PBS apresentaram uma taxa de infecção de cerca de 85%, todas as concentrações testadas de DMSO exibiram taxas de infecções menores, as quais foram proporcionais a concentração do reagente. Contudo, como não é possível realizar campanhas de triagem sem a presença de DMSO (uma vez que os compostos de bibliotecas são, frequentemente, diluídos neste veículo), optou-se por realizar as triagens empregando a concentração de DMSO de 0,5%, pois, apesar do efeito redutor, ainda gerou altos níveis de infecção, bem como é compatível com os processos de pipetagem disponíveis em nosso laboratório.

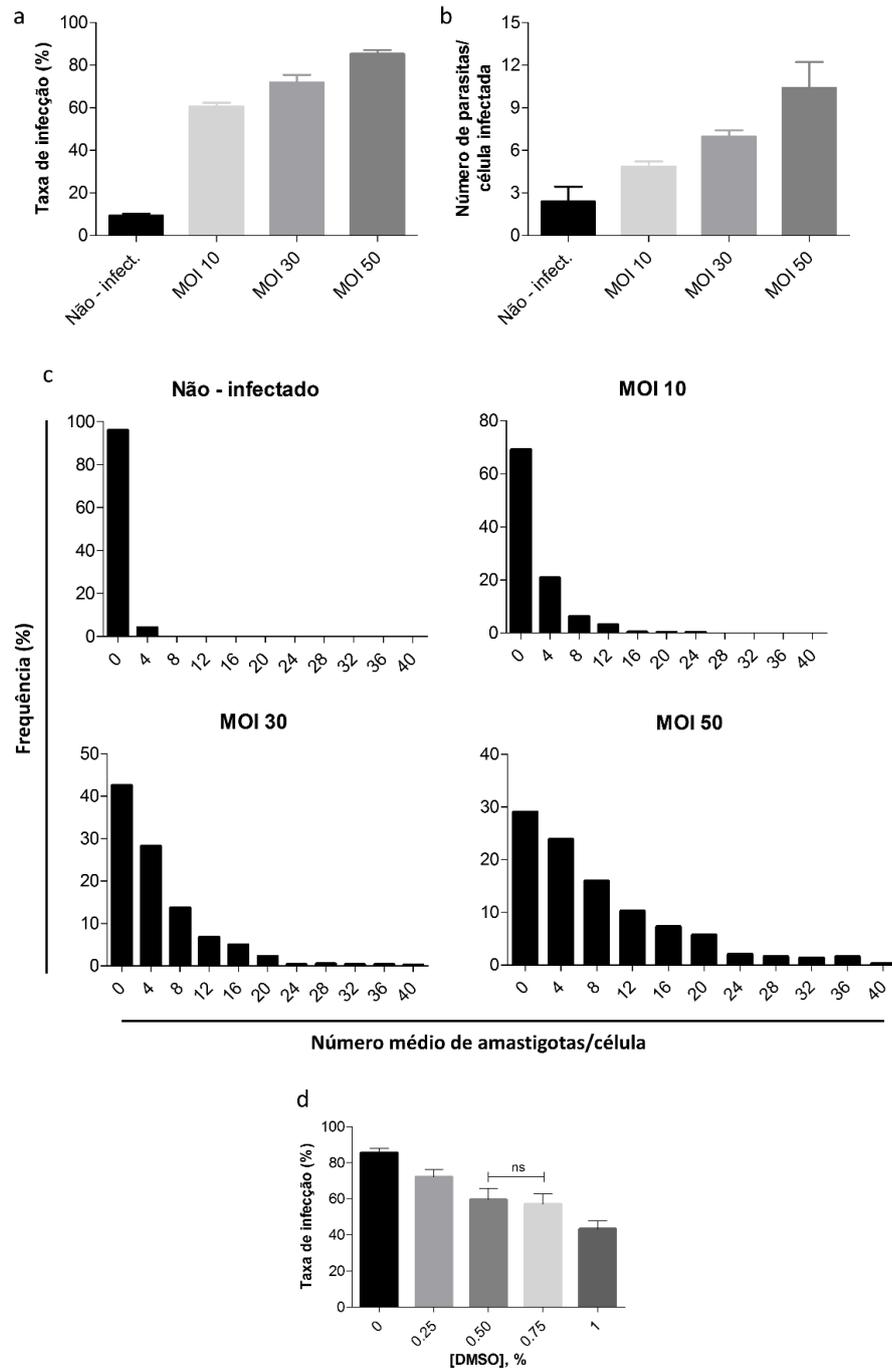


Figura 16. Avaliação da sensibilidade de análise pelo software de processamento Harmony. (a) Taxa de infecção e (b) número de parasitas intracelulares, após 72 horas de infecção, considerando diferentes MOIs: 10, 30 e 50. $n=3$ (60 poços/dia). (c) Histogramas indicando a distribuição do número médio de amastigotas intracelulares (bin size =4) para: células não-infectadas, MOI 10, 30 e 50. Os gráficos representam dados de 500 células para cada condição (referente a 5 poços), os quais foram escolhidos randomicamente. (d) Efeito da concentração de DMSO na taxa de infecção por *Leishmania*. Após 24 horas de infecção, o reagente foi adicionado e placas foram incubadas por 48 horas. $n=3$ (64 poços/dia).

Para validação do método desenvolvido, um painel de drogas referência foi testado contra o modelo biológico. Células infectadas com *L.infantum* MHOM/BR/1972/BH046 foram tratadas com as drogas e, após 48 horas, a atividade do composto foi avaliada. As curvas dose-resposta, bem como os valores de EC_{50} estão apresentados na **figura 17**. Anfotericina B e Miltefosina foram capazes de reduzir a infecção de modo concentração-dependente e apresentaram valores de eficácia e potência comparáveis com os reportados na literatura (Vermeersch *et al.*, 2009; Siqueira-Neto *et al.*, 2012). Já o composto Pentamidina apresentou uma atividade bastante inferior quando comparada aquelas obtidas para as outras drogas referência; nesse caso, observamos uma atividade máxima de aproximadamente 40% de inibição da infecção.

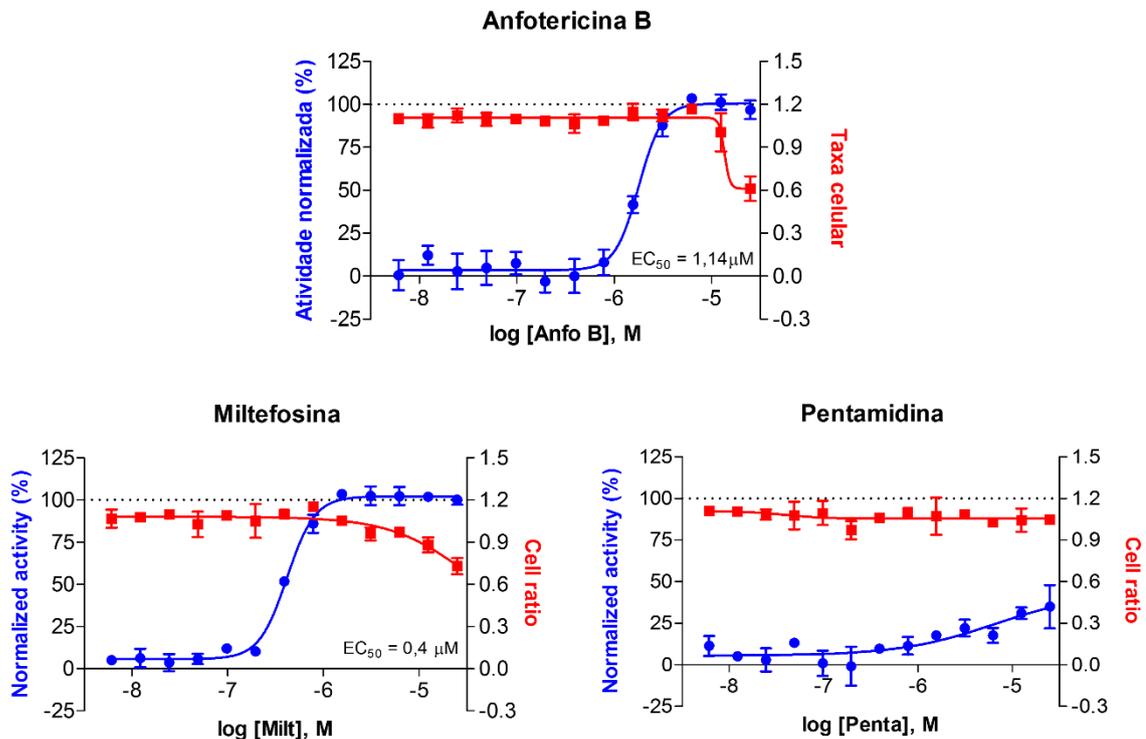


Figura 17. Curvas de dose-resposta para compostos referência contra o modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção). Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (Graphpad Prism). Gráficos representam a atividade normalizada (azul) e taxa celular (vermelho). As imagens representam os dados de três experimentos independentes.

4.14. Validação do ensaio baseado em imagem para triagem de compostos contra *Leishmania*

Para avaliar a consistência e reprodutibilidade do protocolo desenvolvido, ensaios de variabilidade inter e intra experimentos foram realizados. Duas placas/experimento foram preparadas contendo células não infectadas, células infectadas e tratadas com composto referência e células infectadas tratadas apenas com DMSO. A **figura 18** ilustra todas as placas feitas, na qual se pode observar uma alta e consistente infecção. Além disso, as placas apresentaram pequena variação inter e intra experimentos. Os controles dessas placas foram usados para calcular o Z'-factor (2 placas/experimento) e, em todos os dias de experimento, nós obtivemos valores superiores a 0,5 para a maioria das placas testadas. Por fim, nos determinamos curvas dose-resposta para o composto referência anfotericina B contra *Leishmania infantum*. O experimento foi repetido em 4 diferentes dias, considerando duas placas/dia. Anfotericina B a 10 μM inibiu 100% da infecção de células THP-1 por *L.infantum* e apresentou uma EC_{50} consistente e reprodutível.

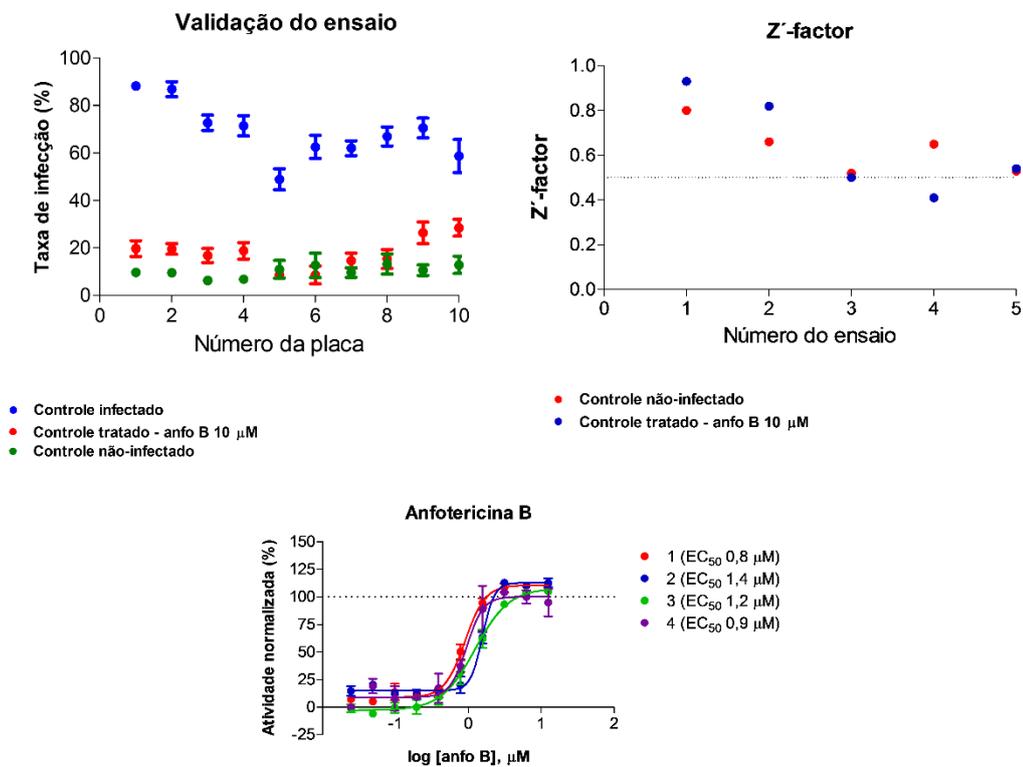


Figura 18. Validação do ensaio de alto conteúdo para parasitas intracelulares de *L. infantum*. Duas placas foram preparadas para cada dia de experimento (placas 1 e 2, no dia 1; placas 3 e 4, no dia 2; placas 5 e 6, no dia 3; placas 7 e 8, no dia 4 e placas 9 e 10, no dia

5). O gráfico superior esquerdo representa a taxa de infecção dos controles para os diferentes dias de ensaio. O gráfico superior direito indica a validação do parâmetro Z' -factor, gerado considerando controles não infectados (cor vermelha) ou células infectadas e tratadas com anfotericina B (cor azul) como controle positivo, e células infectadas e tratadas apenas com veículo (DMSO 0,5%) como controle negativo. O número do eixo "X" faz referência aos dias de ensaio. Cada ponto representa a média de duas placas. O gráfico inferior apresenta a curva dose-reposta para anfotericina B depois de 48 horas de exposição (72 horas de infecção) para células THP-1 infectadas com *L. infantum*. Atividade normalizada indica a inibição da infecção em relação aos controles. Os números das curvas indicam dias diferentes de experimento.

SECÃO II: Desenvolvimento de um painel de cepas viscerais de *Leishmania* para investigação do perfil de infecção e atividade de drogas referência

Espécies e cepas de *Leishmania* apresentam diversas diferenças bioquímicas e moleculares, as quais podem refletir em variações na sensibilidade às drogas e, conseqüentemente, levar a importantes implicações clínicas (revisado por Croft, Yardley & Kendrick, 2002). No entanto, em campanhas de triagens de alta escala, os ensaios são realizados especificamente para uma espécie (geralmente *L. donovani*) e a avaliação dos candidatos contra outras espécies/cepas é ignorado ou feita apenas nas fases mais avançadas do desenvolvimento. Portanto, se objetivamos identificar candidatos de amplo espectro, devemos considerar as variações genéticas e fenotípicas entre diferentes cepas/espécies no processo de descoberta de fármacos.

Por isso, baseado no protocolo estabelecido para *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046, o ensaio de HCS foi otimizado para outras cepas do complexo *Leishmania donovani*, com o objetivo de construir um painel de cepas da forma visceral da doença. As cepas escolhidas foram isoladas do Brasil, Índia e Sudão, para abranger diferentes regiões geográficas. Através do painel, seremos capazes de investigar possíveis diferenças no perfil de infecção para cada cepa, em termos de: tempo para estabelecimento da infecção, taxa de infecção, número de parasitas intracelulares e taxa de multiplicação dos amastigotas intracelulares. Além disso, poderemos avaliar o perfil de atividade de compostos candidatos contra cepas clinicamente relevantes, que poderia ser determinante para uma seleção apropriada

de compostos como *starting points* para a descoberta de fármacos e contribuir para o desenvolvimento de agentes anti-*Leishmania* de amplo espectro de atividade.

4.15. Padronização dos ensaios biológicos

Culturas das cepas estudadas foram descongeladas e, após três passagens (repiques), foram usadas para determinação da curva de crescimento (**figura 19**). Observando as curvas geradas, de modo geral, todas as cepas de *Leishmania* se adaptaram às condições estabelecidas previamente: meio de cultivo, temperatura e velocidade de rotação. No entanto, uma diferença sutil foi notada na taxa de crescimento celular da cepa *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8, uma vez que a mesma alcançou o pico de crescimento na densidade de $7,5 \times 10^7$ /mL. As outras cepas apresentaram pico de crescimento variável entre $3,0$ e $4,0 \times 10^7$ parasitas por mL de cultura. Quanto à dinâmica de crescimento, enquanto que a cepa de *L. infautm* MHOM/BR/2002/LPC-RPV apresentou um perfil mais lento, atingindo a fase logarítmica apenas no dia 3, os outros representantes atingiram a mesma fase já no dia 1 ou 2. A cepa de *L. infautm* MHOM/BR/2002/LPC-RPV ainda se manteve em fase exponencial até complementar o oitavo dia em cultivo, quando as outras culturas entraram em fase estacionária entre os dias 4 e 6. Além disso, vale salientar que parasitas de *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S apresentaram morte celular acentuada a partir do sexto dia em cultura, o que não foi notado para os outros representantes do grupo.

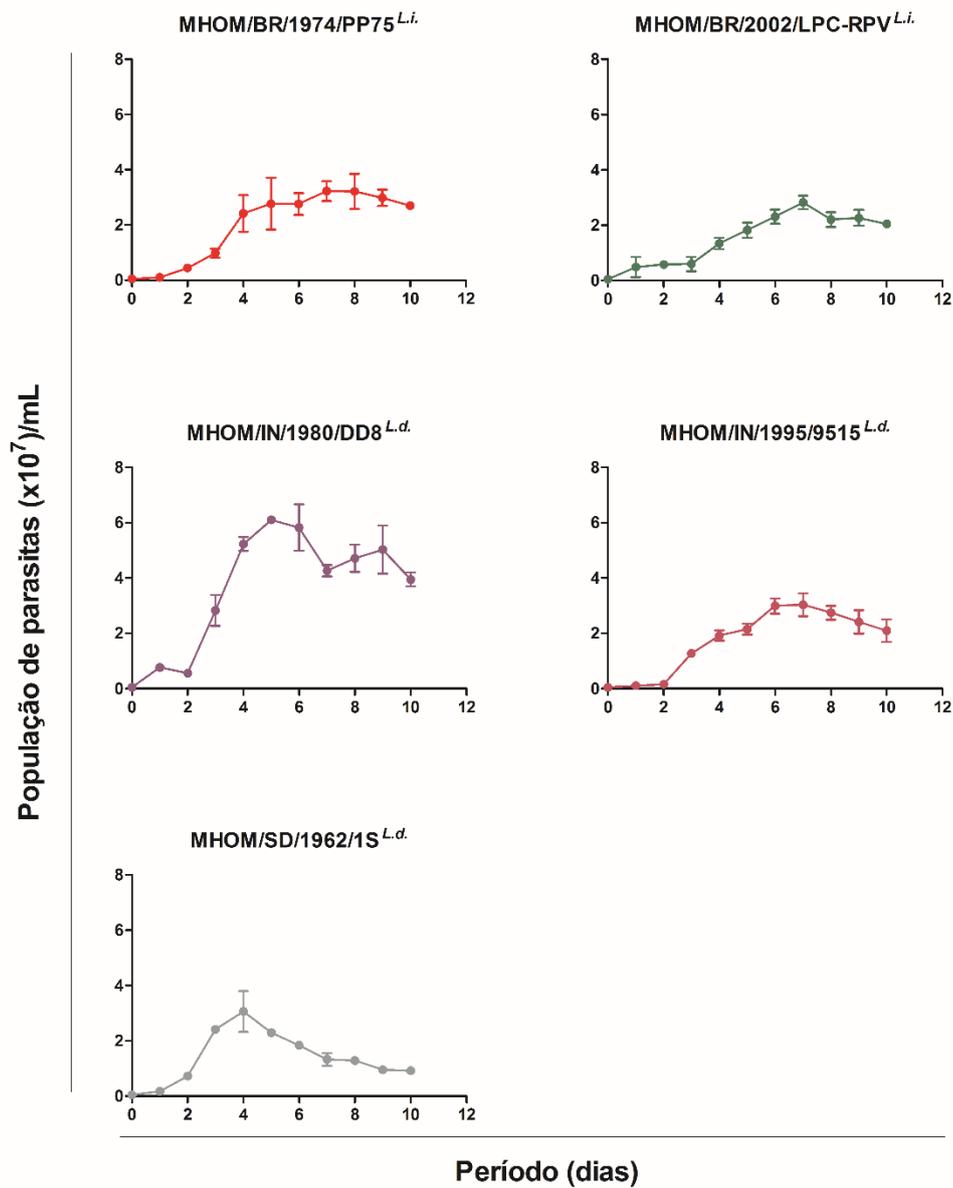


Figura 19. Curvas de crescimento celular para promastigotas das diferentes cepas de *Leishmania*. Após o descongelamento, promastigotas foram mantidos em frascos T75, em meio 199 a 26°C e sob rotação de 30 rpm. Parasitas em passagem 3 foram usados para a padronização da curva de crescimento. Promastigotas foram contados diariamente a partir da densidade inicial de $5,0 \times 10^5$ /mL, durante 10 dias. As curvas indicam a média (pontos) e o desvio padrão (barras) da contagem de parasitas para cada cepa. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*

Posteriormente, o curso de infecção de cada cepa foi investigado. Para isso, otimizações refinadas foram feitas no modelo biológico, sendo possível extrapolar as condições

pré-estabelecidas para *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 para as outras cepas estudadas, com exceção do período de cultura de promastigotas antes da infecção, o qual foi modificado para a cepa *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8. Nesse caso, promastigotas de 4 dias de cultura geraram infecções mais consistentes e com maior número de parasitas intracelulares. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania* e, após 24 horas, o ensaio foi monitorado por mais 120 horas, para avaliação da infecção no decorrer do tempo (**figura 20**). Todas as cepas estabelecidas foram capazes de gerar altas infecções (50% – 90%), as quais permaneceram consistentes durante todo o ensaio. Além disso, o número médio de parasitas intracelulares foi mantido ou passou por aumento no decorrer do tempo de ensaio. No entanto, a cepa *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75 apresentou maior número de amastigotas, principalmente a partir de 144 horas (cerca de 9 parasitas/célula infectada). Quanto ao efeito citotóxico da infecção nas células hospedeiras, a partir de 72 – 96 horas, houve uma queda no número de células do decorrer do ensaio; no entanto, essa diminuição não se apresentou cepa-dependente. Diferentes perfis de infecção para diferentes cepas de uma mesma espécie já foram descritas no trabalho de Zauli Nascimento *et al.*, 2009, que observou que diferentes isolados clínicos de *L. braziliensis* resultaram em taxas de infecções que variaram de 33 a 85% (Zauli-Nascimento *et al.*, 2009). Essa variação também foi reportada para cepas de *L. donovani*, as quais levaram a taxas infecções entre 42 e 80%, em macrófagos primários (da Luz *et al.*, 2009).

Além disso, as placas contendo células infectadas com as diferentes cepas de *Leishmania* foram monitoradas diariamente para observação da presença ou não de parasitas extracelulares (provavelmente, promastigotas) no decorrer do período de ensaio. Observou-se a presença de formas similares a promastigotas viáveis (corpo alongado, presença de flagelo e motilidade) para as cepas de *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75 e *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S, mesmo após 96 e 144 h de ensaio, respectivamente. Para as outras cepas estudadas, não notamos parasitas extracelulares na cultura a partir de 48 horas de infecção.

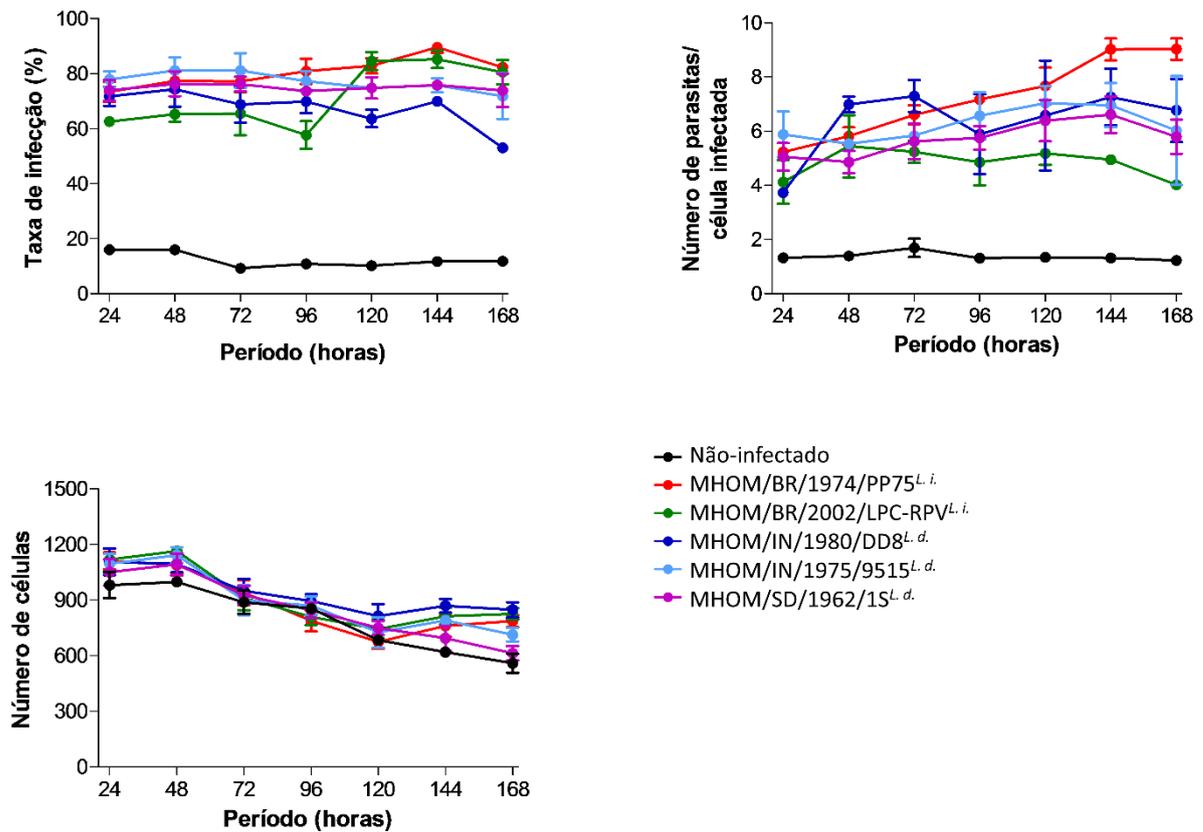


Figura 20. Perfil da infecção de cepas viscerais de *Leishmania* em células THP-1. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas de diferentes isolados de *Leishmania* e, após 24 horas, placas foram fixadas diariamente, durante 7 dias. Após esse período, imagens foram adquiridas e processadas pelo microscópio Operetta. O eixo “X” do gráfico, denominado Período (horas), indica o tempo após a infecção. Os pontos da curva referem-se a média dos dados de três experimentos independentes. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*

Imagens representativas das infecções estão apresentadas nos dois painéis abaixo: o primeiro painel demonstra as cepas de *L. infantum* (**figura 21**) e o segundo painel ilustra as cepas de *L. donovani* (**figura 22**).

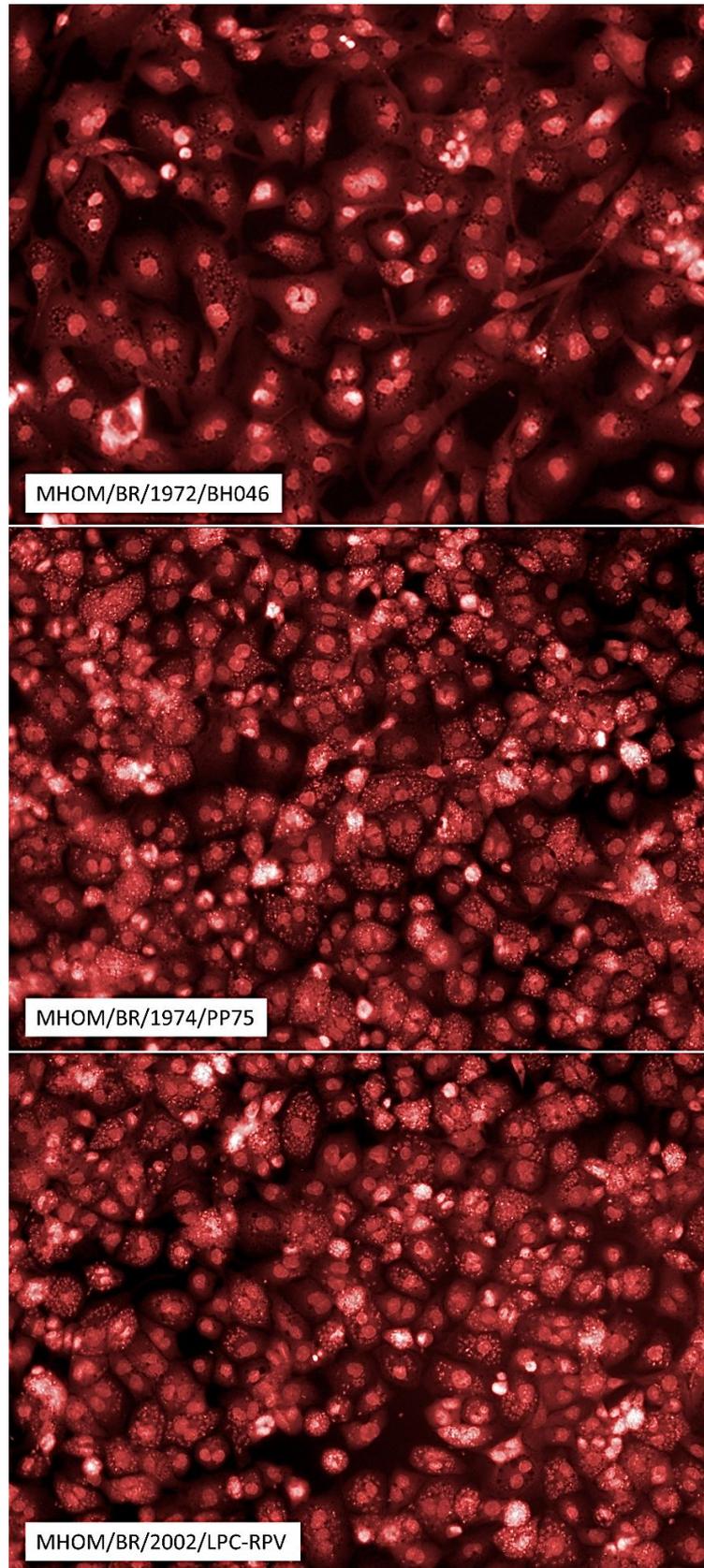


Figura 21. Pannel de imagens representativas para os modelos de infecção de cepas de *L.infantum*. Após 96 horas de infecção, placas foram fixadas com PFA 4% e coradas com Draq5. Imagens foram obtidas no sistema de high content Operetta. Magnificação: 20x.

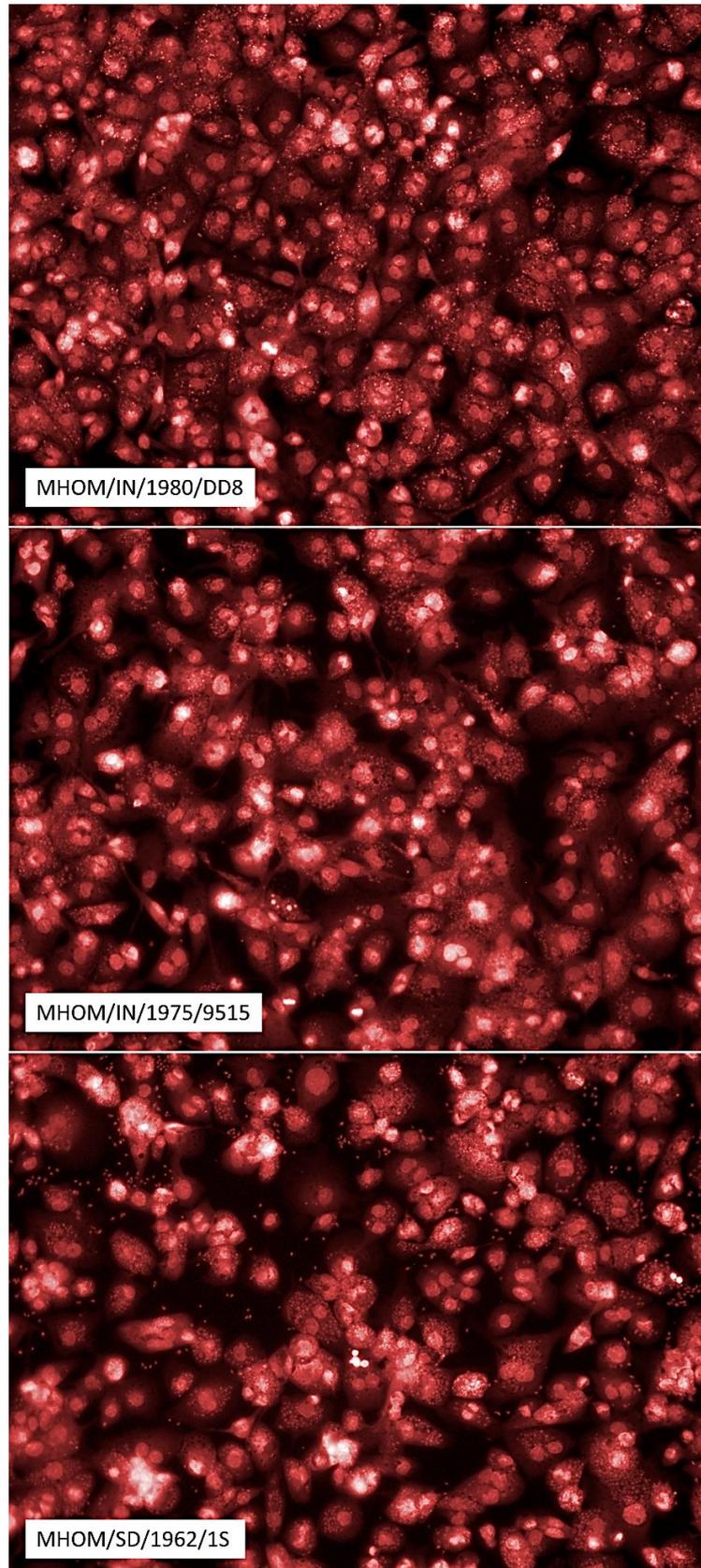


Figura 22. Painel de imagens representativas para os modelos de infecção de cepas de *L.donovani*. Após 96 horas de infecção, placas foram fixadas com PFA 4% e coradas com Draq5. Imagens foram obtidas no sistema de high content Operetta. Magnificação: 20x.

Como observamos um efeito prejudicial do DMSO nas infecções realizadas com a cepa *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 (**figura 16d**), nós investigamos o impacto do reagente no perfil da infecção dos outros isolados. Células infectadas com as diferentes cepas de *Leishmania* foram submetidas a concentrações de DMSO de 0,125; 0,5 e 1% e avaliadas para: taxa de infecção (**figura 23**), número de parasitas intracelulares (**figura 24**) e taxa de replicação celular dos amastigotas intracelulares (**figura 25**). Nesse caso, anterior à adição do DMSO e do reagente EdU, placas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitas extracelulares.

Considerando a infecção no decorrer do tempo, de modo geral, as cepas geraram infecções mais altas nesse experimento, quando comparado a outros dias de ensaios. Isso pode ter ocorrido pela natural variação de infecção em dias diferentes de experimento ou pelo fato de que, nesse dia de ensaio, evitamos o uso de poços das bordas das placas, nos quais a infecção é reduzida (um tipo do chamado “efeito de borda”). Além disso, para esse experimento especificamente, utilizamos o corante Hoescht para contagem dos núcleos das células e parasitas, como sugerido pelo fabricante do kit, o que pode ter acarretado em uma melhor sensibilidade do software de análise na detecção de *spots* intracelulares.

Para todas as cepas estudadas, observamos sutis flutuações na taxa de infecção (entre 70 e 90%), as quais foram independentes das concentrações de DMSO testadas (**figura 23**). Quanto ao número de parasitas intracelulares (**figura 24**), considerando os poços expostos a PBS, três padrões foram observados: (i) o número se manteve nas primeiras horas de infecção, apresentando aumento após 96 horas de infecção (*L. donovani* MHOM/IN/1995/9515); (ii) o número passou por aumento nas primeiras horas de infecção, mantendo-se com pequenas flutuações após 48 horas (*L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV, *L. donovani* MHOM/IN/1974/DD8 e *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S) e (iii) o número de amastigotas apresentou aumento contínuo no decorrer do ensaio (*L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75). Além disso, diferenças não foram observadas para as diferentes concentrações de DMSO testadas, para as cepas estudadas.

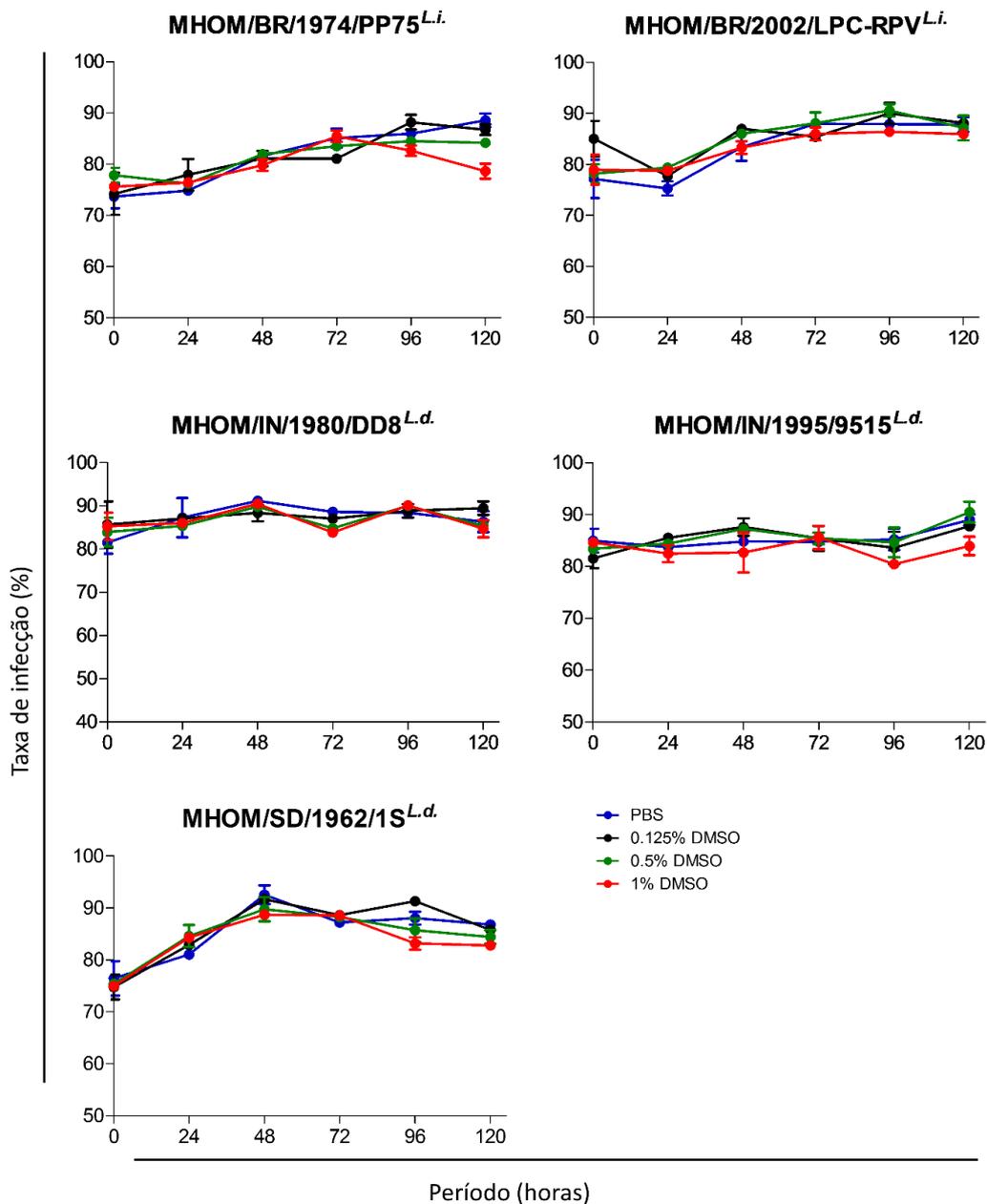


Figura 23. Efeito de diferentes concentrações de DMSO na taxa de infecção de *Leishmania* em células THP-1. Após 24 horas de infecção das células THP-1 com promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania*, placas foram expostas a PBS ou DMSO nas concentrações de 0,125; 0,5 e 1,0%. A partir desse momento, placas foram fixadas diariamente, durante seis dias de ensaio. A taxa de infecção foi determinada com o software de análise Harmony. Dados da análise foram processados no software Graphpad Prism, para geração dos gráficos de taxa de infecção. O eixo x, denominado “Período (horas)” indica o tempo de exposição ao DMSO. Os pontos do gráfico representam a média de 5 poços preparados. Os dados representam o resultado de uma única replicata. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*.

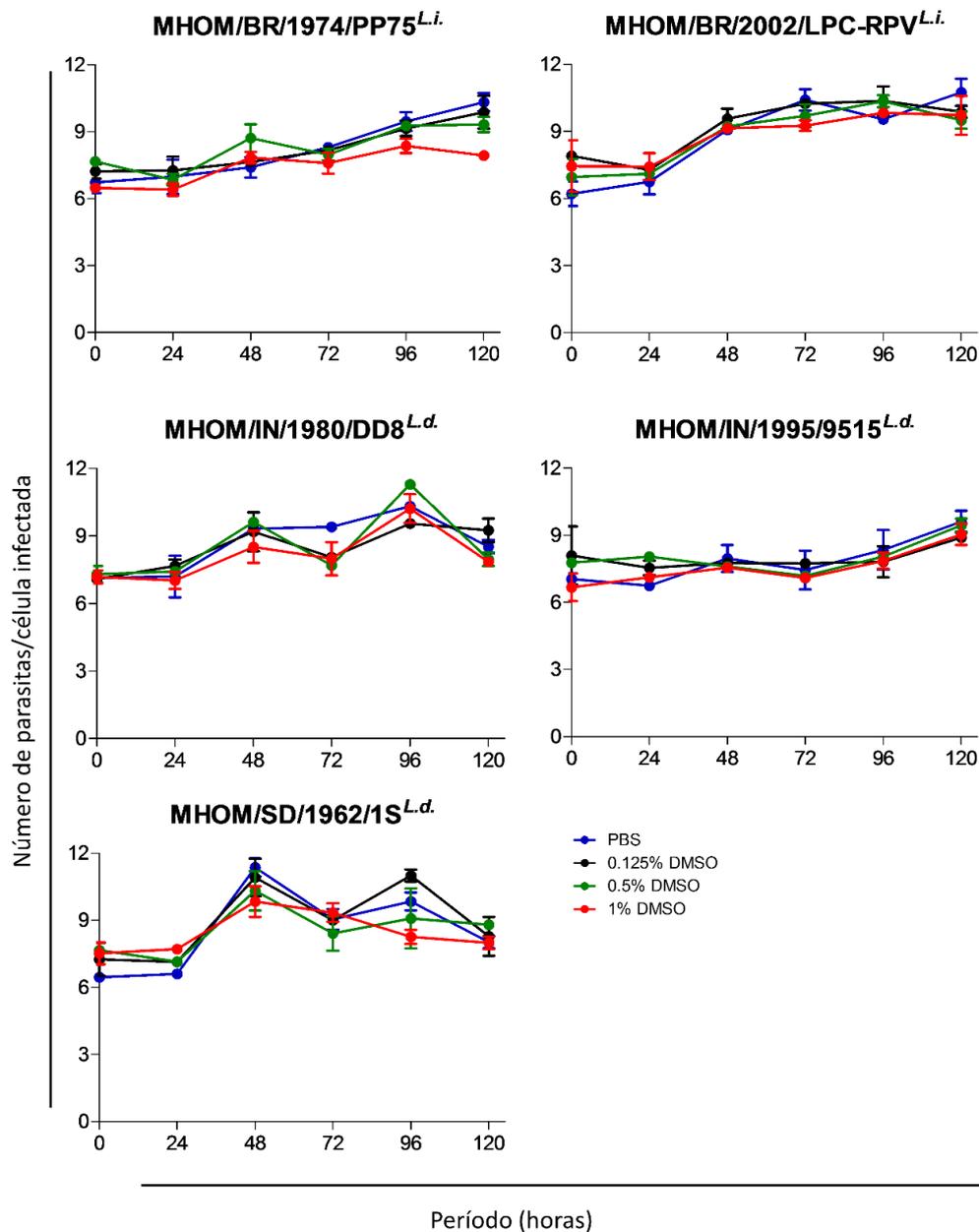


Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de DMSO no número de parasitas intracelulares de *Leishmania* em células THP-1. Após 24 horas de infecção das células THP-1 com promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania*, placas foram expostas a PBS ou DMSO nas concentrações de 0,125; 0,5 e 1,0%. A partir desse momento, placas foram fixadas diariamente, durante seis dias de ensaio. O número de amastigotas intracelulares foi determinado com o software de análise Harmony. Dados da análise foram processados no software Graphpad Prism, para geração dos gráficos. O eixo x, denominado “Período (horas)” indica o tempo de exposição ao DMSO. Os pontos do gráfico representam a média de 5 poços preparados. Os dados representam o resultado de uma única replicata. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*

Quanto à taxa de replicação dos amastigotas intracelulares (**figura 25**), o reagente EdU foi utilizado para monitoramento das formas em multiplicação. Após 24 horas de infecção, culturas foram lavadas com PBS, para remoção dos parasitas extracelulares residuais, e meio fresco contendo PMA 25 ng/mL e o análogo de timidina foi adicionado às placas. Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos do reagente para os parasitas ou células hospedeiras, culturas infectadas foram mantidas em paralelo na ausência de EdU. Nenhuma diferença no número de células, taxa de infecção e número de parasitas intracelulares foi notada entre as duas condições (dados não mostrados).

Para todas as cepas testadas, a incorporação do análogo EdU em culturas expostas a PBS somente foi observada nos primeiros períodos da infecção, sendo que o pico de incorporação de reagente se deu aproximadamente após 48 ou 72 horas de adição do reagente (72 ou 96 horas de infecção). A taxa de replicação máxima observada se apresentou cepa-dependente, variando entre 18%, para *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75, e 39%, para *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV. Além disso, o reagente DMSO não interferiu na taxa de multiplicação dos parasitas dos modelos estudados. A tolerância ao DMSO é frequentemente discutida em trabalhos de padronização e otimização de ensaios celulares, como já demonstrado para modelos de *Leishmania* (De Rycker *et al.*, 2013) e *T. cruzi* (Sykes & Avery, 2015). A tolerância ao DMSO, bem como a concentração do reagente nos ensaios, tem implicações importantes nas triagens de bibliotecas, sendo fator importante na definição, por exemplo, da cepa utilizada ou do tempo de exposição aos compostos.

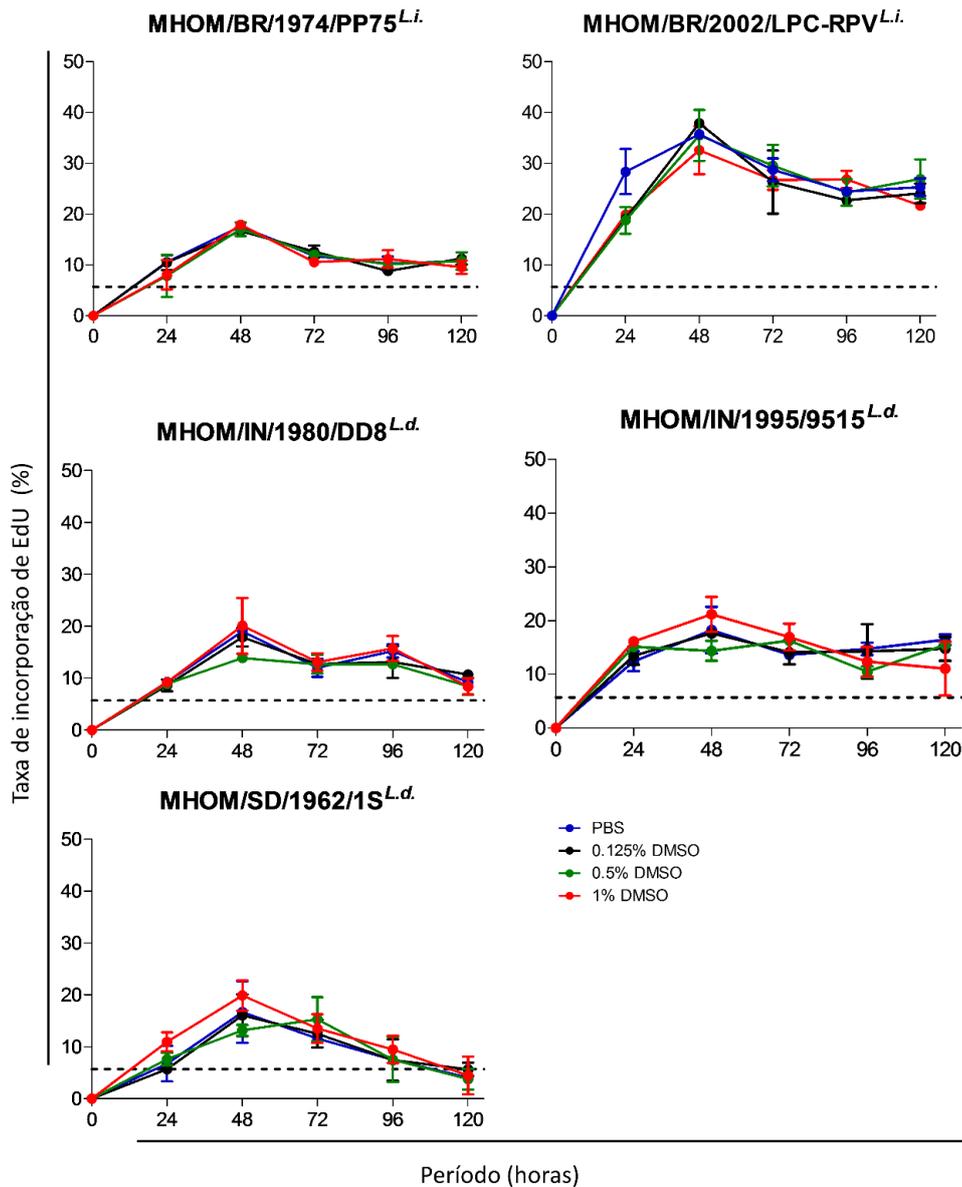


Figura 25. Avaliação da taxa de multiplicação celular de amastigotas intracelulares de *Leishmania* em células THP-1. Células THP-1 foram infectadas com promastigotas axênicos de *Leishmania* e, após 24 horas de infecção, DMSO e o reagente EdU foram adicionados ao sistema. A cada 24 horas, uma placa foi fixada e prosseguida para coloração com Hoescht e Alexa 488. Placas foram lidas do sistema de alto conteúdo Operetta e analisadas quanto ao número de parasitas com núcleo em replicação. Dados da análise foram processados no software Graphpad Prism, para geração dos gráficos de incorporação de reagente. Os pontos na curva referem-se a dados de dois experimentos independentes. A linha pontilhada nos gráficos indica a taxa de incorporação nos controles não infectados (falso positivo). O período refere-se ao tempo após a adição do reagente EdU e do DMSO. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*.

4.16. Validação do painel de cepas

Para validar o painel de cepas padronizado, os compostos referência anfotericina B e miltefosina foram testados. As células infectadas com as diferentes cepas *Leishmania* foram tratadas com as drogas e, após 96 horas de exposição, a atividade do composto foi avaliada. Em contraste ao modelo de *L.infantum* MHOM/BR/1972/BH046, no qual o composto referência anfotericina B foi capaz de eliminar 100% da infecção após 48 horas de exposição; para as outras cepas, um período de 96 horas foi necessário para o composto reduzir a infecção a níveis comparáveis aos controles não-infectados (cerca de 10% de taxa de infecção) (dados não mostrados).

Ambos os compostos foram capazes de reduzir significativamente a infecção em um dinamismo dose-dependente (**figura 26 e tabela 3**), sendo que levaram a uma máxima atividade próxima a 100%, para todas as cepas testadas. No entanto, enquanto a anfotericina B apresentou uma potência relativamente constante contra todas as cepas testadas, com valores de EC₅₀ entre 0,68 e 1,37 µM, a miltefosina mostrou potência dependente da cepa, sendo que os valores de EC₅₀ variam de 0,52 (*L. donovani* MHOM/SD/62/1S) para 7,60 µM (*L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75). A diferença de atividade da miltefosina entre espécies de *Leishmania* já foi observada em trabalhos previamente publicados, sendo que Escobar e colaboradores atribuíram esta variação de atividade a especificidades moleculares e bioquímicas em componentes de membrana celular, os quais variam de uma espécie para outra (Escobar *et al.* 2002). Além disso, foi evidenciado mudanças de resposta à miltefosina em 28 isolados clínicos de pacientes de diferentes regiões, onde parasitas de localidades altamente endêmicas apresentaram menor sensibilidade ao composto (Prajapati, Mehrotra, Gautam, Rai, & Sundar, 2012).

Por fim, pode-se observar que os valores de EC₅₀ e atividade máxima foram comparáveis com os encontrados na literatura. Para *L. donovani* já foram reportados valores de EC₅₀ de 0,3 µM para anfotericina e aproximadamente 3,0 µM para miltefosina, considerando diferentes trabalhos (Escobar *et al.* 2012; Siqueira-Neto *et al.*, 2012); enquanto que para *L. infantum*, os valores variaram em maior amplitude: para anfotericina, de 0,04 a 2,2 µM e, para miltefosina, de 2,7 a 4,4 µM (Morais-Teixeira *et al.*, 2011; Sesana *et al.*, 2011; Reimão *et al.*, 2014).

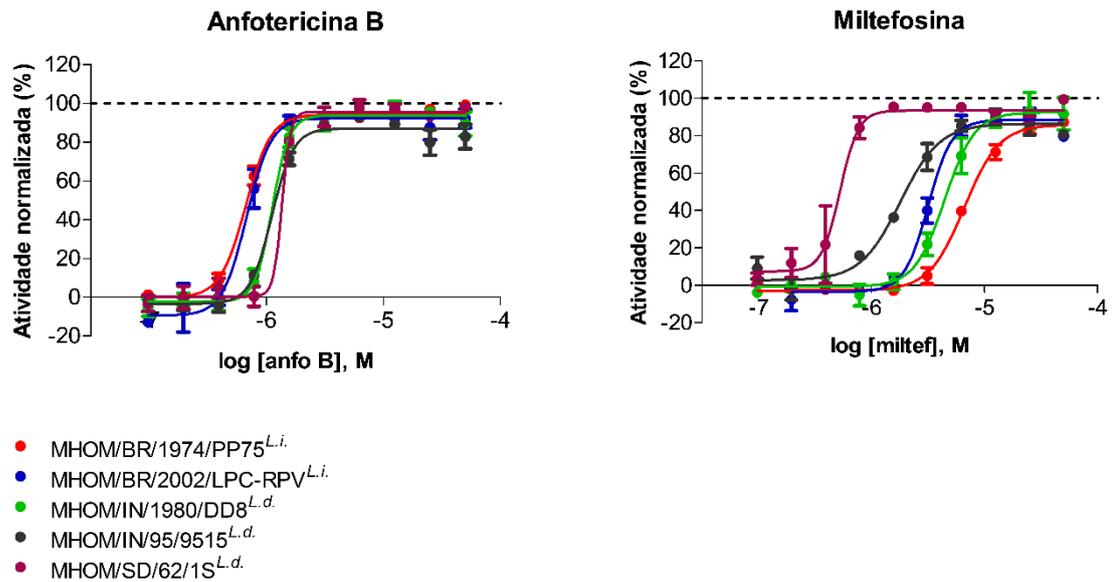


Figura 26. Curvas dose-resposta para compostos referência contra o modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1, após 96 horas de exposição às drogas (120 horas após infecção). Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (Graphpad Prism). Cada ponto no gráfico indica a média dos valores de atividade normalizada de pelo menos dois experimentos independentes. As cores indicam as diferentes cepas de *Leishmania*, como indicado na legenda da figura. ^{L.i.}: *L. infantum* e ^{L.d.}: *L. donovani*

Tabela 3. Atividade biológica dos compostos referência para as diferentes cepas de *Leishmania*.

Cepas	Anfotericina B			Miltefosina		
	EC ₅₀	I.S.	A.M.	EC ₅₀	I.S.	A.M.
MHOM/BR/1974/PP75	0,69	>72	99,2	7,60	>6	87,1
MHOM/BR/2002/ LPC -RPV	0,73	>68	95,6	3,40	>15	91,3
MHOM/IN/1980/DD8	1,15	>43	97,7	4,70	>11	93,2
MHOM/IN/1995/9515	1,20	>42	92,9	1,99	>25	90,4
MHOM/SD/1962/1S	1,37	>36	98,3	0,52	>96	99,3

Os valores de EC₅₀ estão representados em μ M. I.S.: índice de seletividade. A.M.: atividade máxima (%). O experimento foi realizado em, no mínimo, 2 replicatas.

4.17. Dinâmica de atividade para as drogas referência

Com a finalidade de melhor entender a diferença de ação dos compostos contra as diferentes cepas de *L. infantum* e *L. donovani*, avaliamos a dinâmica de eliminação de infecção pela anfotericina, miltefosina e o composto experimental VL-2098 (**figura 27, 28 e 29**). Células THP-1 infectadas com as diferentes cepas de *Leishmania* foram expostas a compostos previamente preparados em dose-reposta e, a partir desse momento, placas foram fixadas diariamente para determinação da taxa de infecção do modelo biológico em função do tempo.

Considerando a anfotericina B, comparando as diferentes cepas testadas, foi possível observar diferenças na dinâmica de eliminação e no tempo requerido para completa remoção de infecção (**figura 27**). A redução de infecção a níveis comparáveis aos controles não infectados se deu nas concentrações acima de 2,5 μM , após 96 horas de exposição, com exceção da cepa *L. donovani* MHOM/SD/62/1S, onde a total eliminação foi obtida em 72 horas. A menor concentração de 0,078 μM não apresentou efeito leishmanicida no decorrer do período de ensaio, como pode ser observado pela taxa de infecção comparável aos controles infectados. No entanto, para as cepas *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8 e *L. donovani* MHOM/IN/1995/9515, uma sutil redução de infecção, de 20 a 25%, aconteceu nas últimas 24 horas de ensaio.

Para as concentrações intermediárias (0,31 e 0,63 μM), a diferença nas dinâmicas de atividade do composto foi ainda mais evidente. Para as cepas *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75, *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8 e *L. donovani* MHOM/SD/62/1S, a concentração de 0,31 μM resultou em queda na taxa de infecção nas primeiras 48 ou 72 horas de exposição; enquanto que para as outras duas cepas testadas, a droga na mesma concentração não levou à redução da infecção. Já para a concentração de 0,63 μM , a anfotericina foi capaz de causar a redução da infecção, em uma dinâmica dependente da cepa e do tempo. Com exceção do modelo de *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75, no qual a concentração não foi capaz de eliminar totalmente a infecção, para as outras cepas observamos o fenômeno após 96 ou 120 horas.

Maes e colaboradores reportaram um período relativamente maior para a completa eliminação de parasitas intracelulares, em modelos de macrófagos primários infectados com amastigotas extraídos de baço de animais. Nesse trabalho, um período de 168h foi necessário para a redução da infecção a níveis indetectáveis, considerando a concentração de 16 μM (Maes *et al.*, 2016). No entanto, essa discrepância pode ter sido resultado dos diferentes modelos e cepas utilizados.

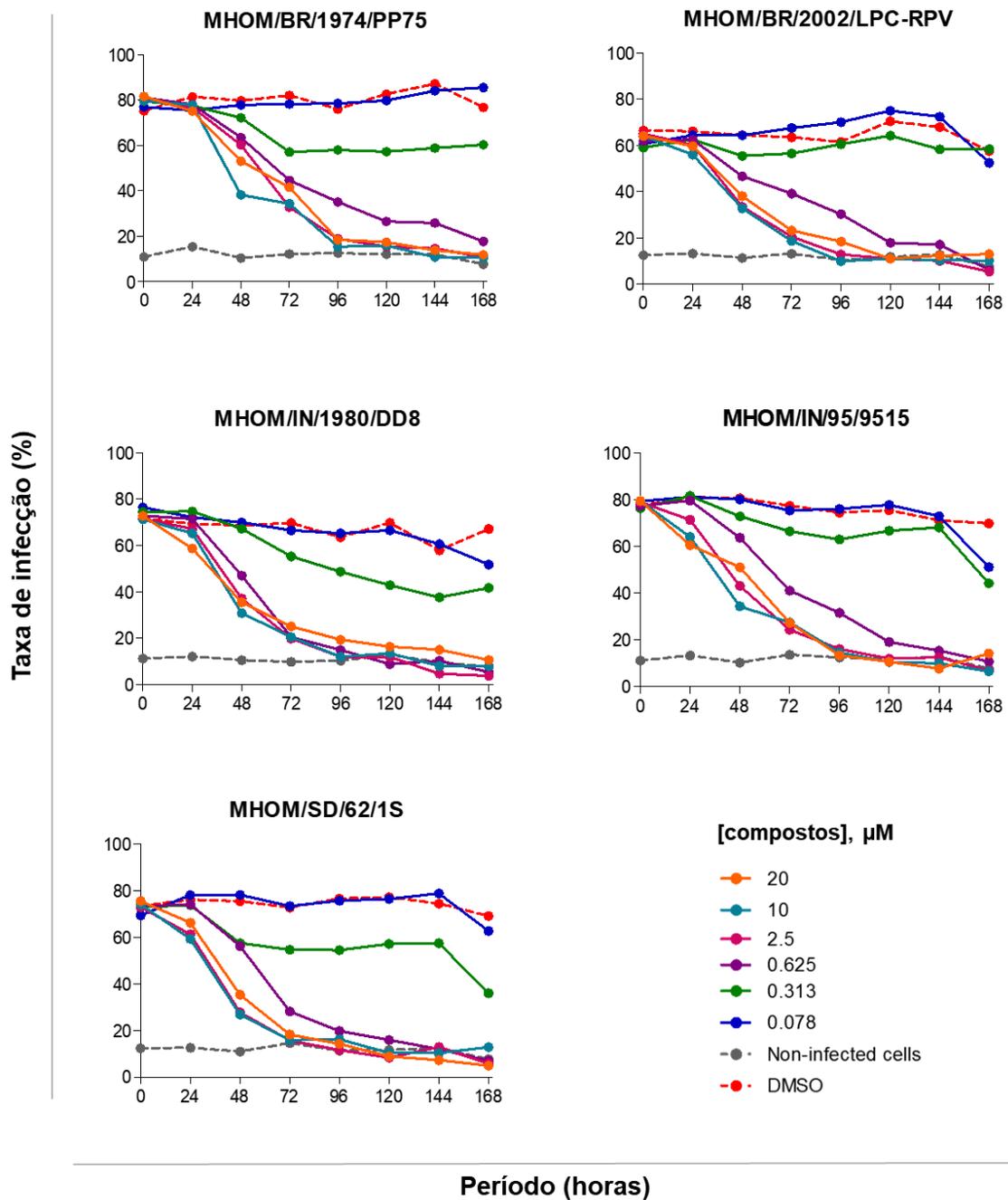


Figura 27. Dinâmica de atividade do composto anfotericina B para o modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1. Em cada gráfico: Eixo Y: taxa de infecção (%)/Eixo X: período de exposição às drogas (em horas). Células THP-1 infectadas com diferentes cepas de *Leishmania* foram expostas a concentrações de compostos, como indicado na legenda: 20 (laranja); 10 (azul claro); 2,5 (rosa); 0,625 (roxo); 0,313 (verde) e 0,078 (azul escuro) µM. Poços não infectados e infectados tratados com DMSO 0,5% foram usados como controles e estão indicados no gráfico por linhas pontilhadas (cores cinza e vermelho, respectivamente). Os pontos representam a média de, no mínimo, dois experimentos independentes.

Quanto à dinâmica de atividade da miltefosina (**figura 28**), o tempo necessário para completa eliminação da infecção, considerando a máxima concentração (20 μM), se apresentou cepa – dependente: 72 horas, para *L. donovani* MHOM/SD/62/1S; 96 horas para *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75 e *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8; 120 horas para *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC- RPV e *L. donovani* MHOM/IN/95/9515. Apenas as concentrações iguais ou acima de 2,5 μM levaram a uma redução da infecção a níveis comparáveis ao controle não infectado, para todas as cepas testadas.

As cepas de *L. donovani* apresentaram uma suscetibilidade sutilmente maior à miltefosina, como observado no perfil de atividade do composto nas concentrações intermediárias. Enquanto que para *L. infantum*, as concentrações de 0,31 e 0,63 μM não causaram ou causaram uma queda relativamente pequena na infecção; as mesmas concentrações levaram a uma redução significativa na infecção das cepas de *L. donovani*, apresentando até mesmo a total eliminação de parasitas intracelulares, como observado para *L. donovani* MHOM/IN/1995/9515 e *L. donovani* MHOM/SD/62/1S, expostas à concentração de 0,63 μM .

Considerando os dados já publicados na literatura, enquanto que o período necessário para total redução da infecção foi de 96 h para *L. infantum*, o mesmo obtido em nossos ensaios, para *L. donovani*, foi reportado um período relativamente maior de 144 h (Maes *et al.*, 2016).

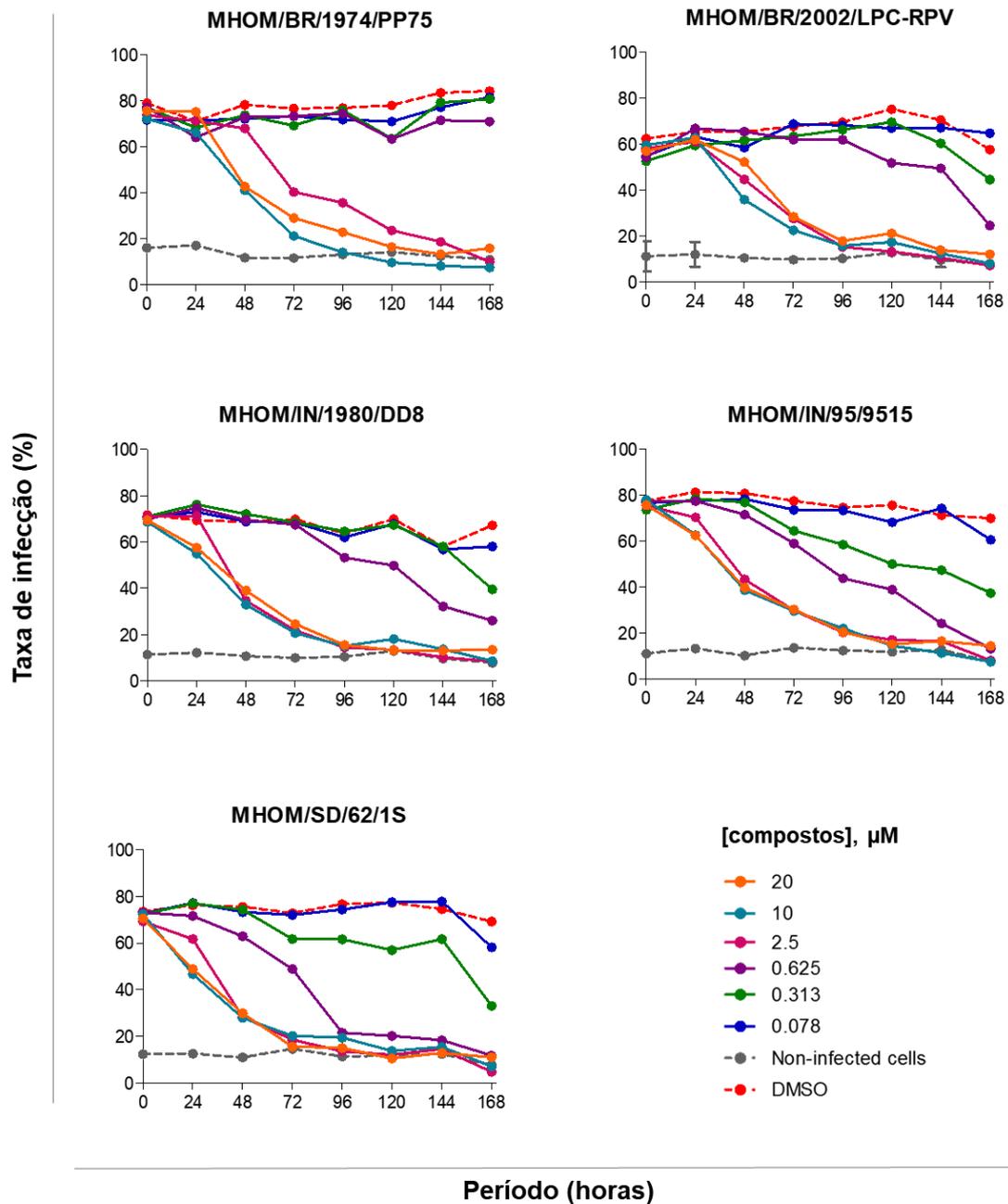


Figura 28. Dinâmica de atividade do composto miltefosina para o modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1. Em cada gráfico: Eixo Y: taxa de infecção (%)/Eixo X: período de exposição às drogas (em horas). Células THP-1 infectadas com diferentes cepas de *Leishmania* foram expostas a concentrações de compostos, como indicado na legenda: 20 (laranja); 10 (azul claro); 2,5 (rosa); 0,625 (roxo); 0,313 (verde) e 0,078 (azul escuro) μM . Poços não infectados e infectados tratados com DMSO 0,5% foram usados como controles e estão indicados no gráfico por linhas pontilhadas (cores cinza e vermelho, respectivamente). Os pontos representam a média de, no mínimo, dois experimentos independentes.

O nitromidazol VL-2098, um composto em fase experimental, vem se mostrando como um candidato interessante para tratamento de leishmaniose visceral, causada por *L. donovani*. O composto foi reportado como potente e seguro, bem como apresentou eficácia em modelos animais de hamster e camundongo, após administração oral (Gupta *et al.*, 2015). No entanto, pouco é conhecido sobre sua atividade contra cepas de *L. infantum* ou sua dinâmica de atividade em ensaios *in vitro*. Em nossos ensaios, podemos observar claramente o efeito leishmanicida do composto, uma vez que o mesmo foi capaz de reduzir a infecção para todas as cepas estudadas a níveis não detectáveis, após 96 ou 120 h (considerando *L. donovani* MHOM/IN/1995/9515) de exposição (**figura 29**).

Comparando-se com os perfis observados para anfotericina B e miltefosina, de maneira geral, o composto VL-2098 apresentou uma atividade concentração-dependente mais expressiva, uma vez que foi possível notar quedas gradativas da infecção para as diferentes concentrações. Entre as cepas estudadas, *L. donovani* MHOM/IN/1995/9515 e *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S apresentaram menor suscetibilidade ao composto, pois apenas as concentrações de 10 e 20 μM foram capazes de causar a redução na taxa de infecção a níveis comparáveis ao controle não infectado.

Quanto às menores concentrações, as concentrações de 0,078; 0,31 e 0,63 μM seguiram uma tendência de redução moderada da taxa de infecção em função do tempo para todas as cepas (redução de 30 a 50 pontos percentuais); com exceção da sutil redução observada para MHOM/BR/1974/PP75 (aproximadamente 15 pontos percentuais).

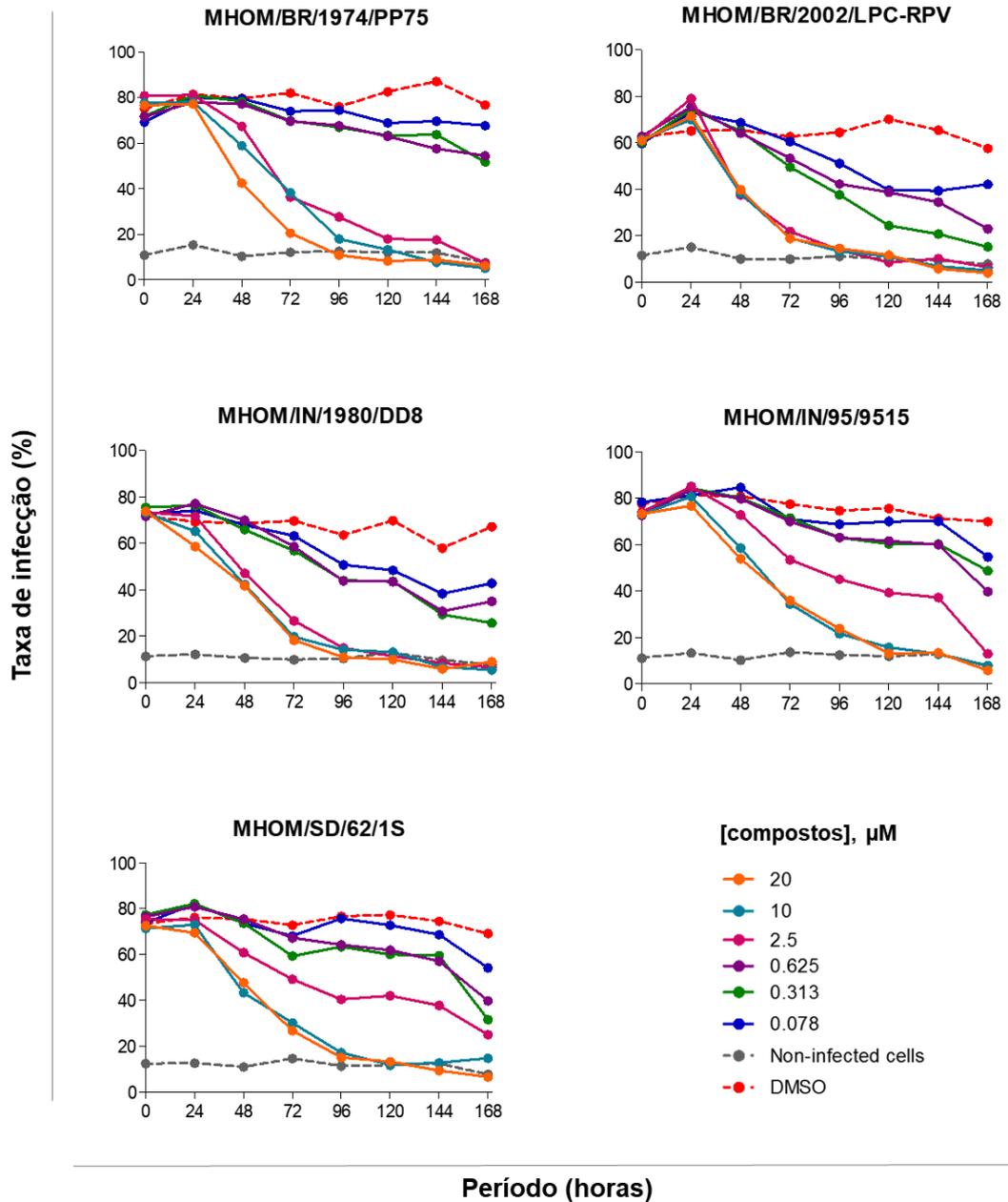


Figura 29. Dinâmica de atividade do composto experimental VL-2098 para o modelo de infecção de *Leishmania* em células THP-1. Em cada gráfico: Eixo Y: taxa de infecção (%)/Eixo X: período de exposição às drogas (em horas). Células THP-1 infectadas com diferentes cepas de *Leishmania* foram expostas a concentrações de compostos, como indicado na legenda: 20 (laranja); 10 (azul claro); 2,5 (rosa); 0,625 (roxo); 0,313 (verde) e 0,078 (azul escuro) μM . Poços não infectados e infectados tratados com DMSO 0,5% foram usados como controles e estão indicados no gráfico por linhas pontilhadas (cores cinza e vermelho, respectivamente). Os pontos representam a média de, no mínimo, dois experimentos independentes.

SEÇÃO III: Triagem das bibliotecas de compostos sintéticos e extratos naturais no modelo de amastigotas intracelulares de *Leishmania* em células THP-1

4.18. Triagem da biblioteca de compostos naturais Hypha's MycoDiverse™

Os produtos naturais tem sido amplamente utilizados como fonte de compostos para o desenvolvimento de fármacos, sendo que, pelo menos, 60% dos fármacos comercializados atualmente possuem direta ou indiretamente origem natural. Como exemplos, podemos citar: artemisina, utilizada como antimalárico; morfina, empregada em práticas clínicas como analgésico; penicilina, utilizada como antifúngico; lovastatina, aplicada no tratamento de índices elevados de colesterol, e paclitaxel, empregado como agente antitumoral (Harvey, Edrada-Ebel & Quinn, 2015; Harley, 2008). No campo do desenvolvimento de fármacos para leishmanioses, diversos extratos e compostos isolados de origem natural vem sendo explorados, como revisado por Singh e colaboradores (Singh *et al.*, 2014). No entanto, considerando os ensaios de *high throughput*, os mesmos ainda são baseados, normalmente, em bibliotecas de compostos químicos sintéticos, as quais são frequentemente limitadas na diversidade estrutural e ineditismo. Nesse contexto, os produtos naturais podem representar uma fonte alternativa de entidades químicas ainda inexploradas, com moléculas bioativas inéditas que podem ser usadas como modelo para síntese de novos fármacos.

A biblioteca *Hypha's MycoDiverse™* representa uma vasta fonte de extratos com diversidade química biológica, produzidos por uma coleção de mais de 2000 fungos. É constituída por duas séries: série A, que é composta por cerca de 10.000 amostras geradas por fermentação de fungos provenientes dos filos Ascomycota e Basidiomycota, e a série C, a qual compreende cerca de 1000 extratos produzidos por fermentação de fungos entomógenos. As cepas de fungos foram cultivadas em diversas condições (meios de cultura, temperatura, pH, entre outros), a fim de estimular a produção de metabólitos secundários bioativos.

Primeiramente, a biblioteca foi testada em uma única diluição (200x) contra parasitas intracelulares de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046. A biblioteca de extratos foi organizada em 34 placas de 384 poços e foram necessárias 5 corridas de experimento para cobrir toda a coleção de amostras (6 ou 7 placas/dia). Para cada dia de ensaio, mais 3 placas-controle foram preparadas: 2 placas contendo curvas dose-reposta de anfotericina B, para monitoramento de variações entre placas durante o ensaio (essas placas sempre são a primeira e última placas preparadas no dia de experimento) e 1 placa contendo células infectadas tratadas

com veículo (0,5% de DMSO), para avaliação da variabilidade da taxa de infecção e do número de células hospedeiras no interior de uma mesma placa. Amostras foram expostas por 48 horas ao modelo biológico de infecção. Como resultado, houve uma clara separação entre os controles infectados e não infectados, considerando os valores de taxa de infecção e número médio de parasitas intracelulares (**figura 30**). A média e o desvio padrão dos valores do Z'-factor para todas as placas da campanha foi de $0,63 \pm 0,09$ e a média e o desvio padrão de EC_{50} para a anfotericina B foi de $1,59 \pm 0,23 \mu\text{M}$, indicando alta confiança estatística e robustez do ensaio.

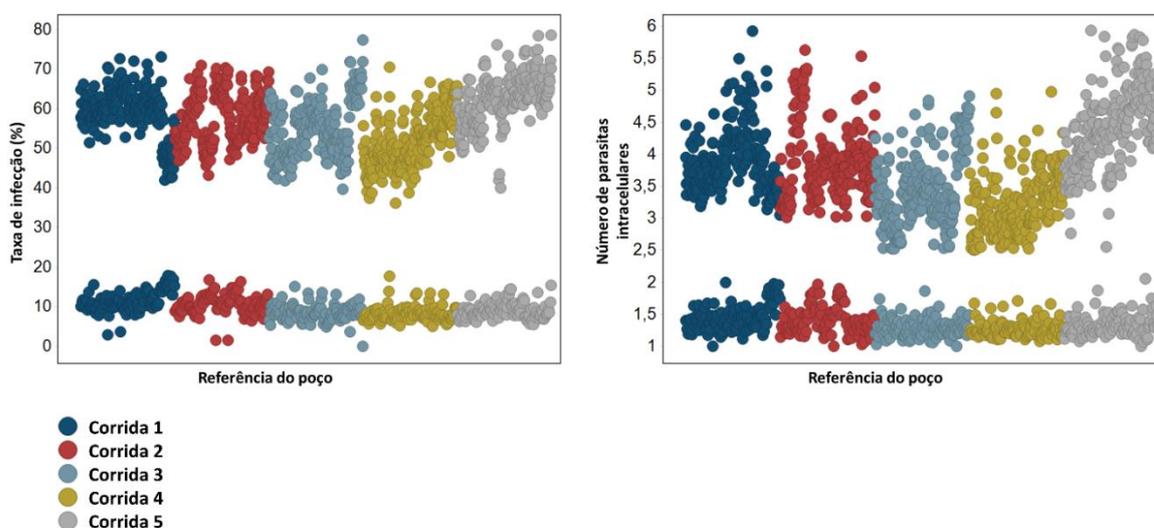


Figura 30. Distribuição dos controles infectados e não-infectados para a campanha de triagem da biblioteca Hypha's MycoDiverse™. Pontos no gráfico indicam a taxa de infecção (esquerda) e número médio de parasitas/ célula infectada (direita) para cada poço individual. As cores indicam as corridas em diferentes dias de experimento, como indicado na legenda. Os dados de taxa de infecção e número de parasitas intracelulares foram processados no software Spotfire.

Amostras com atividade antiparasitária $\geq 40\%$ e taxa celular ≥ 0.5 foram consideradas *hits* primários, totalizando 123 candidatos (taxa de *hits* de 1.1%) (**figura 31**). Como já esperado, a taxa de *hits* encontrada no modelo de *Leishmania* foi significativamente menor do que aquela obtida para outros tripanossomatídeos. Testando a mesma biblioteca contra os modelos de *T.cruzi* e *T.brucei* em nosso laboratório, alcançamos taxas de *hits* de 2,3 e 15%, respectivamente.

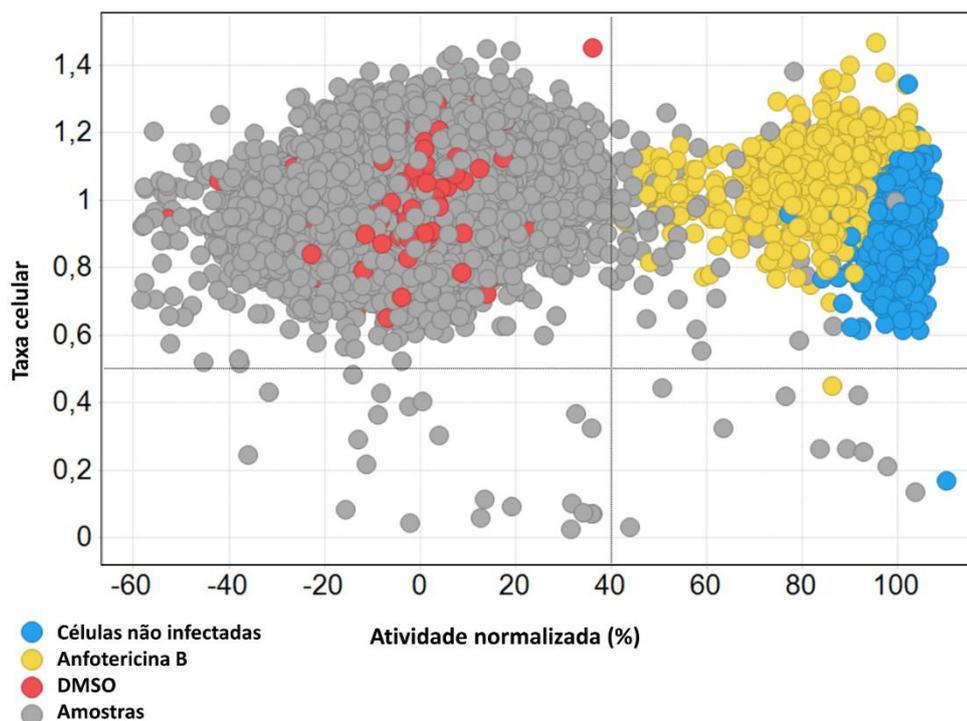


Figura 31. Triagem primária da biblioteca de extratos naturais Hypha's MycoDiverse™ contra o modelo de infecção de *L. infantum*. Os pontos representam a atividade normalizada (inibição da infecção em relação aos controles) e taxa de célula hospedeira para cada poço testado. As retas em cada eixo indicam o *cut-off* de seleção estabelecido para seleção de *hits*. Os compostos selecionados da triagem primária estão localizados no quadrante superior direito.

Os *hits* selecionados foram diretamente re-testados em curvas dose-resposta de 10 pontos de diluição (fator de diluição = 2). Para isso, os extratos foram localizados novamente nas placas estoque, através da coluna e linha correspondentes, e utilizados para a preparação de novas placas. No total, 4 placas foram preparadas, cada uma contendo, no máximo, 32 extratos. Assim como no *screening* primário, placas controle foram preparadas para avaliação de variabilidade entre poços de uma mesma placa e entre diferentes placas. Foi possível observar uma alta e consistente taxa de infecção entre as placas de ensaio, com média e desvio padrão de $56,0 \pm 2,3$. Além disso, todas as placas foram aprovadas em nosso controle de qualidade, apresentando valores de Z^2 - factor de $0,65 \pm 0,02$. As amostras que obtiveram a mesma atividade do ensaio primário, em ao menos um ponto da curva, foram consideradas confirmadas. Dessa forma, foi obtido um índice de confirmação de 74%, o qual foi

significativamente superior, comparado aos valores reportados para os ensaios (Annang *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2015).

Os *hits* confirmados foram então encaminhados para priorização, os quais seriam levados a etapas mais avançadas no *pipeline*. Para isso, foi realizada uma de-replicação dos *hits*, ou seja, extratos que produziram perfil parecido foram agrupados e aqueles com maior rendimento/atividade foram selecionados. Além disso, priorizou-se extratos proveniente de diferentes fungos. Das amostras confirmadas, 16 foram selecionadas para ensaios complementares de fracionamento primário bio-guiado, com o objetivo de identificar e eventualmente purificar o componente ativo dos extratos. As atividades biológicas dos extratos estão detalhadas na **tabela 4** e **figura 32**. Todas elas apresentaram alta eficiência, com valores de atividade máxima acima de 70%. Além disso, as amostras **3**, **5**, **9**, **11** e **14** tiveram alta potência, com fatores de diluição para EC₅₀ variando entre 0,0002 e 0,0004 (do estoque original). Nenhuma amostra apresentou citotoxicidade em células THP-1 para as diluições testadas.

Tabela 4. Atividade biológica dos extratos da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de *L. infantum*.

Extrato	EC₅₀*	Índice de seletividade	Atividade máxima (%)
Anfo B	1,6 µM	>12,5	99,8
1	0,0030	> 1,67	80,9
2	0,0024	> 2,05	88,8
3	0,0003	> 12,40	105,1
4	0,0006	> 7,81	89,3
5	0,0002	> 25,00	85,9
6	0,0013	> 3,73	94,9
7	0,0014	> 3,47	76,6
8	0,0028	> 1,79	75,0
9	0,0004	> 12,5	104,3
10	0,0030	> 1,64	72,4
11	0,0004	> 12,5	79,2
12	0,0008	> 5,88	86,9
13	0,0020	> 2,48	79,0
14	0,0002	> 25,00	90,9
15	0,0026	> 1,89	85,1
16	0,0007	> 7,46	85,1

Os valores de EC₅₀ estão representados como uma razão de diluição do estoque inicial do extrato.

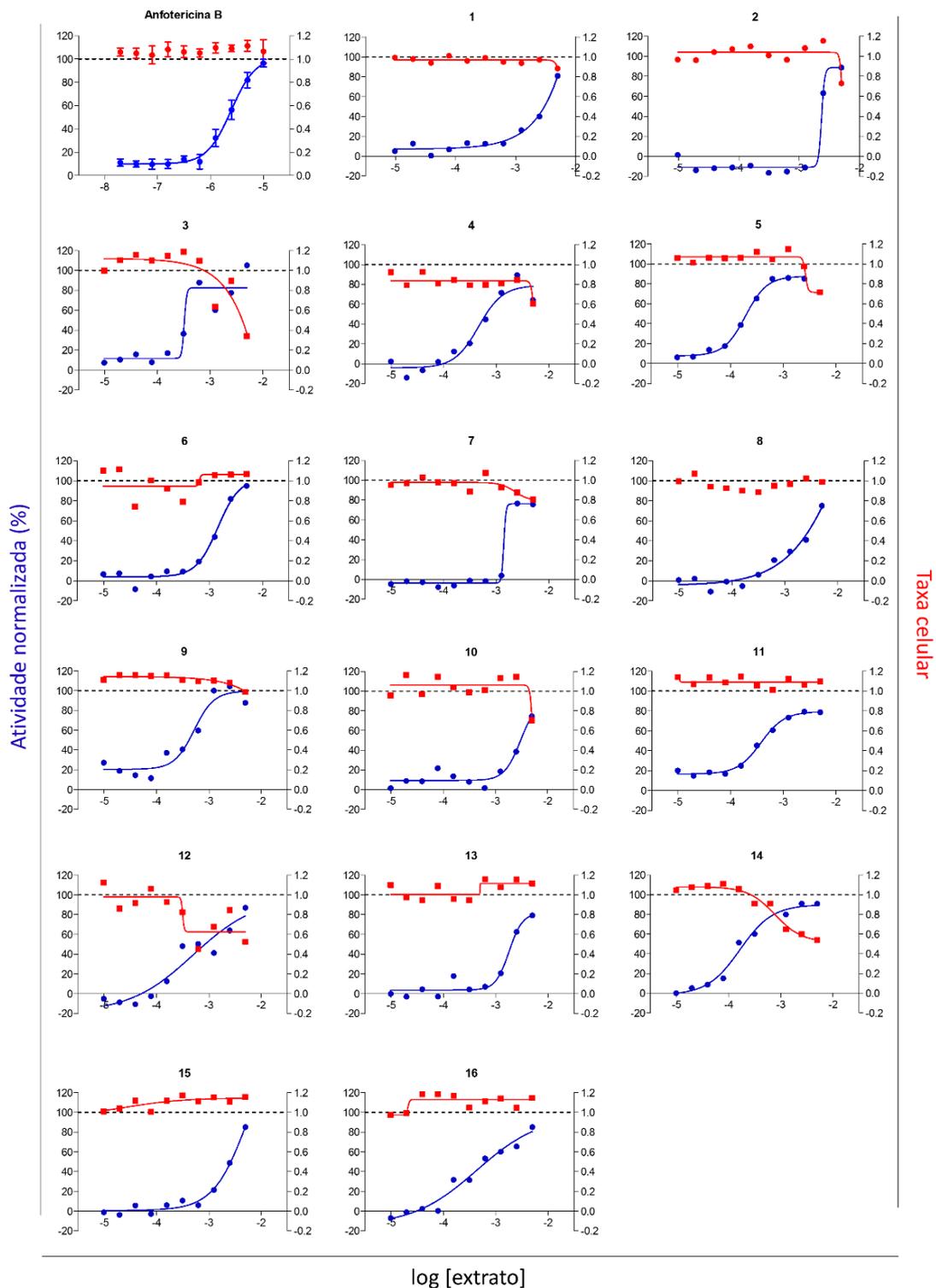


Figura 32. Curvas dose-resposta dos extratos da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de *L. infantum*, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção). Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (Graphpad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada (azul) e taxa celular (vermelho) em relação aos controles. Os resultados indicam dados de uma única replicata.

Os 16 extratos escolhidos passaram, então, pelo primeiro fracionamento bio-guiado, dando origem a 24 frações primárias/hit (essa fase do projeto foi realizada na empresa *Hypha Discovery*, Londres, Reino Unido). Nesse primeiro estágio, foi feita a re-extração do material de fermentação, previamente armazenado a -20°C , sendo que cada fração originada dos extratos foi, então, testada em três diluições: estoque original, diluição de 5x e diluição de 25x (na placa de ensaio: 200, 1000 e 5000x).

Como resultado dos ensaios biológicos contra o modelo de infecção por *Leishmania*, 13 extratos apresentaram pelo menos uma fração ativa contra o parasita, mesmo após o fracionamento da amostra. Todas as frações ativas foram então analisadas por HPLC de fase reversa e os dados avaliados para a presença de compostos já conhecidos e reportados na literatura ou para presença de compostos ativos similares identificados em outros extratos. Dessa forma, foram selecionadas frações primárias de 6 extratos: **1, 2, 4, 5, 6 e 9** (considerando a numeração da tabela 4), proveniente de diferentes fungos. O perfil de atividade das amostras prosseguidas para o fracionamento secundário está apresentado nos gráficos abaixo (**figura 33**).

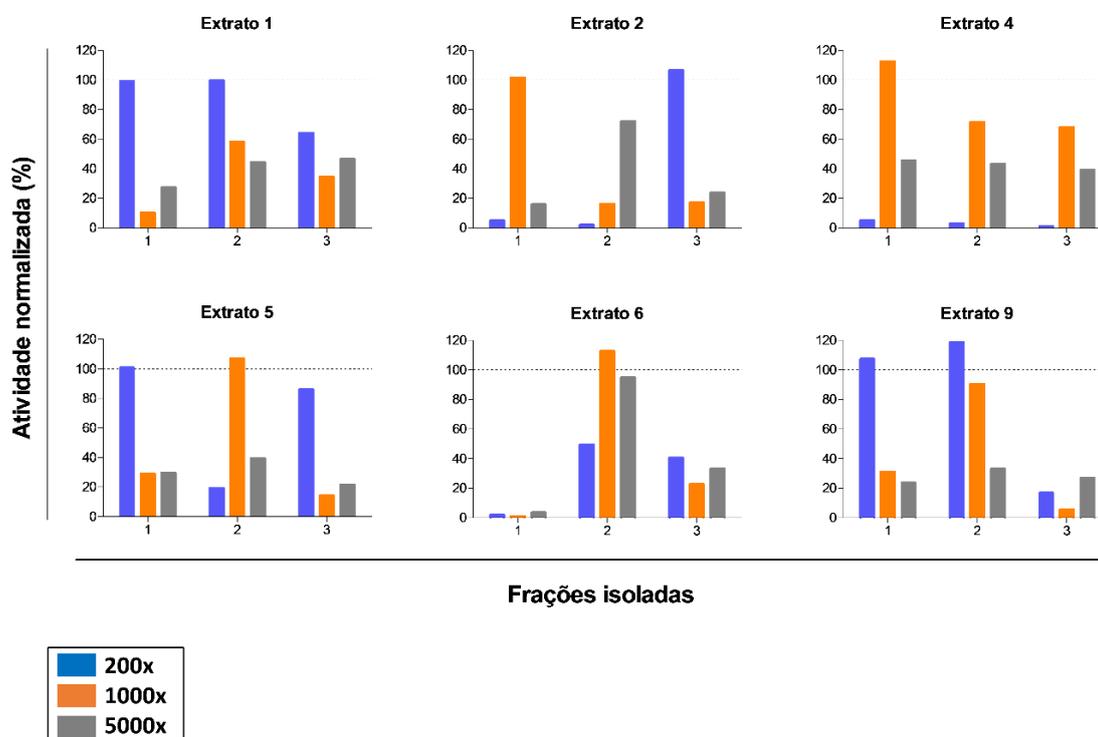


Figura 33. Perfil de atividade das frações primárias isoladas dos extratos selecionados da triagem da biblioteca natural Hypha's MycoDiverse™. As cores no gráfico representam as diferentes diluições testadas de cada fração: 200 (azul), 1.000 (laranja) e

5.000x (cinza). Para os extratos que apresentaram mais de três frações ativas, estão representadas aquelas de maior atividade antiparasitária. A linha pontilhada no gráfico representa a atividade normalizada de 100%.

Todos os extratos selecionados apresentaram pelo menos uma fração com atividade próxima a 100%. Além disso, múltiplas frações foram eficientes mesmo nas menores concentrações (diluições de 1000 e 5000x), sugerindo a presença de componentes ativos potentes. No entanto, algumas amostras apresentaram um perfil dose-dependente atípico: as concentrações mais altas não apresentaram as maiores atividades, como notado, por exemplo, em todas as frações do extrato 4; nas frações 1 e 2, do extrato 2; na fração 2, do extrato 5 e na fração 2, do extrato 6. Nesses casos, os pontos de diluição mais concentrados não apresentaram atividade, enquanto que o segundo ou terceiro ponto de diluição foram capazes de reduzir a infecção de forma expressiva. Com a finalidade de verificar a causa desse efeito, nós acessamos novamente as imagens adquiridas no microscópio Operreta e concluímos que o perfil observado se deu ao fato de que as concentrações mais altas das frações foram tóxicas para as células hospedeiras, levando a geração de debris celulares, os quais foram detectados como *spots* (falsos positivos).

A fração mais ativa de cada extrato foi submetida ao fracionamento secundário, para isolamento de frações secundárias e, se possível, componentes puros (essa fase do projeto foi realizada na empresa *Hypha Discovery*, Londres, Reino Unido). Essa etapa envolveu o (i) desenvolvimento de métodos cromatográficos para separar componentes presentes em cada fração, (ii) coleta dos picos cromatográficos resolvidos, (iii) teste dos materiais de fracionamento secundário contra o modelo de infecção por *Leishmania*. Cada fração primária foi fracionada em 3 a 7 novas frações secundárias, sendo testadas em dose-resposta (**figura 34**).

Como resultado, todas os extratos apresentaram pelo menos uma fração secundária com atividade máxima próxima a 100%. Além disso, com exceção do extrato 1, as amostras apresentaram alta potência, com valores de EC_{50} entre o quarto e sexto ponto de diluição da curva (fatores de diluição entre 0,0001 e 0,0003 em relação ao estoque original). Além disso, analisando o perfil das curvas das frações secundárias, cada extrato apresentou apenas uma fração secundária com atividade expressiva, sugerindo que a atividade observada contra o parasita foi resultado de um componente único e não do conjunto de frações do extrato.

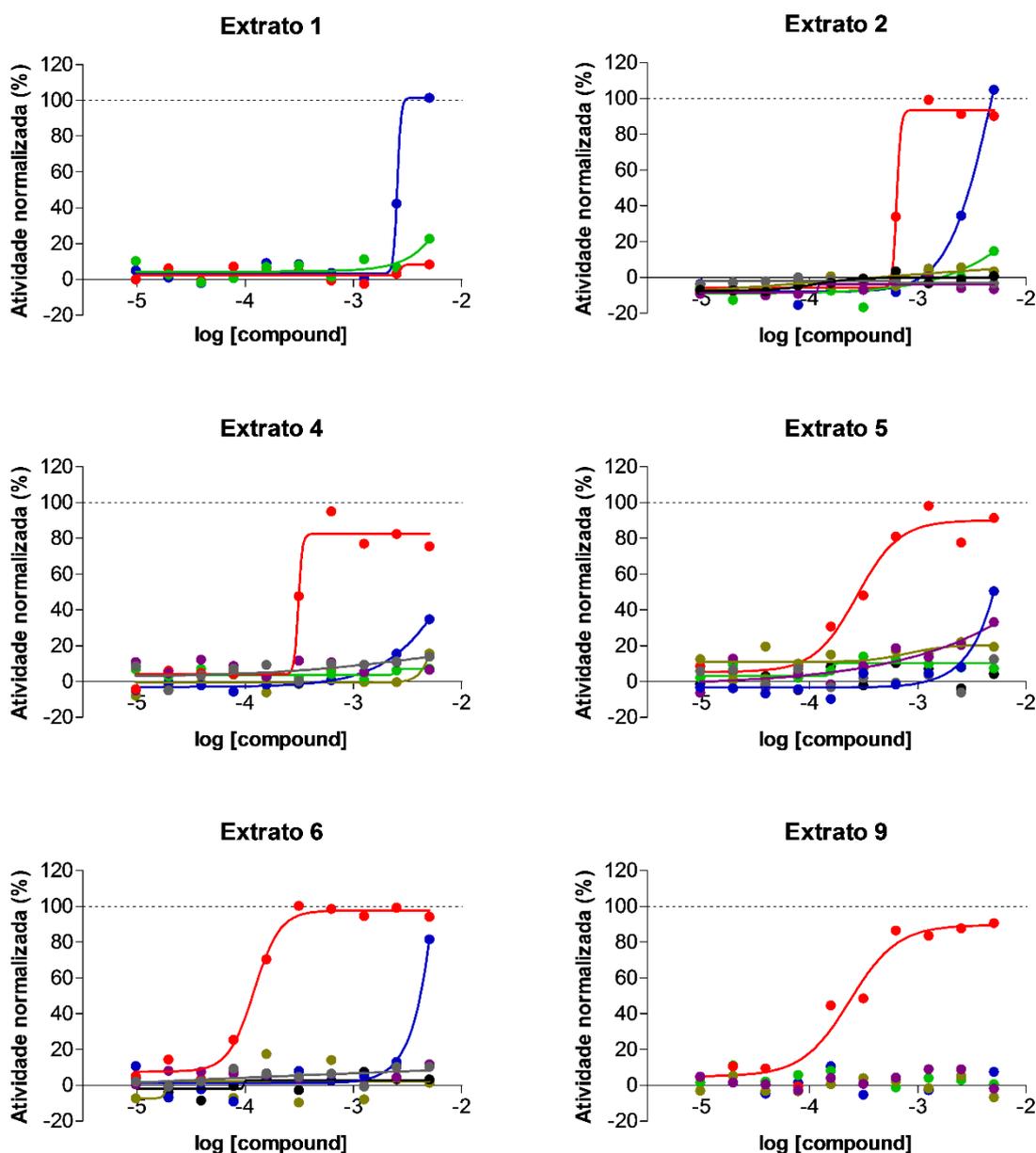


Figura 34. Curvas dose-resposta das frações secundárias obtidas através da campanha de triagem da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ contra parasitas intracelulares de *Leishmania*, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção). Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (Graphpad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada dos componentes em relação aos controles. As cores nos gráficos representam diferentes frações secundárias.

Desse set de amostras, as 5 frações secundárias mais ativas, de diferentes organismos, puderam ser detectadas (as frações do extrato 1 foram descontinuadas pois

apresentaram baixa potência). As frações foram, então, pesadas quando possível, para estimativa dos valores de EC₅₀ e CC₅₀ (**tabela 5**). Todas elas apresentaram atividade promissora, com valores de EC₅₀ próximos ou inferiores a 1µM e atividade máxima de aproximadamente 100%. As frações mostraram eficiência e potência similares ou superiores ao composto referência anfotericina B.

Tabela 5. Atividade leishmanicida das frações secundárias ativas da biblioteca Hypha's MycoDiverse™.

Frações secundárias	EC ₅₀ (µM)	Índice de seletividade	Atividade máxima (%)
Anfotericina B	1,96	24,4	98,7
Extrato 2/fração 2	<1,35	>7,8	98,8
Extrato 4/fração 4	0,59	>16,1	97,6
Extrato 5/fração 2	<0,73	>19,9	101,9
Extrato 6/fração 4	0,28	>46,4	101,3
Extrato 9/fração 3	0,49	>21,4	96,2

O experimento foi realizado em uma única replicata.

As frações finais foram produzidas por fermentação em maior escala para identificação estrutural dos produtos naturais por ressonância magnética. Compostos já foram ou estão em processo de caracterização estrutural e identificação; no entanto, as estruturas não podem ser aqui mostradas por serem de propriedade da empresa Hypha Discovery. O status atual de cada fração está apresentado abaixo:

- Extrato 2: Está sendo reproduzido em fermentação de 600 mL e a purificação está atualmente em andamento;
- Extrato 4: Foi reproduzido em uma escala de 600 mL, purificado e analisado por ressonância magnética. O espectro produzido foi de grande complexidade e, por isso, não foi possível ainda propor uma estrutura química. Foi observada uma mistura de componentes relativamente próximos quimicamente, os quais não se assemelham a nenhum extrato do banco de dados de produtos naturais. Os

materiais de fermentação e fracionamento foram submetidos a avaliações secundárias de AMDE e toxicidade;

- Extrato 5 e 6: Estão em fase de produção em escala maior para identificação fisiquímica dos componentes ativos;
- Extrato 9: Foi fermentado em escala de 600 mL, purificado e identificado por ressonância magnética. O composto puro encontrado foi recentemente reportado como um peptídeo, o qual possui atividade contra o parasita *T. brucei*. O composto foi submetido para avaliações secundárias de ADME e toxicidade.

Por fim, o resumo do fluxo de trabalho referente à triagem da biblioteca Hypha's MycoDiverse™ está apresentado no esquema abaixo (**figura 35**).



Figura 35. Fluxograma de trabalho para triagem de extratos naturais da biblioteca Hypha's MycoDiverse™.

4.19. Triagem da biblioteca de extratos naturais de plantas do Sudão

A biblioteca contendo frações isoladas de plantas do Sudão foram adquiridas através do projeto “New Medicines for Trypanosomatidic Infections”, da União Europeia. Brevemente, as espécies de plantas utilizadas foram coletadas de habitats naturais ou compradas em mercados locais, baseando-se no uso das mesmas de acordo com a cultura popular para tratamento de doenças, especialmente infecções de natureza parasitária. As espécies foram classificadas no Herbário do Instituto de plantas aromáticas e medicinais do Centro Nacional de Pesquisa, Cartum – Sudão e, então, prosseguidas para extração. No total, 137 extratos foram fracionados por HPLC (cerca de 24 frações/extrato) e as frações testadas contra o modelo de infecção de *Leishmania*.

Considerando todas as placas testadas no ensaio biológico, foi observada taxa de infecção consistente em $52,8 \pm 1,4$ e altos valores de Z'-factor (média de $0,69 \pm 0,09$). No total, 3.112 frações foram testadas na diluição única de 200x e os *hits* primários foram selecionados usando o critério de atividade $\geq 70\%$ e taxa celular $\geq 0,5$, resultando na identificação de 37 amostras candidatas (1,2% de taxa de seleção) (**figura 36**).

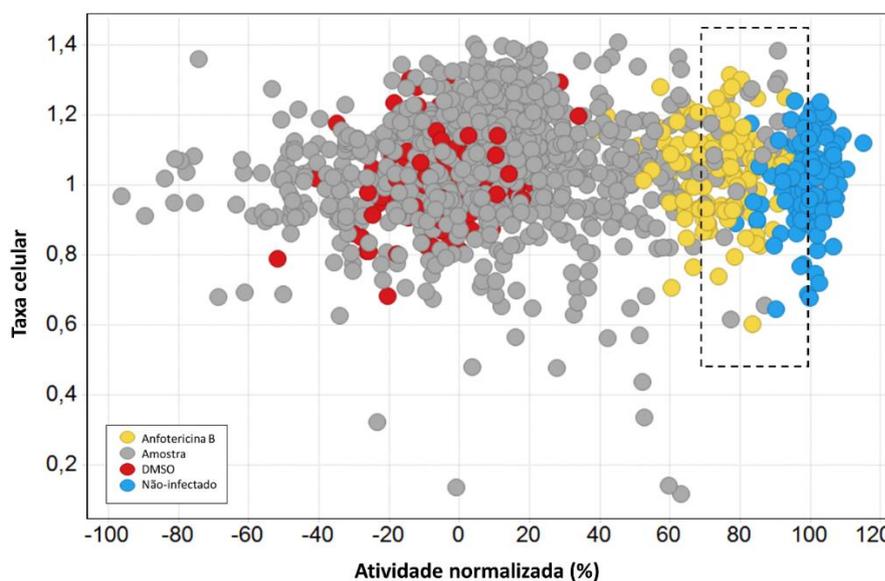


Figura 36. Triagem primária da biblioteca de extratos naturais de plantas do Sudão, contra o modelo de alto conteúdo de *L. infantum*. Os pontos representam a atividade normalizada (inibição da infecção em relação aos controles) e taxa de célula hospedeira para cada poço testado. Os compostos selecionados da triagem primária estão localizados no interior do quadro pontilhado.

As 37 frações escolhidas, as quais foram derivadas de 18 diferentes extratos de plantas, passaram por filtros de priorização, como descrito no fracionamento primário da biblioteca Hypha's MycoDiverse™: realização de uma de-replicação de *hits*, ou seja, agrupamento de extratos com perfil similar e priorização daqueles que apresentaram maior rendimento/atividade). Desse set, 11 frações foram prosseguidos para fracionamento secundário, originando 60 compostos puros ou semi-puros que foram testados em dose-resposta. O número de frações secundárias geradas a partir das frações primárias variou de 2 a 14 frações secundárias/fração primária. A partir dos testes biológicos contra o modelo de infecção por *Leishmania*, 6 frações apresentaram pelo menos uma fração secundária com eficiência próxima a 100% e alta potência, com valores de EC₅₀ entre o quarto e quinto ponto de diluição da curva.

As frações secundárias ativas, proveniente de quatro extratos diferentes, foram então pesadas para determinação dos valores de EC₅₀, CC₅₀ e índice de seletividade (**figura 37**).

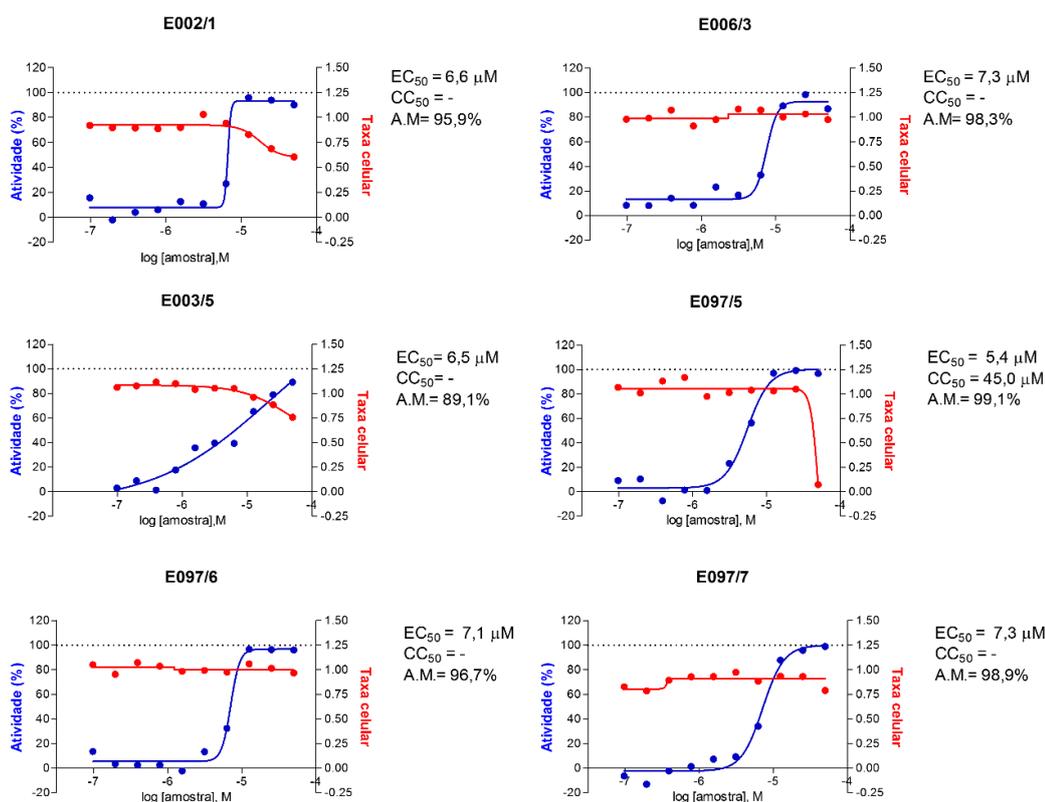


Figura 37. Curvas dose-resposta das frações secundárias obtidas a partir da triagem de frações de plantas contra parasitas intracelulares de *L. infantum*, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção). Curvas foram geradas por equação de

regressão não linear (Graphpad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada (azul) e taxa celular (vermelho) dos componentes em relação aos controles.

Como mencionado para a biblioteca Hypha's MycoDiverse™, as frações finais estão em processo de produção em larga escala por fermentação, purificação e identificação química por ressonância magnética. Com exceção das frações do extrato E097, os compostos ativos puros das frações secundárias já foram identificados provisoriamente, através do espectro de massas correspondente. Os compostos provenientes dos extratos 2,3 e 6 não se tratam de moléculas inéditas, inclusive foram recentemente reportadas como agentes com atividade contra o parasita de *Leishmania*. A identificação fisicoquímica das frações E097/5, E097/6 e E097/7 está em andamento, para que então as moléculas sejam avaliadas quanto às características de AMDE e toxicidade.

4.20. Triagem de compostos e extratos naturais enviados por colaboradores

Paralelamente, pequenas bibliotecas de diferentes colaboradores foram triadas contra o modelo de infecção de *L.infantum* MHOM/BR/1972/BH046. Ao todo, foram triadas 774 amostras, de 23 instituições/laboratórios, entre: extratos de plantas, fungos e bactérias a compostos sintéticos obtidos a partir de design racional. Os resultados obtidos a partir da triagem dessas coleções de moléculas estão sendo atualmente submetidos a periódicos ou em vias de submissão, apresentados em congressos nacionais e internacionais, além de contribuírem para dissertações, teses e projetos de pós-doutorado. Abaixo, o resumo dos principais resultados obtidos:

4.20.1. Triagem de coleção de marinoquinolinas e seus análogos - Colaboração com Prof. Carlos Roque, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

O *scaffold* geral do 3H-pirrolo[2,3-c]quinolínico é um núcleo químico relativamente raro entre os produtos naturais e foi, primeiramente, associado à marinoquinolina A, uma molécula isolada da bactéria marinha *Rapiditythrix thailandica* (Sangnoi *et al.*, 2008). Mais recentemente, outros derivados – marinoquinolinas B-F – foram isoladas da bactéria *Ohtaekwangia kribbensis* (**figura 38**) (Okanya *et al.*, 2011). Juntas, elas possuem um extenso arsenal de atividades biológicas, tais como: inibidores da enzima acetilcolinesterase, anti-

Plasmodium falciparum, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, contra bactérias multirresistentes, entre outras. No entanto, até o presente, a classe tem sido pouco explorada em outros modelos, incluindo o de *Leishmania*, representando uma oportunidade potencial para ampliação da diversidade química de moléculas para teste biológico.

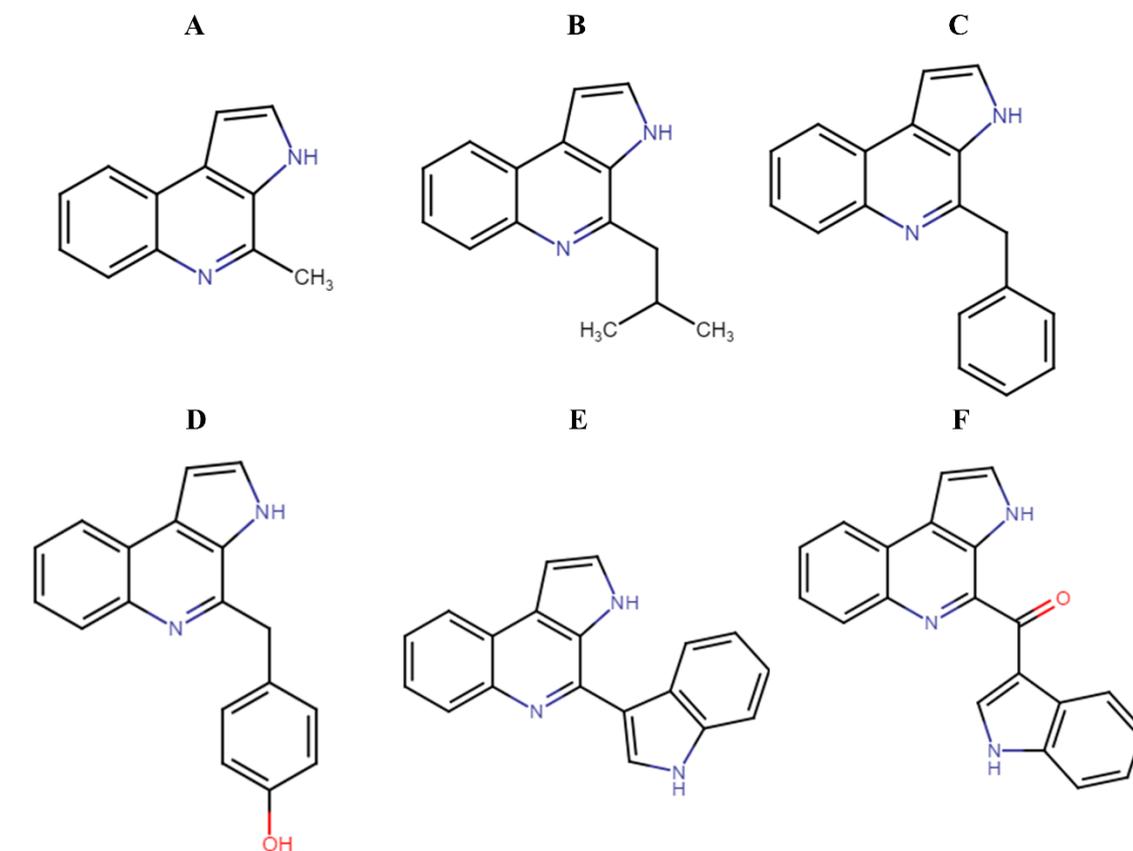


Figura 38. Estrutura química das marinoquinolinas A-F.

Dessa maneira, as marinoquinolinas A, B, C e E, bem como alguns análogos, foram sintetizadas quimicamente e testadas contra o modelo de infecção de *Leishmania*. No total, 50 moléculas foram testadas em concentração única de 20 μM , em dois experimentos independentes. O critério de seleção aplicado para seleção de *hits* foi: atividade normalizada $\geq 40\%$ e taxa celular $\geq 0,5$, em ambos os ensaios (**figura 39a**). Dessa coleção de moléculas, 7 compostos foram ativos contra *Leishmania*, sendo que apresentaram uma média de atividade normalizada entre 75 e 87%. Além disso, não apresentaram citotoxicidade em células THP-1, com valores de taxa celular próximo a 1 (**figura 39b**).

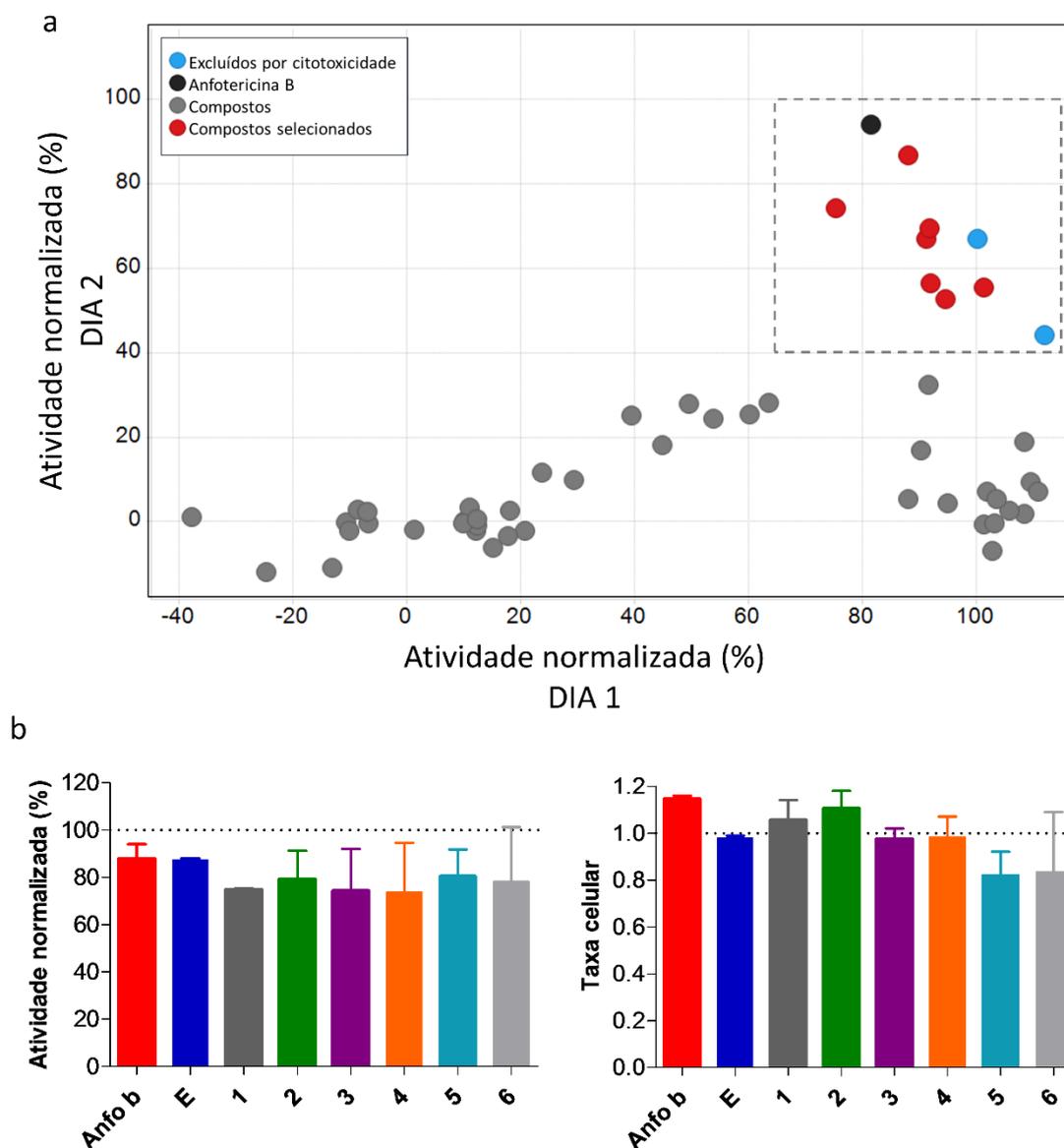


Figura 39. Triagem primária da biblioteca de marinoquinolinas e seus análogos. (a) Gráfico de correlação para os compostos testados, em termos de atividade normalizada (inibição em relação aos controles), para dois experimentos independentes. Os compostos que apresentaram atividade normalizada acima de 40% nos dois ensaios estão destacados no interior do quadro pontilhado. (b) Perfil de atividade e citotoxicidade para os compostos selecionados. Os valores de atividade máxima e taxa celular referem-se a dados de dois experimentos independentes. Anfo b = composto referência anfotericina B; E= marinoquinolina E; 1 – 6 = análogos sintetizados a partir de marinoquinolinas.

Os compostos selecionados foram então encaminhados para ensaios de dose-resposta para determinação dos valores de EC₅₀, CC₅₀, índice de seletividade e atividade máxima (**figura 40**). As moléculas testadas, com exceção do análogo 6, apresentaram atividade promissora contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*, com valores de EC₅₀ menores ou iguais a 10 µM, destacando-se a marinoquinola E e os análogos 2 e 5, os quais apresentaram EC₅₀ de 6,3; 5,1 e 5,6 µM, respectivamente. Todos os compostos apresentaram alta eficiência, sendo que os valores de atividade máxima variaram de 75,9 a 96,6%. Além disso, não observamos citotoxicidade em células THP-1 para nenhum dos compostos, nas concentrações testadas. Para anfotericina B, usada como controle do experimento, obteve-se EC₅₀ = 2,3 µM/ atividade máxima = 92,5%.

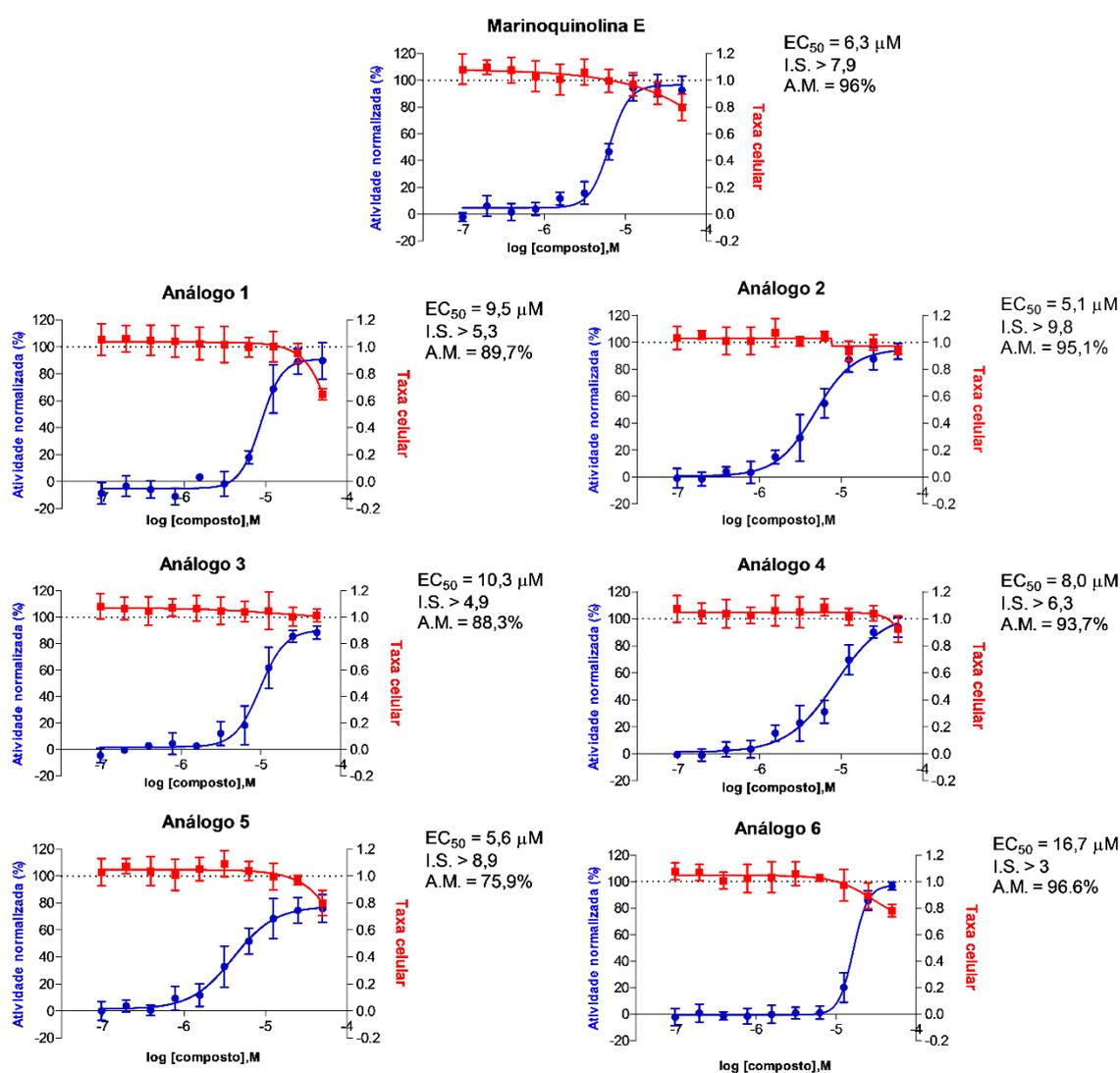


Figura 40. Curvas dose-resposta para os *hits* selecionados a partir da triagem primária, após 48 horas de exposição às drogas (72 horas após infecção). Curvas foram

geradas por equação de regressão não linear (Graphpad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada (azul) e taxa celular (vermelho) dos componentes em relação aos controles. Os dados de EC₅₀, índice de seletividade e atividade máxima estão indicados nos gráficos e representam a média de valores de dois ensaios independentes.

4.20.2. Triagem da coleção de derivados de azaindóis - Colaboração com Prof. Hélio A. Stefani, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Leishmania e outros tripanossomatídeos expressam uma vasta gama de quinases, as quais estão envolvidas em diversos processos metabólicos desses parasitas. Estudos evidenciam o papel dessas enzimas em processos de diferenciação durante o ciclo celular, crescimento e desenvolvimento, virulência e sobrevivência no interior de macrófagos infectados, entre outros (revisado por Singh, Humar & Sing, 2012). Atualmente, diversas abordagens vem sendo empregadas para identificar moléculas que interfiram na atividade dessas proteínas, tais como: (i) reposicionamento de inibidores já registrados para tratamento de outras doenças (Sanderson, Yardley & Croft, 2014), (ii) triagens de bibliotecas focadas nesses inibidores (Durieu *et al.*, 2016) e (iii) síntese de análogos a partir de um inibidor com atividade antiparasitária (Woodland *et al.*, 2015). Dessa maneira, é razoável propor a identificação de novas classes de inibidores de quinases, as quais podem representar uma nova alternativa de candidatos a fármacos.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade de 13 derivados do composto 2-(1*H*-pirrolo[3,2-*c*]piridina-2-il)propan-2-óis, previamente reportado como um potente inibidor de quinase, contra o modelo de infecção de *Leishmania*. Compostos foram testados em dose resposta e os parâmetros quantitativos do perfil de atividade estão apresentados na **tabela 6**.

Foi possível identificar moléculas ativas contra o parasita, com alta eficiência, resultando em valores de atividade máxima entre 89,5 a 97%, para os compostos **18**, **19**, **20**, **22** e **29**. O composto **29** apresentou o valor de EC₅₀ mais promissor (6,78 µM), enquanto que os compostos **18** e **19** apresentaram potência relativamente moderada, com valores de EC₅₀ em 26,3 e 18,6 µM, respectivamente. No entanto, o composto anfotericina B foi ainda, pelo menos, 3 vezes mais potente, com valor de EC₅₀ igual a 2,3 µM. De maneira geral, os compostos não apresentaram citotoxicidade contra a célula hospedeira THP-1.

Tabela 6. Atividade biológica dos derivados de azaindóis contra o modelo de infecção de *L.infantum* MHOM/BR/1972/BH046.

Composto	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Índice de seletividade	Atividade máxima (%)
Anfotericina B	2,3	26,5	11,6	101,9
MNB1_33 (16)	n.d.	n.d.	n.d.	-
MNB1_48 (17)	n.d.	n.d.	n.d.	-
MNB1_53 rxn3 (18)	29,8	>100,0	>3,4	94,1
MNB1_53rxn3 2_1 (18)	26,3*	85,1	3,2*	97,0*
MNB1_53rxn3 2 (18)	n.d.	n.d.	n.d.	-
MNB1_53 rxn4 (19)	18,6	53,2	2,9	96,1
MNB1_56 rxn1 (20)	71,4	>100,0	> 1,4	95,5
MNB1_56 rxn2 (21)	n.d.	n.d.	n.d.	20,9
MNB1_56 rxn3 (22)	35,6	>100,0	>2,8	89,5
MNB1_56 rxn4 (23)	n.d.	n.d.	n.d.	-
MNB1_61 rxn1 (25)	48,0*	>100,0	>2,1*	43,6
MNB1_61 rxn2 (26)	n.d.	n.d.	n.d.	-
MNB1_64 rxn3 (29)	6,8	78,4	11,6	102,1

Dados representam a média de dois experimentos independentes. *: valor refere-se a uma única replicata. n.d.: não determinado. O número entre parêntese indica o código do composto.

As moléculas sintetizadas e testadas contra o modelo de *Leishmania* tratam-se de compostos azaindóis, os quais são caracterizados pela substituição de um carbono por um nitrogênio no anel benzênico de indóis (Le Hyaric, Almeida & Souza, 2002). Estudos feitos por diferentes grupos demonstram a ampla atividade biológica desses compostos: ligantes de receptores de benzodiazepinas (Doisy *et al.*, 1999), ligantes de receptores D4 da dopamina (Curtis *et al.*, 1999), antineoplásicos (Echalier *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2012), entre outras. Especificamente no campo do desenvolvimento de fármacos para doenças parasitárias, trabalhos reportam o potencial de inibição dessas moléculas em modelos de *Giardia duodenalis*, agente etiológico da Giardíase (Leboho *et al.*, 2015), e *Plasmodium falciparum* (Van Baelen *et al.*, 2009), parasita responsável por causar a Malária. No entanto, parece não haver precedentes na literatura com relação a ação anti-*Leishmania* desses compostos. O *scaffold* geral dos compostos sintetizados, bem como a estrutura química do composto 29 (que apresentou atividade anti-*Leishmania* promissora), está apresentada na **figura 41**.

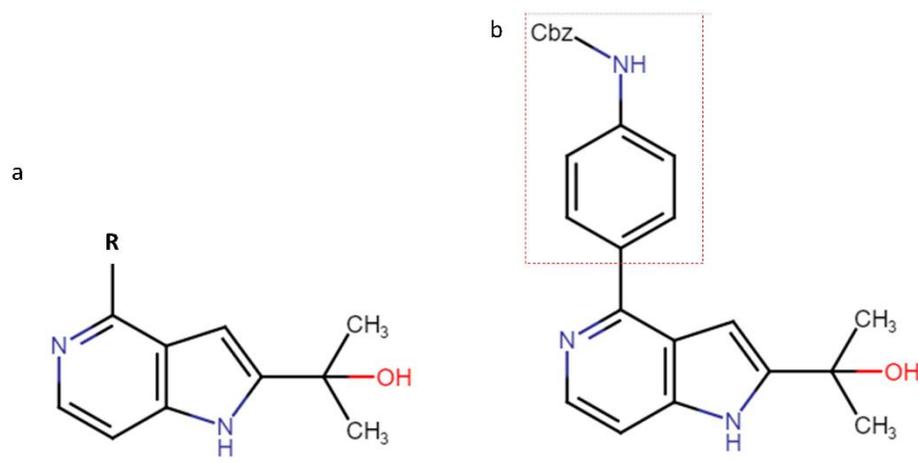


Figura 41. Estrutura química dos análogos de azaindóis. (a) *Scaffold* geral dos azaindóis testados nos ensaios biológicos. (b) Composto selecionado a partir da triagem da coleção de compostos.

Portanto, otimizações químicas do composto 29 e a síntese de novos derivados a partir do *scaffold* geral representam uma alternativa interessante para: (i) aumento da potência e seletividade dos compostos; (ii) produção de candidatos potenciais contra o parasita e (iii) realização de estudos de relação de estrutura-atividade. Além disso, os compostos azaindóis representam uma classe inédita de agentes anti-*Leishmania*, a qual poderá ser explorada futuramente.

4.20.3. Triagem de compostos análogos de chalconas – Colaboração com Profa. Carolina Horta, Universidade Federal de Goiás

As chalconas são moléculas de origem natural, geralmente metabólitos secundários, de baixo peso molecular e estrutura química relativamente simples. São amplamente conhecidas como moléculas privilegiadas para manipulação sintética e desenvolvimento de novos fármacos, devido à diversidade de substituintes os quais podem ser conjugados ao *scaffold* principal. Diversos trabalhos vem reportando o amplo espectro de propriedades biológicas das chalconas, incluindo: antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (Batovska & Todorova, 2010; revisado por P. Singh, Anand & Kumar, 2014). Dentro do último grupo, vale postular os trabalhos demonstrando a atividade anti-*Leishmania*

dessas moléculas, já previamente publicados (Aponte *et al.*, 2010; de Mello *et al.*, 2014, de Mello *et al.*, 2015).

Nesse cenário, o objetivo desse estudo foi identificar novos compostos com atividade contra parasitas de *Leishmania*, a partir de uma coleção de 32 chalconas/compostos similares a chalconas, previamente sintetizados. Brevemente, os compostos foram submetidos a uma abordagem *in silico* baseada em alvo, utilizando o modelamento por farmacóforo e, então, a estrutura 3D dos alvos selecionados foi obtida através do modelamento por homologia, seguido por *docking* molecular (realizados no laboratório da Profa. Carolina Horta, UFG). Por fim, em nosso laboratório, determinamos a atividade, citotoxicidade e seletividade dos candidatos promissores.

Baseado nos resultados obtidos nos ensaios *in silico*, foram selecionados nove compostos promissores (**LabMol-69, 73, 65, 67, 70, 76, 86, 90, and 72**) e três compostos potencialmente inativos, os quais foram usados como controle negativo (**LabMol-72, 73 e 92**). Os doze compostos nitroheterocíclicos similares a chalconas, juntamente com o composto referência anfotericina B, foram testados contra o modelo de infecção por *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 (**tabela 7**). Desse set de compostos, três compostos (**LabMol-65, LabMol-72 e LabMol-73**) apresentaram alta atividade anti - *Leishmania*, com valores de EC₅₀ variando entre 6,32 e 10,98 µM. A anfotericina B exibiu um valor de EC₅₀ de 1,9 µM. Entre os controles negativos, os compostos **LabMol-72 e LabMol-73** foram realmente inativos, enquanto que o composto **LabMol-92** demonstrou EC₅₀ de 9,31 µM. Dentre os quatro compostos ativos, apenas os compostos **LabMol-65 e Labmol-73** não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, resultando em índices de seletividade maiores que 5,2 e 7,9, respectivamente.

Tabela 7. Atividade biológica dos análogos de chalconas selecionados através do *docking* molecular contra o modelo de infecção de *L. infantum* em células THP-1.

Composto	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Índice de seletividade	Atividade máxima (%)
Anfotericina b	1,9	9,8	5,2	
LabMol – 65	63	>50	>7,9	97,5
LabMol – 67	30,7	>50	>1,6	83,7
LabMol – 69	>50	>50	n.d.	-
LabMol – 70	>50	>50	n.d.	-
LabMol – 72	10,9	31,1	2,8	96,5
LabMol – 73	9,6	>50	>5,2	79,2
LabMol – 76	>50	>50	n.d.	29,5
LabMol – 78	27,1	49,5	1,8	60,4
LabMol – 82	23,8	14,9	0,6	76,9
LabMol – 86	31,1	8,4	0,2	60,5
LabMol - 90	>50	>50	n.d.	34,8
LabMol – 92	9,3	13,1	1,8	80,6

Dados representam a média de dois experimentos independentes. n.d.: não determinado.

Baseado nos resultados experimentais, estudos de relação estrutura-atividade (SAR, do inglês *structure – activity relationship*) foram realizados para identificar as porções estruturais responsáveis pela atividade anti – *Leishmania* (**figura 42**). Considerando o anel B, independentemente das substituições realizadas no anel A, grupamentos nitro na posição R₉ e grupos nitro, dimetilamina e metoxila na posição R₁₀ diminuíram a atividade da molécula. Substituições por furano e nitrotiofeno também foram desfavoráveis. Em contrapartida, o grupo de nitrofurano apresentou uma contribuição positiva. Já focando no anel A, grupamentos que impedem a entrada de átomos de outras moléculas (*bulky groups*) e doadores de elétrons na posição R₄ resultaram em aumento da atividade, enquanto que as substituições por grupos hidrofóbicos ou aromáticos, bem como por átomos halogênicos, demonstraram contribuição negativa para a atividade.

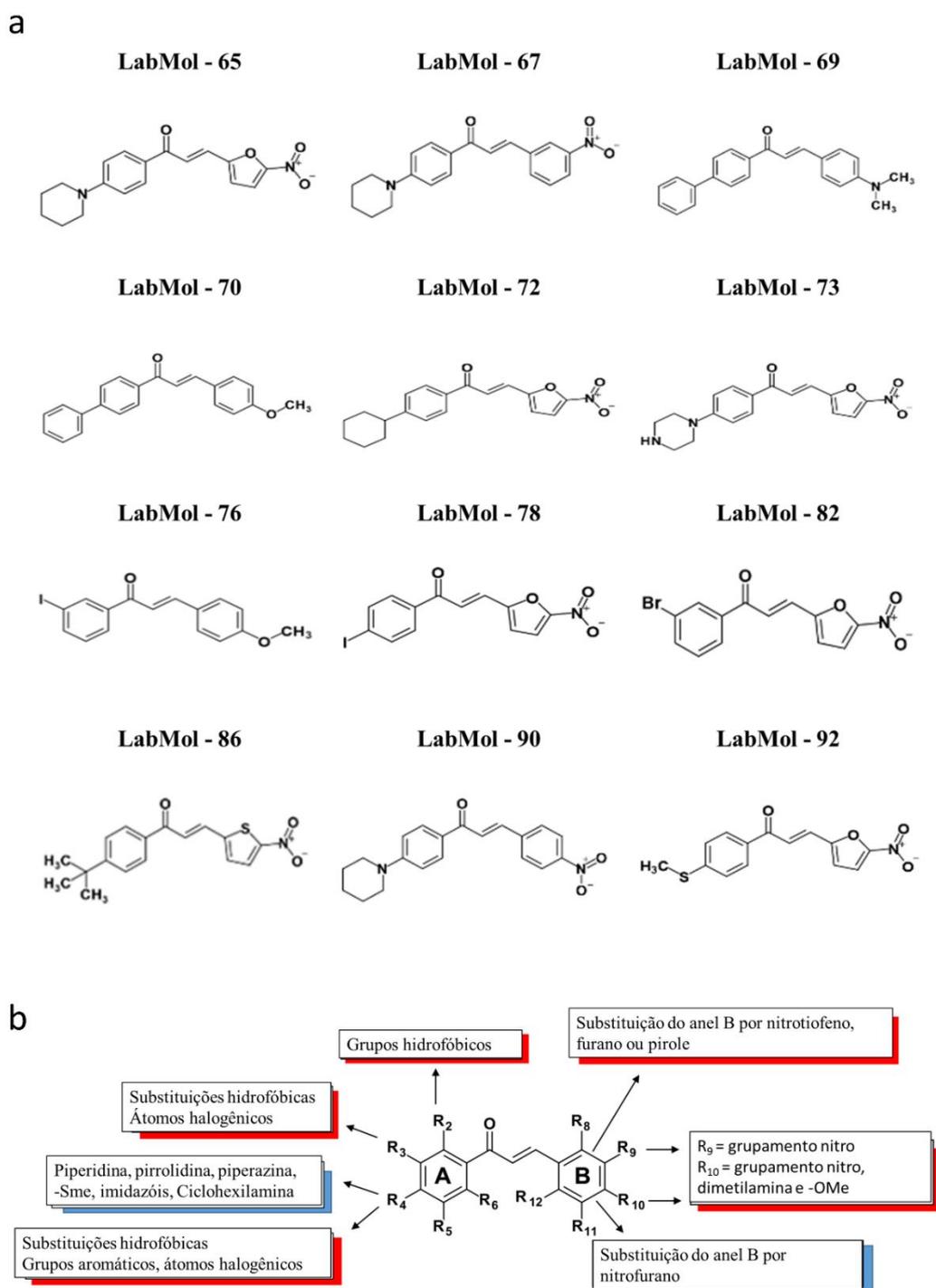


Figura 42. Estudos de relação de estrutura-atividade para os análogos de chalcona testados contra o modelo de *Leishmania*. (a) Estrutura química das moléculas utilizadas nos testes biológicos. (b) Regras do estudo de estrutura-atividade, destacando os grupamentos químicos que promoveram ou interferiram na atividade anti-*Leishmania*. Quadros vermelhos indicam os grupos com contribuição desfavorável, enquanto que os quadros azuis representam as substituições favoráveis para a atividade.

Por fim, os potenciais alvos para os compostos testados foram investigados em ensaios *in silico*. Os compostos **LabMol-65**, **LabMol-72**, **LabMol-73**, e **LabMol-92**, os quais apresentaram expressiva atividade contra o parasite, parecem interagir com proteínas cisteína-proteases, as quais foram previamente reportadas como enzimas essenciais para a sobrevivência do parasite e potenciais alvos para fármacos (Mahmoudzadeh-Niknam & McKerrow, 2004; Mundodi *et al.*, 2005). Em estudos realizados por Mundodi e colegas, por exemplo, foi evidenciado que parasitas de *L. infantum* com *knockout* para o gene de uma enzima cisteína-protease geram infecções significativamente menores, em termos de taxa de infecção e número de amastigotas intracelulares, quando comparados com parasitas selvagens (Mundodi *et al.* 2005).

Inibidores de cisteína-proteases vem sendo amplamente explorados devido a sua atividade antiparasitária. O composto de telúrio RF07, previamente reportado como forte inibidor dessa classe de enzimas, mostrou expressiva atividade anti-*Leishmania* contra amastigotas intracelulares, com média de $EC_{50} = 0,53 \mu\text{M}$, e baixa toxicidade em macrófagos primários de camundongo. Além disso, uma redução de 99,6% da carga parasitária foi observada em hamsters infectados com o parasite (Pimentel *et al.*, 2012). Outras classes químicas de inibidores também já foram reportadas: compostos nitrilos e carbazonas (Schröder *et al.*, 2013), compostos cetoheterocíclicos (Steert *et al.*, 2010) e produtos naturais como flavonoides (Gontijo *et al.*, 2012).

Portanto, o estudo *in vitro* de interação proteína – composto seria uma abordagem interessante para confirmar o alvo terapêutico das moléculas selecionadas em nosso ensaio e, conseqüentemente, guiar uma otimização racional das moléculas candidatas.

4.20.4. Triagem da coleção de inibidores da biossíntese de esteróis (benzil farmesil amina) – Colaboração com Prof. Simon Bernhard Cämmerer, UNICAMP

Esteróis são lipídeos constituintes de membranas celulares, que possuem papel fundamental na estruturação e funcionamento normal das mesmas. São capazes de modular a fluidez da bicamada lipídica, afetando assim a rigidez e permeabilidade da membrana plasmática. Em células de mamíferos, o colesterol é o esterol majoritário das membranas, enquanto que em outros organismos eucarióticos, como fungos e protozoários, existe uma variedade de esteróis constituintes. Especificamente para os tripanossomatídeos, incluindo parasitas do gênero *Leishmania*, é bem estabelecida uma classe especial de esteróis, dos ergosteróis, os quais são essenciais para crescimento e viabilidade dos parasitas e não estão

presentes em células hospedeiras (revisado por de Souza & Rodrigues, 2009; Nes, 2011; Urbina, 2009).

A síntese do ergosterol requer, pelo menos 20 vias metabólicas, as quais envolvem enzimas específicas, sendo que algumas delas se diferem entre mamíferos e tripanossomatídeos. Dessa forma, vários são os alvos que podem ser explorados no desenvolvimento de novos fármacos que interfiram na viabilidade do parasita e não sejam tóxicos para a células do hospedeiro (revisado por de Souza & Rodrigues, 2009). Nesse contexto, destaca-se a esqualeno-sintase, uma enzima que exerce papel chave na biossíntese de esteróis, pois catalisa a reação de produção de escualeno, um dos precursores de colesterol e ergosterol (Urbina *et al.*, 2002). Tal enzima foi recentemente validada como potencial alvo quimioterápico para os parasitas *T. cruzi* (Shang *et al.*, 2014) e *Leishmania* (Bhargava *et al.*, 2010) e diversos trabalhos tem demonstrado esforço na identificação de possíveis inibidores para essa enzima (Cammerer *et al.*, 2007; Orenes Lorente *et al.*, 2005; Urbina *et al.*, 2004). Apesar desses inibidores também interferirem na produção de colesterol por células hospedeiras, a seletividade desses compostos pode ser explicada pelo fato de que as células hospedeiras possuem a capacidade de compensar o bloqueio da síntese de colesterol pela maior captação de esteróis do meio externo (por exemplo, meio de cultivo e soro) (Urbina, 2009).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo sintetizar análogos do composto benzil-farnesil amina, uma classe já reportada como potente inibidor da enzima escualeno-sintase, e testá-los contra os modelos biológicos de *Leishmania* e *T. cruzi* na tentativa de identificar possíveis candidatos com atividade antiparasitária. Os ensaios envolvendo o modelo do parasita *T. cruzi* foram realizados pelo aluno de doutorado Caio Haddad Franco, em nosso laboratório. No total, uma pequena coleção de 7 análogos foi triada contra os modelos intracelulares dos parasitas na concentração única de 25 μM (**figura 43**). Interessantemente, todos os compostos apresentaram atividade antiparasitária relativamente alta, que variam de 75 a 100%, em ambos os modelos. No entanto, enquanto que para o modelo de *Leishmania* não observamos citotoxicidade dos compostos, para o modelo de *T. cruzi*, os mesmos apresentaram toxicidade variável, sendo que os valores calculados de taxa celular apresentaram-se entre 0,20 a 0,90, em relação aos controles infectados.

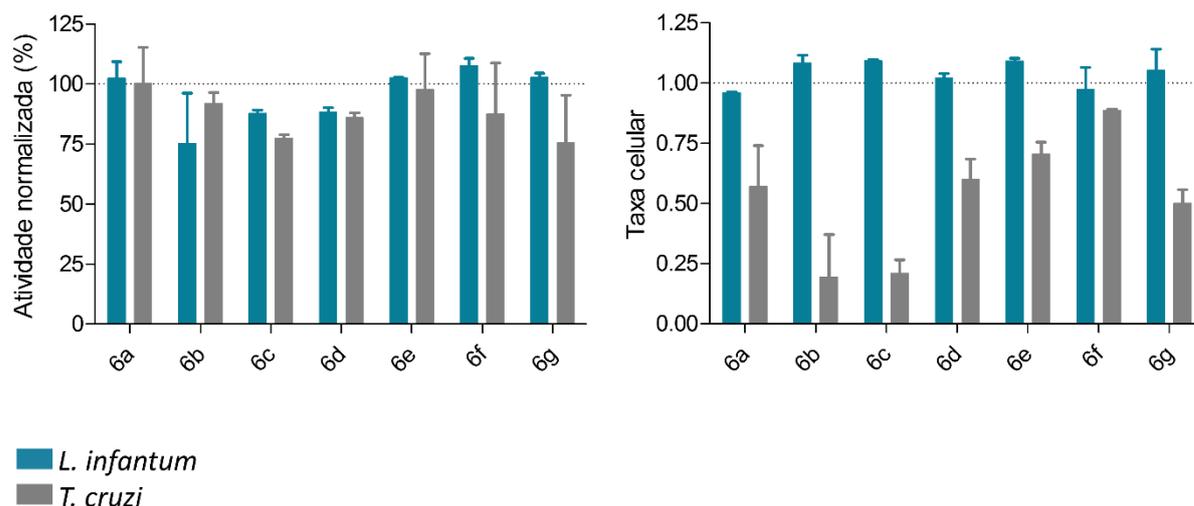


Figura 43. Atividade biológica dos análogos de benzil-farmesil amina contra os modelos de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Os compostos estão nomeados de 6a a 6g. Os dados referem-se às médias e as barras de erro representam os valores de desvio padrão de dois ensaios independentes.

Tendo em vista os resultados promissores obtidos, investigamos a atividade dos compostos em curvas dose-resposta, para determinação dos valores de EC_{50} , CC_{50} , índice de seletividade e atividade máxima (**tabela 8**). Tivemos que o composto **6g** apresentou alta potência e eficácia contra ambos os modelos testados, no entanto, um valor relativamente baixo de índice de seletividade ($I.S. < 10$) foi observado para as células U2OS infectadas com *T. cruzi*. De fato, com exceção do composto **6c**, que apresentou uma performance satisfatória, todos os outros análogos em teste apresentaram baixa seletividade nas células USOS. O mesmo perfil não foi observado para as células THP-1, embora os compostos tenham apresentado menor potência, quando comparados aos resultados obtidos para *T. cruzi*. Isso pode apontar para uma variação na tolerabilidade dos compostos pelas células usadas nos modelos de infecção, provavelmente devido a: (i) diferenças na ativação de vias *off-target* ou (ii) pelo dinamismo complexo nas interações parasito – hospedeiro por si.

Tabela 8. Parâmetros quantitativos das curvas de dose-resposta contra os modelos de amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *T. cruzi*.

	<i>Leishmania infantum</i>				<i>Trypanosoma cruzi</i>			
	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	A.M. (%)	I.S.	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	A.M. (%)	I.S.
Anfo B	2.3 \pm 0.5	41.4 \pm 5.6	95.8	> 17.6	-	-	-	-
Benz	-	-	-	-	3.0 \pm 0.8	nd	102.2	> 133
6a	14.6 \pm 2.5	nd	107.4	> 3.5	7.1 \pm 3.4	21.1 \pm 4.1	100.2	2.9
6b	13.6 \pm 3.3	nd	102.6	> 2.8	4.2 \pm 1.4	25.8 \pm 0.1	91.8	6.1
6c	17.9 \pm 0.5	nd	95.2	> 3.2	2.8 \pm 0.4	32.2 \pm 7.7	93.0	11.5
6d	15.7 \pm 0.1	nd	93.6	> 4.1	9.2 \pm 0.5	27.2 \pm 2.0	85.5	2.9
6e	12.3 \pm 1.9	nd	97.5	> 3.8	6.7 \pm 1.9	16.7 \pm 0.7	97.6	2.5
6f	7.8 \pm 2.8	nd	108.2	> 6.9	4.6 \pm 1.5	16.6 \pm 3.9	100.9	3.6
6g	7.7 \pm 0.7	nd	103.8	> 6.5	3.8 \pm 1.9	21.9 \pm 4.5	103.7	5.8

n.d.: não determinado. A.M.: atividade máxima, em porcentagem. I.S.: índice de seletividade. -: não testado. Anfo B: anfotericina B. Benz: benznidazol. Dados representam os resultados de dois experimentos independentes.

Verificando a relação de estrutura – atividade dos compostos testados (**tabela 8**) e **figura 44**), o composto **6a** exibiu uma atividade biológica moderada contra o parasita *T. cruzi*, com EC₅₀ de 7,1 μ M e uma baixa potência contra *L. infantum* (EC₅₀ = 14,6 μ M). O substituinte -OMe na posição 2 do anel A (composto **6b**) levou a um aumento de duas vezes na atividade contra *T. cruzi*, no entanto não afetou na atividade contra *Leishmania*. O mesmo perfil foi observado no análogo **6c**, onde outro grupamento metoxila foi incorporado na posição 3, do

anel A. A molécula **6c** foi notavelmente mais potente contra *T.cruzi*, apresentando valor de EC₅₀ comparável com o composto referência benznidazol; no entanto, também observamos um aumento na citotoxicidade do composto. Já o derivado **6d**, com três substituições -OMe no anel A apresentou menor atividade contra o parasita *T. cruzi*, enquanto que para o modelo de *Leishmania*, nenhuma mudança de potência foi observada. Comparado com o composto **6a**, que não passou por nenhuma substituição química, o análogo **6f** apresentou-se mais ativo contra os dois modelos, sugerindo que o grupo metil aumentou a estabilidade metabólica do composto. Um substituinte -OMe na posição R3 originou o composto **6g**, que apresentou atividade comparável com o composto **6f**, o que significa que o grupamento adicional não acarretou em mudanças na atividade das moléculas. Uma comparação das estruturas químicas dos análogos e suas atividades antiparasitárias nos dão uma conclusão preliminar: o substituinte metila nas proximidades do anel C (posição R5) resulta em um efeito positivo na atividade biológica contra o parasita do gênero *Leishmania*, enquanto que o substituinte -OMe, nas posições R2 e R3 do anel A levou a um aumento significativo na atividade contra o *T. cruzi*.

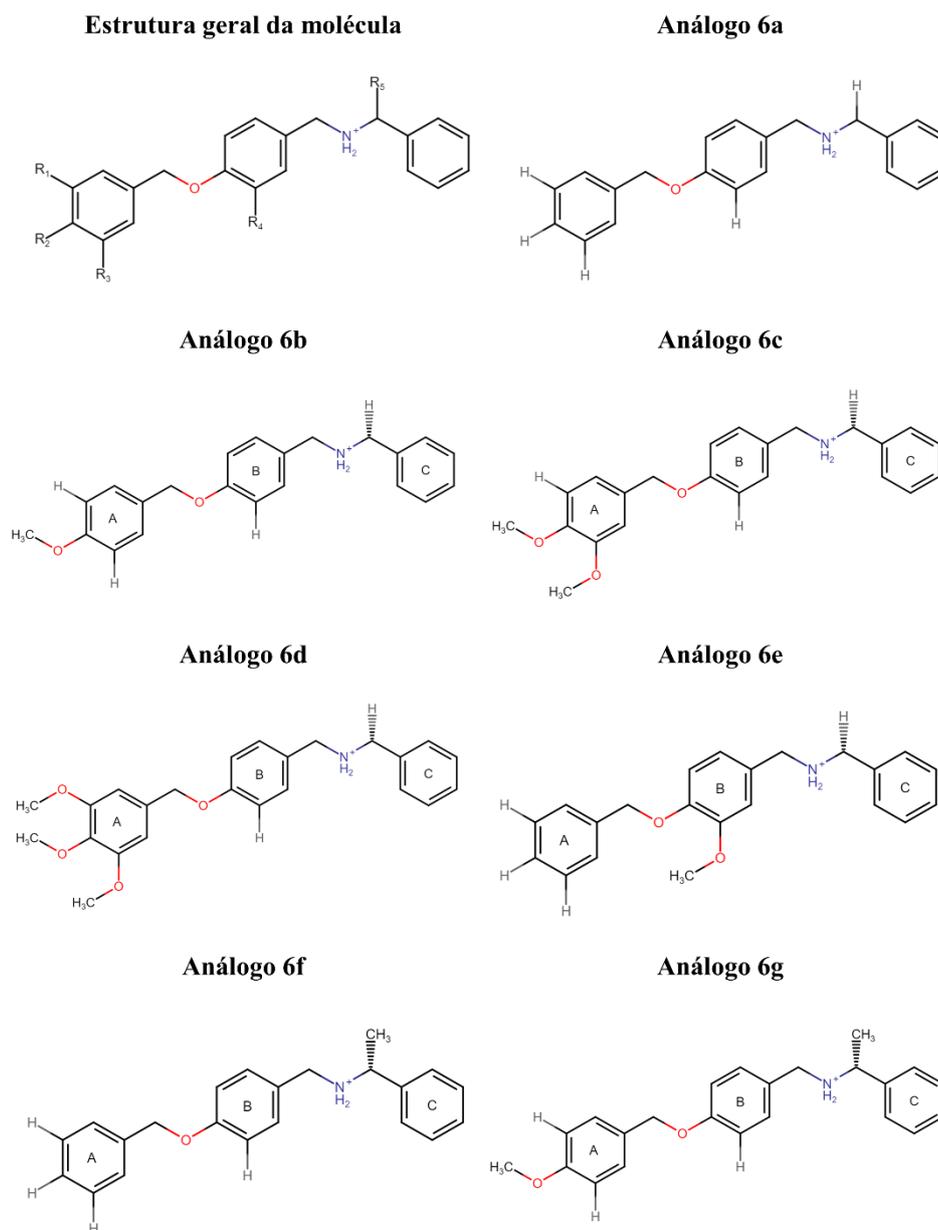


Figura 44. Estrutura geral e análogos do inibidor da enzima esqualeno-sintase.

A partir dos dados apresentados, podemos inferir que os inibidores de esqualeno sintase, da classe das benzil-farnesil aminas, apresentam uma alternativa em potencial para investigação de novos candidatos com atividade anti-tripanosomatódeos, sendo interessante, portanto, a síntese de novos análogos, objetivando o aumento da potência e seletividade das moléculas. Além disso, apesar de assumirmos que a inibição da proteína esqualeno-sintase ser responsável pela atividade biológica observada, investigações mais detalhas do mecanismo de ação dos compostos estão, paralelamente, sendo realizadas em colaboração, para validação do alvo terapêutico.

SEÇÃO IV: Triagem da biblioteca LOPAC

4.21. Triagem da biblioteca LOPAC® contra os modelos de *L. infantum* e *L. donovani*

Tendo em vista o potencial promissor do reposicionamento de compostos no desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas, a biblioteca LOPAC®, constituída de 1.280 compostos biologicamente ativos (fármacos licenciados e moléculas com propriedades/classes farmacêuticas relevantes), foi testada contra os modelos de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH046) e *L. donovani* (MHOM/IN/1980/DD8). O objetivo, nesse caso, foi realizar a prospecção de candidatos ativos bem como traçar um paralelo de atividade de compostos contra as duas espécies viscerais.

A biblioteca, contendo 4 placas, foi testada em duplicata em dois experimentos independentes. Células THP-1 previamente infectadas com promastigotas de *Leishmania* foram expostas aos compostos da biblioteca em concentração única de 50 µM, por 72 horas para *L. infantum* e 96 horas para *L. donovani*. O resumo dos parâmetros da triagem está apresentado na **tabela 9, figura 45 e figura 46**. Foi possível observar que ambos os representantes viscerais apresentaram alta taxa de infecção, com média de infecção dos controles infectados de 60% ($\pm 1,3$) para *L. infantum* e 75% ($\pm 13,5$) para *L. donovani*. Isso resultou em altos valores de Z'-factor (0,66 e 0,77), indicando alta confiabilidade das triagens. Além disso, quando observado o índice de correlação entre duas corridas de experimento independentes, altos valores foram obtidos (0,91 e 0,89), demonstrando a reprodutibilidade do sistema. Anfotericina B, utilizada como composto referência, foi capaz de reduzir a infecção em ambos modelos, com valores de EC₅₀ e atividade máxima comparáveis com os encontrados na literatura (Vermeersch *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2012; Maes *et al.*, 2016).

Tabela 9. Parâmetros quantitativos da triagem da biblioteca LOPAC.

Parâmetro	<i>L.infantum</i>	<i>L.donovani</i>
Média da taxa de infecção	60%	75%
Média do número de parasitas/célula infectada	5,0	5,8
Média dos valores de Z' - fator	0,66	0,77
Índice de correlação	0,91	0,89
EC ₅₀ para anfotericina B (µM)	1,85	0,82

Os valores de EC₅₀ estão representados como médias de dois ensaios independentes. Os dados de taxa de infecção, número de parasitas/célula infectada e Z' – factor estão indicando as médias de valores de todas as 14 placas preparadas nos dois ensaios independentes.

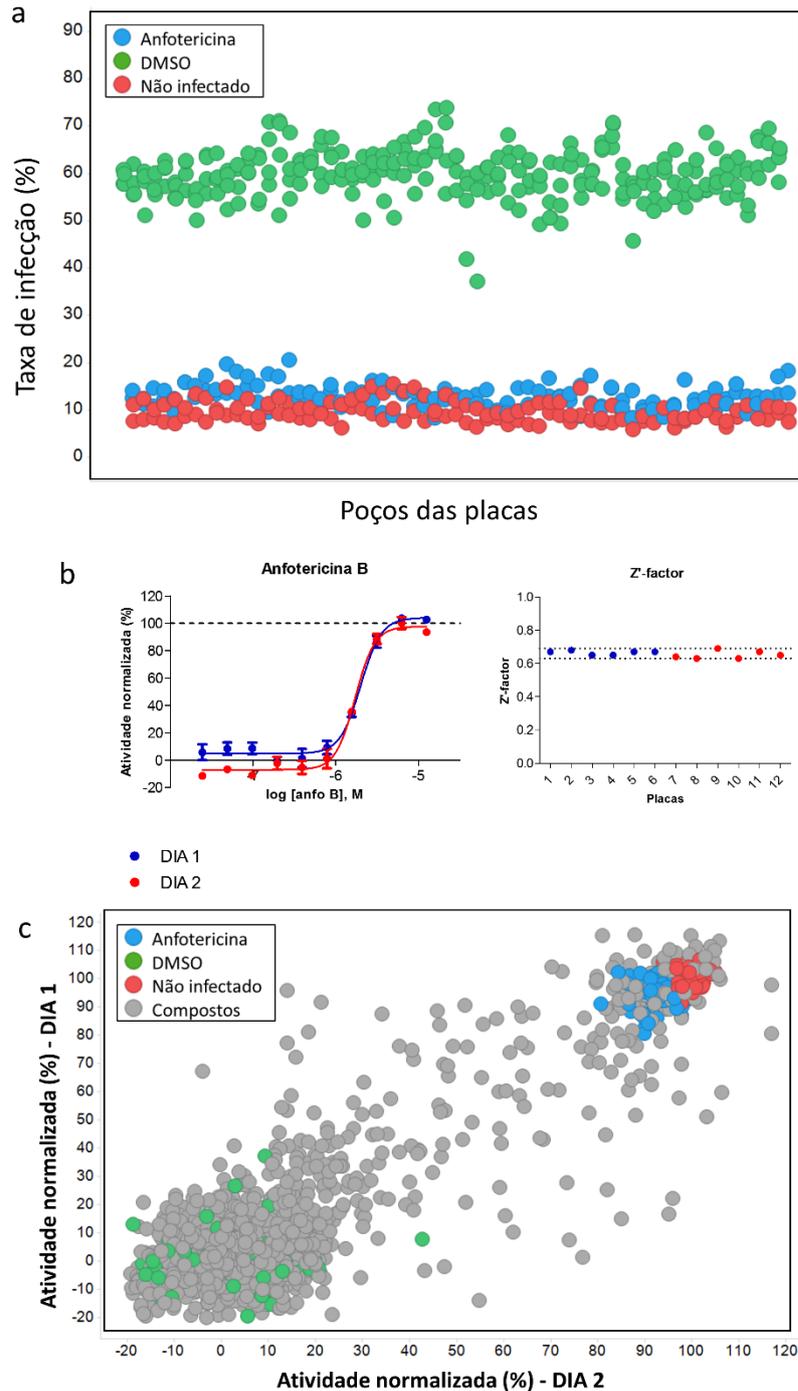


Figura 45. Triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de *L. infantum*. (a) Gráfico de dispersão para a taxa de infecção dos controles das placas de ensaio, como indicado na legenda: controle negativo, ou DMSO (verde), controle positivo, ou anfotericina B (vermelho) e controle não infectado (azul). Cada ponto representa um poço individual, das placas de compostos, preparadas nos dois experimentos independentes. (b) Curvas dose-resposta para a anfotericina B (direita) e valores de Z'-factor obtidos das placas contendo o composto referência e os compostos testados (6 placas/dia). A linha pontilhada

representa 2x o desvio padrão. Como indicado na legenda: dia 1 (azul) e dia 2 (vermelho).
 (c) Correção dos dados de atividade normalizada para as duas rodadas de experimento, como indicado na legenda: controle negativo (verde), controle positivo (vermelho), controle não – infectado (azul) e amostras (cinza).

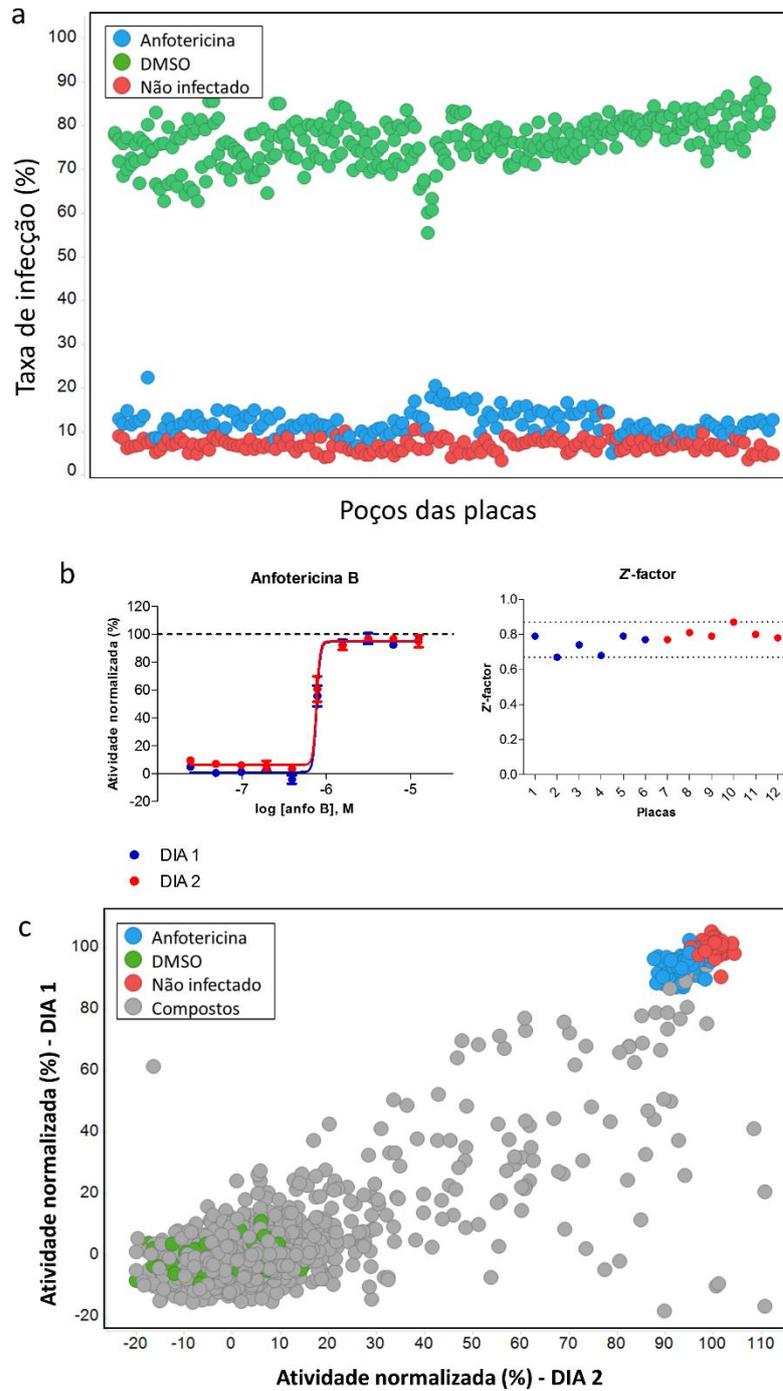


Figura 46. Triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de *L. donovani*. (a) Gráfico de dispersão para a taxa de infecção dos controles das placas de ensaio, como indicado na legenda: controle negativo, ou DMSO (verde), controle positivo, ou anfotericina B (vermelho) e controle não infectado (azul). Cada ponto representa um poço individual, das placas de compostos, preparadas nos dois experimentos independentes. (b) Curvas dose-resposta para a anfotericina B (direita) e valores de Z'-factor obtidos das placas contendo o composto referência e os compostos testados (6 placas/dia). A linha pontilhada representa 2x o desvio padrão. Como indicado na legenda: dia 1 (azul) e dia 2 (vermelho). (c) Correção dos dados de atividade normalizada para as duas rodadas de experimento, como indicado na legenda: controle negativo (verde), controle positivo (vermelho), controle não – infectado (azul) e amostras (cinza).

Os cinquenta compostos com maior atividade contra as cepas estudadas foram selecionados para ensaios mais detalhados (**Figura 47**). Para a seleção, consideramos a média dos valores de atividade normalizada obtidos nos dois experimentos independentes. Uma vez que o perfil geral de atividade dos compostos para *L. donovani* foi inferior ao obtido para *L. infantum*, aplicamos um menor *cut-off* de citotoxicidade para *L. donovani*, com a finalidade de selecionar compostos com atividade acima de 40% para essa espécie. Nesse caso, foi definido o *cut-off* de citotoxicidade em: 0,8 para *L. infantum* e 0,5 para *L. donovani*.

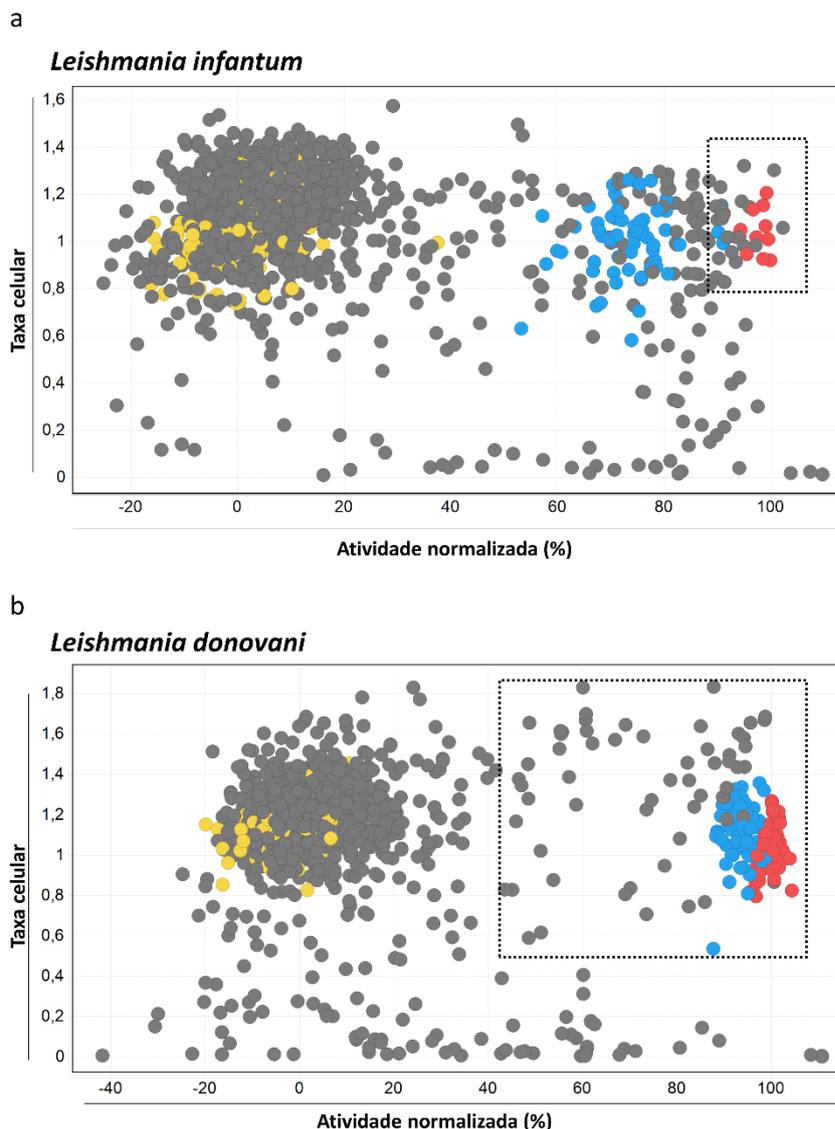


Figura 47. Perfil de atividade dos *hits* selecionados da campanha de triagem primária da biblioteca LOPAC® contra o modelo de infecção de *Leishmania*. (a) e (b) Triagem primária da biblioteca LOPAC contra o modelo de alto conteúdo de *Leishmania*. Os pontos representam a média dos valores de atividade normalizada (inibição em relação aos controles) e taxa de célula hospedeira para cada poço testado. Os compostos selecionados da triagem primária estão localizados no interior do quadrado pontilhado. Os pontos indicam a média de dois ensaios independentes, onde as cores representam: controles infectados não tratados (amarelo), controles infectados tratados (azul), controles não infectados (vermelho) e amostras (cinza).

No total, 76 *hits* foram selecionados, dos quais 24 moléculas foram ativas contra as duas espécies. Enquanto que a *L. infantum* apresentou maior sensibilidade à biblioteca (média

de atividade dos *hits* selecionados = 99%) (**figura 48**), amostras selecionadas no ensaio contra *L. donovani* mostraram atividade com média de 63,5%, variando de 40 a 90% de redução de infecção. Considerando a citotoxicidade, apesar de termos aplicado *cut-off* espécie-dependente, a maioria dos *hits* selecionados da triagem primária apresentou valores de taxa celular acima de 0,9, em ambos os modelos.

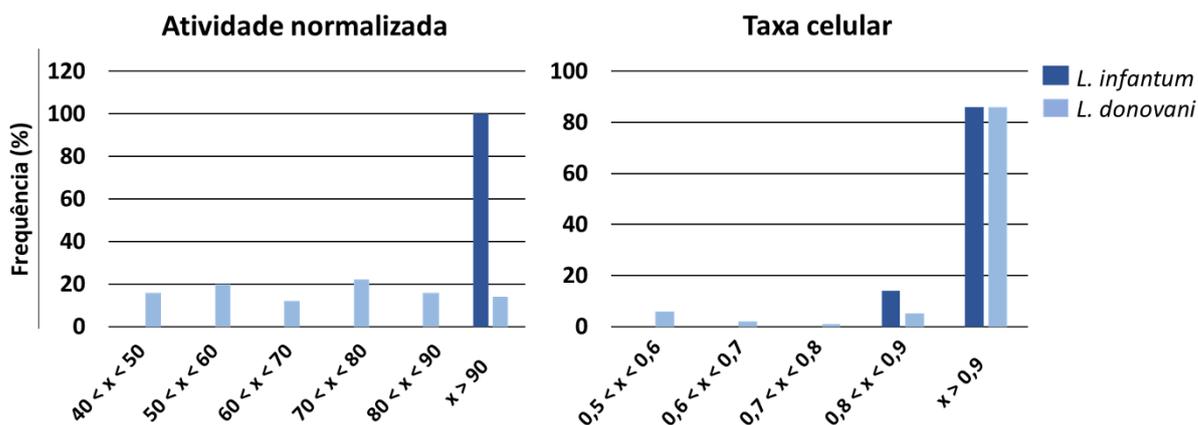


Figura 48. Perfil de frequência dos *hits* selecionados em relação a atividade e citotoxicidade. Distribuição dos *hits* de *Leishmania* por atividade normalizada (esquerda) e taxa celular (direita), como indicado na legenda. “X” refere-se à atividade normalizada e à taxa celular dos *hits*, para os diferentes gráficos.

Por fim, nós investigamos o perfil terapêutico dos *hits* selecionados em ambos os modelos, objetivando identificar novas classes de agentes anti-*Leishmania* potenciais. Comparações entre o painel geral dos compostos da biblioteca e o perfil de compostos selecionados nas triagens contra *Leishmania* não mostraram diferença na frequência dos compostos: como esperado, a maioria dos compostos são relacionados com neurotransmissão (66%), seguidos por moléculas associadas a processos de sinalização celular (10%), fosforilação (8%), canais de íons (7%) e apoptose/ciclo celular (5%) (**Figura 49**).

Considerando os compostos relacionados à neurotransmissão, é reportado o reposicionamento dessa classe terapêutica no campo das doenças infecciosas. Através da triagem de uma biblioteca contendo moléculas licenciadas para uso, Dyllal e colaboradores identificaram inibidores de receptores de dopamina com atividade contra o vírus agente da Síndrome Respiratório do Oriente Médio (Dyllal *et al.*, 2014). Outro trabalho relata o efeito de antidepressivos na restauração de sensibilidade ao antimalárico cloroquina em cepas resistentes

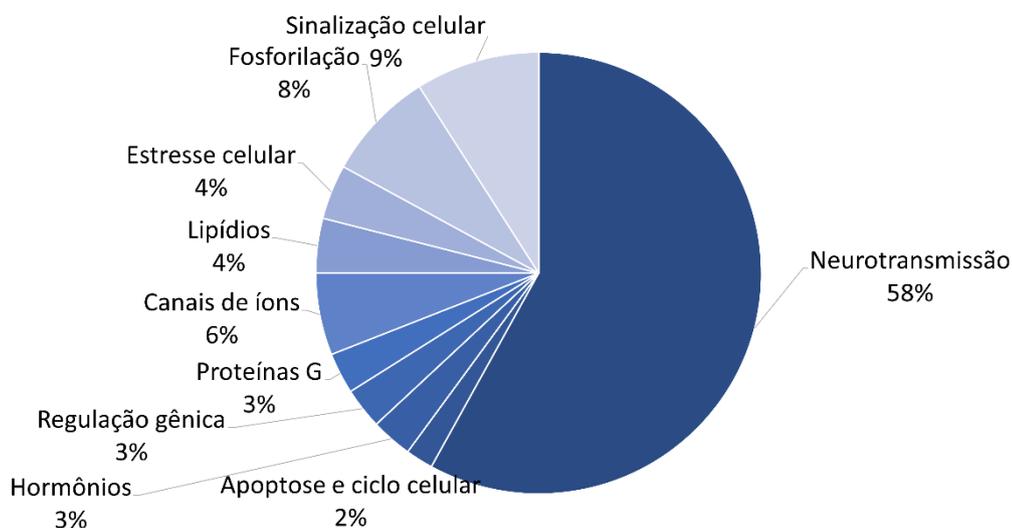
de *Plasmodium falciparum* (Taylor *et al.*, 2000). Especificamente para *Leishmania*, diferentes grupos de pesquisa vem demonstrando o potencial terapêutico de antidepressivos contra o parasita, em modelos experimentais. É o caso do composto imipramina, o qual foi capaz de afetar o transporte de prótons na membrana celular bem como causar apoptose em promastigotas (revisado por Sarkar & Manna, 2015).

A classe terapêutica associada a processos de sinalização celular engloba moléculas com um vasto perfil de atividade, sendo associada a mecanismos de resposta imune, produção de espécies reativas de oxigênio, *heat shock proteins*, proteínas ligadas a multirresistência e estruturas do citoplasma (por exemplo, o citoesqueleto). Vários desses processos já foram evidenciados como potenciais alvos anti-*Leishmania*; um recente trabalho, por exemplo, demonstra o papel essencial de uma pequena *heat shock protein* na infectividade do parasita bem como na sensibilidade a químicos e temperatura (Hombach *et al.*, 2014).

Transportadores de íons e proteínas envolvidas no processo de fosforilação são extensivamente estudados em *Leishmania* e outros parasitas intracelulares e já foram propostos como potenciais alvos para moléculas. Nesse contexto, pode-se salientar o papel das quinases (e seus inibidores), uma vez que as mesmas apresentam atividade regulatória em uma vasta gama de processos, tais como diferenciação e crescimento celular, sobrevivência das formas amastigotas no interior de macrófagos, ciclo celular e apoptose (revisado por Singh, Humar & Sing, 2012). Recentemente, Durieu e colaboradores realizaram uma triagem baseada em alvo, utilizando o modelo enzimático da caseína-quinase 1 isoforma 2 de *Leishmania*, para identificação de compostos com atividade antiparasitária. A biblioteca foi testada nos modelos enzimáticos de *Leishmania* e de mamíferos, para avaliação da especificidade das moléculas e, então, os compostos seletivos foram testados em modelos *in vitro* de infecção do parasita para confirmação da atividade. Como resultado, dois compostos foram identificados com atividade anti-*Leishmania*, que parecem ter essa enzima como primeiro e principal alvo (Durieu *et al.*, 2016).

Apesar das classes terapêuticas encontradas no nosso trabalho já terem sido abordadas na literatura para o parasita em questão, algumas delas ainda são pouco exploradas e certamente podem apresentar uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos contra *Leishmania*. Além disso, a identificação/validação de classes terapêuticas pode ser interessante para geração de bibliotecas focadas.

Perfil terapêutico da biblioteca LOPAC



Perfil terapêutico dos hits da *Leishmania*

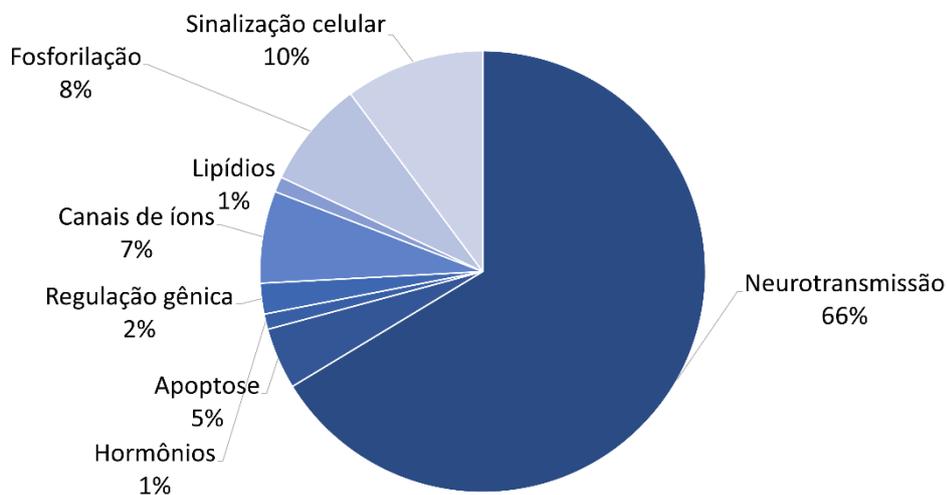


Figura 49. Perfil terapêutico geral da biblioteca LOPAC versus perfil terapêutico dos *hits* selecionados da triagem primária contra os modelos de *Leishmania*.

Os 76 compostos selecionados do *screening* primário foram re-testados em ensaios de dose-resposta, para determinar os valores de EC₅₀, CC₅₀, índice de seletividade e atividade máxima. Foi possível identificar compostos ativos contra as duas espécies de *Leishmania*, com

eficácia acima de 70% e potência relativamente moderada. Para *L. infantum*, 11 compostos apresentaram atividade promissora contra o parasita, com valores de $EC_{50} < 10\mu\text{M}$ e índice de seletividade ≥ 5 (**tabela 10**); no entanto, considerando *L. donovani*, apenas um composto (CB 1954) apresentou as mesmas características.

Tabela 10. Atividade leishmanicida dos compostos selecionados da biblioteca LOPAC em da triagem confirmatória.

Composto	<i>L.infantum</i>			<i>L. donovani</i>		
	EC ₅₀ (μM)	I.S.	A.M. (%)	EC ₅₀ (μM)	I.S.	A.M. (%)
Anfotericina	2,0	>25,0	100,0	1,0	>50,0	100,0
1	6,9	>7,3	100,0	n.d.	-	n.d.
2	7,5	>6,7	100,0	26,5	>1,9	63,8
3	9,8	>5,1	100,0	n.d.	-	37,0
4	4,1	>12,2	87,9	3,7	>13,5	79,8
5	6,5	>7,7	97,2	n.d.	-	n.d.
6	8,4	>6,0	92,0	38,2	>1,4	78,1
7	7,7	>6,6	100,0	25,6	>2,0	89,6
8	4,9	>10,2	84,1	n.d.	-	n.d.
9	7,9	>6,3	97,9	27,4	>1,8	79,0
10	9,7	>5,3	100,0	43,3	>1,2	57,9
11	9,1	>5,6	100,0	49,1	>1,0	48,6

n.d.: valor não determinado, uma vez que a curva dose-resposta não foi gerada. Dados representam a médias de valores obtidos em dois experimentos independentes. I.S.: índice de seletividade. A.M.: atividade máxima (%).

Lista de compostos: **1**: 2-Bromo- α -ergocryptine methanesulfonate salt; **2**: Clomipramine hydrochloride; **3**: Cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate; **4**: CB 1954, **5**: Dilazep dihydrochloride, **6**: Fluphenazine dihydrochloride; **7**: p-Fluorohexahydro-sila-difenidol hydrochloride; **8**: MDL 28170; **9**: Maprotiline hydrochloride, **10**: KB-R7943 and **11**: SKF-95282 dimaleate salt.

As amostras foram então encaminhadas para priorização dos *hits*, para selecionar os compostos que seriam avaliados em ensaios secundários, com diferentes cepas do complexo

de *Leishmania donovani*, com diferentes formas do ciclo de vida do parasita e com os modelos de *T.brucei* e *T.cruzi*. Os filtros aplicados para priorização de compostos nesse momento foram: perfil de atividade leishmanicida, características químicas e terapêuticas da molécula, facilidade de compra/entrega do composto para re-teste e custo do composto. Primeiramente, os compostos **Clomipramine hydrochloride**, **Fluphenazine dihydrochloride** e **Maprotiline hydrochloride** foram descontinuados, pois possuem seu uso regulamentado pela portaria 344 da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, sendo proibida a importação dos mesmos para o Brasil. Além disso, os compostos **p-Fluorohexahydro-sila-difenidol hydrochloride** e **KB-R7943** foram excluídos das próximas etapas por apresentarem elevado custo. Por fim, os compostos **2-Bromo- α -ergocryptine methanesulfonate salt** e **Clomipramine hydrochloride** não foram seguidos às etapas adiante por apresentarem moléculas planares ou complexas, com substituintes associados a toxicidade (por exemplo, as duas moléculas apresentaram grupo nitro nas estruturas químicas). Portanto, desse set, quatro compostos foram selecionados: **CB1954**, **MDL 28170**, **Dilazep** e **SKF-95282** (figura 50).

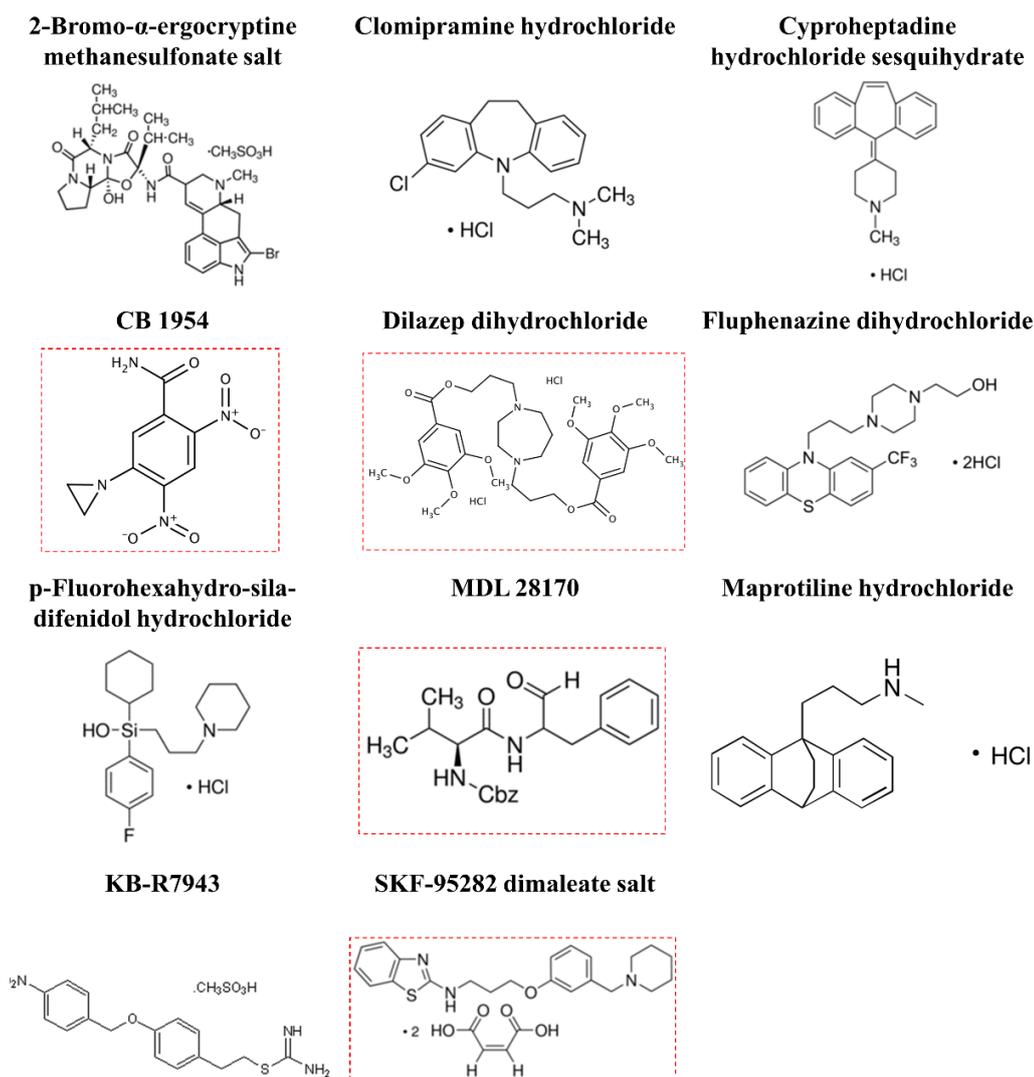


Figura 50. Estrutura química dos compostos selecionados a partir da triagem da biblioteca LOPAC[®]. Os quadros pontilhados vermelhos destacam os compostos selecionados para investigações mais detalhadas.

4.22. Estudo dos compostos selecionados do screening da biblioteca LOPAC quanto ao perfil farmacológico e químico, possíveis alvos e mecanismos de ação

Com o objetivo de melhor investigar os compostos selecionados, dados disponíveis de diferentes fontes (literatura científica, base de dados de predição de alvos e interações com proteínas, plataforma de predição de perfil farmacocinético) foram organizados para construção de um perfil a respeito das moléculas. As buscas foram baseadas em: estrutura química,

informações farmacocinéticas, testes biológicos descritos, alvos potenciais, entre outros parâmetros. As informações para cada composto estão detalhadas nas tabelas 11 a 14.

Como a biblioteca LOPAC[®] é constituída de compostos biologicamente ativos, os quais já são comercializados ou estão em fase pré-clínica ou clínica para diferentes fins terapêuticos, foi possível encontrar uma gama relevante de informações a respeito das moléculas selecionadas em nossas triagens. No entanto, quando alguns parâmetros não estavam disponíveis na literatura, usou-se ferramentas de predição *in silico*, principalmente, em termos de características farmacocinéticas e possíveis alvos.

Abaixo, o perfil gerado das moléculas selecionadas:

4.22.1. CB1954

O composto CB 1954, uma molécula com núcleo nitroaromático, foi primeiramente introduzido em estudos de terapia de câncer, no fim da década de 80 (Knox *et al.*, 1988). Trata-se de uma pró-droga, que após passar por um processo de bio-redução catalizado por enzimas nitroreduases, é convertida à espécie reativa e tóxica 5-(aziridina-1-il)-4-hidroxilamino-2-nitrobenzamida, a qual atua na formação de *cross-linking* nas fitas de DNA, afetando negativamente a transcrição de genes e induzindo processos de apoptose (Chung-Faye *et al.*, 2001; Knox *et al.*, 1991). Seu uso, juntamente com outros compostos nitroaromáticos, vem sendo explorado em uma ampla variedade de indicações incluindo: doença de Parkinson, angina e insônia. Para tratamento de doenças parasitárias, inclusive, pode-se salientar o uso licenciado da nitazoxanida contra giardíases e criptosporidíase, bem como o uso do metranidazol para tratamento de tricomoníase, giardíase e amebíase (revisado por Patterson & Wyllie, 2014; Paulai, Serrano & Tavares, 2009).

Especificamente no campo de quimioterapia para tripanossomatídeos, é bem estabelecido o potencial anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* dessa classe química, dando destaque ao tratamento da Doença de Chagas, o qual é atualmente baseado em apenas dois compostos nitroheterocíclicos: benznidazol e nifurtimox, ambos em uso a mais de quarenta anos. Apesar de terem gerado alta taxa de cura na fase aguda da doença (de 60 a 80%), ainda sim apresentam limitações no tratamento, tais como efeitos adversos severos, genotoxicidade, neurotoxicidade, baixa eficácia contra algumas cepas de *T.cruzi* e cura controversa na fase crônica (revisado por Urbina, 2015). Diversos regimentos de administração vem sendo investigados na tentativa de desenvolver terapias mais seguras e eficazes com esses medicamentos (Antunes *et al.*, 2016; Molina *et al.*, 2014). Outros exemplos são os ensaios

clínicos envolvendo o uso de combinação terapêutica de nifurtimox e eflornitina, no tratamento da Doença do Sono (Priotto *et al.*, 2009)

Apesar das questões constantes em relação a toxicidade dos compostos nitroaromáticos (Paulai, Serrano & Tavares, 2009), essas moléculas continuam como foco de interesse para o desenvolvimento de novas alternativas para terapia de doenças causadas por tripanossomatídeos, sendo que diversos estudos *in vitro* e *in vivo* tem evidenciado o efeito terapêutico da classe, incluindo do composto CB 1954. Por exemplo, trabalhos realizados por Voak *et al.*, 2012, demonstraram que o composto e outras moléculas com núcleo nitrobenzamida reduziram significativamente os níveis de infecção *in vitro*, causadas por *Leishmania major*, com compostos que resultaram em valores de EC₅₀ abaixo de 100 nM, para as formas intracelulares do parasita. Além disso, no mesmo trabalho, foi conclusivamente demonstrada a associação das enzimas nitroreduases com a atividade anti-*Leishmania* dos nitrocompostos, uma vez que parasitas de *L.major LmNTR^{+/-}* (ou seja, expressando menores níveis da enzima nitroreduase) mostraram-se sutilmente resistente ao set de compostos estudados, quando comparado aos parasitas selvagens (Voak *et al.*, 2014). O mesmo perfil de atividade foi observado para *L. donovani*, quando exposta ao composto nitroimidazol fexinidazol (Susan Wyllie, Patterson & Fairlamb, 2013).

Os compostos nitroheterocíclicos, incluindo o CB1954, necessitam passar por ativação enzimática mediada por nitroreduases. Considerando a sensibilidade ao oxigênio, a necessidade do cofator flavina e os produtos de redução, essas enzimas são agrupadas em duas classes: (i) as nitroreduases do tipo I, denominadas “insensíveis ao oxigênio”, as quais catalisam reações de redução sem a necessidade de moléculas de oxigênio e não resultam em produção de espécies reativas (presente em bactérias, fungos e protozoários) (Gavin *et al.*, 1966), e (ii) as nitroreduases do tipo II, ou “sensíveis ao oxigênio”, as quais reduzem o grupo nitro de moléculas- substrato, produzindo ânions superóxidos, através de reações com moléculas de oxigênio (presente na maioria dos eucariotos) (revisado por Mitchell & Minchin, 2008). Essas diferenças nas enzimas de tipo I e tipo II parecem ser a explicação para a toxicidade seletiva desses compostos para as células do parasita, em comparação com as células hospedeiras, uma vez que apenas em reações catalisadas por nitroreduases do tipo I ocorre a formação de um derivado -NHOH, o qual é precursor de intermediários reativos que podem intercalar ao DNA, formando *crosslinking* (Christofferson & Wilkie, 2009; Knox *et al.*, 1991). As características gerais do composto estão descritas na tabela a seguir:

Tabela 11. Perfil farmacológico do composto CB1954.

CB 1954 - tretazicar	
Aprovado?	Não. Composto em fase clínica experimental
Informações gerais	Agente anticâncer, atuando como inibidor da replicação de DNA.
Classificação	Pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como dinitroanilinas.
Perfil terapêutico	Sinalização celular
Mecanismo de ação	O composto atua como uma pró-droga, a qual é ativada por enzimas oxido/nitroredutases. O produto é então responsável pelo desencadeamento de uma série de reações enzimáticas, resultando na inibição da replicação do DNA e na indução de apoptose.
Farmacocinética – não disponível.	Absorção intestinal: SIM Barreira hemato-encefálica: SIM
Predição em: Swiss ADME	Permeabilidade Caco – 2: NÃO Toxicidade: AMES Não-carcinogênico Toxicidade aguda em ratos: 2,4518 LD50, mol/kg
Alvos potenciais	<i>Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase</i> ^{1,2,3} <i>Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]</i> ⁴ <u>Intercalante de DNA</u>
Descrito para <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> or <i>T. brucei</i> ?	Sim. Ensaios <i>in vitro</i> e enzimáticos para <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>T. brucei</i> ^{5,6}

1. (Cobb *et al.*, 1969) 2. (Roberts, Friedlos & Knox, 1986) 3. (Christofferson & Wilkie, 2009) 4. (Fu, Buryanovskyy, & Zhang, 2005) 5. (Voak *et al.* 2014) 6. (Bot *et al.*, 2010)

4.22.2. MDL 28170

Calpaínas são cisteína-proteases intracelulares dependentes de cálcio responsáveis pela proteólise de proteínas, atuando principalmente em processos de modificação pós-traducionais. Nesse contexto, uma ampla gama de proteínas celulares são reconhecidas como substratos para essas enzimas, tais como: proteínas estruturais do citoesqueleto, proteínas envolvidas em eventos de sinalização, fatores de transcrição e transportadores/receptores de membranas. Como consequência, a atividade catalítica da enzima tem papel importante em diversos processos fisiológicos, incluindo adesão e migração celular, diferenciação, transdução de sinal, proliferação celular, ciclo celular e apoptose (revisado por Sorimachi, Ishiura & Suzuki, 1997). A má regulação dessas proteínas está associada a desordens patológicas humanas severas, incluindo distrofia muscular (Jia *et al.*, 2001; Vainzof *et al.*, 2003), câncer (Moretti *et al.*, 2009; Roperto *et al.*, 2010; Storr *et al.*, 2014), diabetes (Horikawa *et al.*, 2000; Jayaprathacheekurthy, Rambabu, & Kumar 2016; Randriamboavonjy & Fleming, 2010) e doenças neurodegenerativas (Medeiros *et al.*, 2012; Zempel *et al.*, 2010).

Nos tripanossomatídeos, a construção do genoma completo da *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. brucei* resultou na descoberta de diversas cisteína-proteases, antes desconhecidas. Dessa forma, uma família de proteínas relacionadas a calpaína foi descrita, sendo que foram identificados 12 genes em *T. brucei*, 15 em *T. cruzi* e 17 em *L. major* (Atkinson, Babbitt, & Sajid, 2009; Ersfeld, Barraclough, & Gull, 2005). Diferente da maioria dos organismos, que possuem gene único para calpaína, nos parasitas tripanossomatídeos, podemos observar a expansão desses genes, refletindo a plasticidade dos parasitas a diferentes ambientes/condições bem como a importância das enzimas no ciclo de vida do parasita. Além disso, acredita-se que tais enzimas estejam relacionadas a processos e funções específicas dos parasitas, como a patogenicidade (Cazzulo, 2002; revisado por McKerrow *et al.*, 1993; revisado por Olego-Fernandez *et al.*, 2009). Especificamente para parasitas do gênero *Leishmania*, diversos estudos tem evidenciado o papel crucial dessas enzimas no ciclo de vida do parasita, na interação parasito-hospedeiro e na manifestação da doença. Por exemplo, um trabalho feito com isolados de pacientes da Índia demonstrou que genes específicos são diferentemente expressos em parasitas de *Leishmania* isolados de pacientes com leishmaniose *post kala-azar* em comparação com aqueles de pacientes com leishmaniose visceral, incluindo uma pequena proteína similar a calpaínas (Salotra *et al.*, 2006). Além disso, comparações proteômicas entre isolados sensíveis e resistentes a compostos antimoniais revelaram que a morte celular programada em parasitas resistentes foi alterada, sendo esse fenômeno associado a uma enzima relacionada à calpaína

(Vergnes *et al.*, 2006). Por fim, outros trabalhos ilustram a expressão dessas enzimas de forma altamente regulada em diferentes ciclos de vida do parasita (Arnoult *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2003). Nesse contexto, é razoável sugerir que a família das calpaínas representa um alvo terapêutico interessante para desenvolvimento de inibidores potenciais, que possuam atividade antiparasitária. De fato, diversos compostos estão em fase de teste, incluindo o composto MDL28170, o qual foi reportado como agente anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi*. d'Avila-Levy e colegas demonstraram que, após 48 horas de exposição, o composto levou a uma redução significativa no crescimento de *L. amazonensis*, apresentando uma concentração inibitória de 50% em 23,3 μ M. O inibidor ainda promoveu alterações morfológicas significativas, podendo ser observado promastigotas de tamanho reduzido e de formato arredondado na cultura (D'Avila-Levy *et al.*, 2006). Outro trabalho, ainda, mostrou o efeito do composto na indução de marcadores de apoptose no parasita (F. A. Marinho *et al.*, 2014). Além disso, MDL 28170 foi associado a uma menor viabilidade e infectividade do parasita *T. cruzi*, em modelos *in vitro* (Ennes-Vidal *et al.*, 2010), ocasionou uma menor adesão do parasita ao trato digestório do vetor, afetou negativamente o processo de metaciclogênese e promoveu efeitos ultraestruturais significativos em organelas como o complexo de Golgi (Ennes-Vidal *et al.*, 2011). A descrição do composto MDL28170 está detalhadamente descrita na **tabela 12**.

Tabela 12. Perfil farmacológico do composto MDL 28170.

MDL 28170 - Calpain Inhibitor III	
Aprovado?	Não. Droga em estudo clínico experimental
Informações gerais	Composto inibidor de Calpaína, uma cisteína – protease dependente de Ca ²⁺ , que vem sendo associada a processos de apoptose celular.
Classificação	-
Perfil terapêutico	Ciclo celular
Mecanismo de ação	Inibição de processos de proteólise mediados por calpaína, os quais são responsáveis pela maioria das modificações pós-traducionais que influenciam funções como adesão celular, migração, proliferação e apoptose. Em <i>L amazonensis</i> , induz a expressão de marcadores de apoptose na membrana celular.
Farmacocinética – não disponível.	Absorção intestinal: SIM Barreira hemato-encefálica: NÃO
Predição em: SwissADME	Permeabilidade Caco-2: SIM Toxicidade AMES: NÃO Não carcinogênico Toxicidade aguda em ratos: LD ₅₀ = 2,16 mol/kg
Potenciais alvos	Calpaína I e Calpaína II ¹
Descrito para <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> or <i>T. brucei</i> ?	Sim. Para <i>Leishmania</i> e <i>T. cruzi</i> ^{2,3,4} .

1.(Mehdi, 1991). / 2. D’Avila-Levy et al., 2006. 3. Ennes-Vidal *et al.*, 2010. 4. Ennes-Vidal *et al.*, 2011

4.22.3. Dilazep

Dilazep, um dihidroclorido inibidor de transporte de nucleosídeos, atua principalmente no bloqueio da absorção da adenosina (Griffith & Jarvis, 1996; Van Belle, 1993). Foi primeiramente desenvolvido para tratamento de angina e, atualmente, é amplamente utilizado em países da Europa e no Japão. Atua como um vasodilatador e inibidor de agregação plaquetária (Colli *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 1991), tendo atividade em vasos renais (Kawabata *et al.*, 2002), cerebrais (Izumo *et al.*, 1999; Kawagoe *et al.*, 1992) e coronários (Shuralyova *et al.*, 2004; Van Belle, 1993) e, por isso, vem sendo empregado no tratamento de pacientes com doenças cardíacas, isquemia cerebral e disfunção renal, devido a melhora na irrigação sanguínea (Marzilli *et al.*, 1985; Opartkiattikul *et al.*, 1997).

Estudos reportam que a atividade do composto se dá pela inibição de proteínas integrais de membrana, denominadas transportadores equilibrativos de nucleosídeos (do inglês, *equilibrative nucleoside transportes*), as quais são responsáveis pela difusão facilitada de moléculas de nucleosídeos através da membrana celular (revisado por Molina-Arcas, Casado, & Pastor-Anglada, 2009; revisado por Noji, Karasawa, & Kusaka, 2004). Foi demonstrado que proteínas mutantes apresentam uma sensibilidade dez vezes menor aos inibidores dilazep e dipiridamol, quando comparadas às proteínas selvagens (Visser *et al.*, 2002). Ainda, estabelecido que existem duas classes gerais de proteínas equilibrativas de nucleosídeos (Tipo 1 e tipo 2), diferentes trabalhos sugerem que a atividade desses composto parece ser específica para o tipo 1 da enzima (Kiss *et al.*, 2000; Playa *et al.*, 2014).

No campo das doenças infecciosas, diversos trabalhos tem demonstrado o efeito antiviral do composto. Considerando o vírus da hepatite c, dilazep a 10 μ M foi capaz de inibir a replicação viral em 50%, comparado ao controle não tratado, sendo sua atividade relacionada ao bloqueio de processos de entrada do vírus na célula hospedeira (Hu *et al.*, 2014). Outro exemplo é estudo realizado por Zeng e colaboradores, onde foi mostrado que o composto reativou vírus latentes de HIV de forma eficiente e segura, processo esse importante para a completa eliminação do reservatório viral das células (Zeng *et al.*, 2014). Por fim, outras pesquisas evidenciam o potencial da molécula em outros modelos parasitários, como o de *Plasmodium falciparum* (Gero *et al.*, 1989).

Para os tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*, o transporte de nucleosídeos (e as proteínas envolvidas nesse processo) exerce um papel central na bioquímica do parasita, uma vez que esses protozoários não são capazes de realizar a biossíntese de purinas, sendo, portanto, fortemente dependentes da absorção de reservas da célula hospedeira (revisado por Landfear, 2001). Dois transportadores foram descritos para promastigotas de *L. donovani*, que se diferem quanto a estrutura e seletividade a nucleosídeos, não havendo sobreposição de atividade:

enquanto o primeiro transportador realiza o carregamento de moléculas de inosina, guanosina e seus análogos, o segundo transportador é responsável pela passagem de adenosina e seus análogos, pirimidina, uridina, citidina e timidina, através da membrana plasmática (Aronow, Kaur, McCartan, & Ullman, 1987). Evidências genéticas e funcionais sugerem que o sistema de transporte de nucleosídeos é altamente conservado entre as espécies de *Leishmania* (Alzahrani *et al.*, 2017), sendo que a sequência proteica dos transportadores do parasita apresentou apenas 30% de identidade quando comparada à sequência da proteína presente em mamíferos (Stein, 2003). Tais transportadores, juntamente com as diversas proteínas envolvidas no metabolismo de nucleosídeos, exercem papel crucial em diversos eventos biológicos do parasita tais como metaciclo gênese (Serafim *et al.*, 2012), patogenicidade (Kuhlmann *et al.*, 2017) e resistência a drogas (Moreira & Murta, 2016), e, por isso, são frequentemente apontados como potenciais alvos terapêuticos. No entanto, diferente de nossos resultados, em ensaios previamente publicados, foi reportado que dilazep e outros inibidores de transporte de nucleosídeos, em concentração de 10 μM , não afetaram o transporte dessas moléculas em *Leishmania donovani* (Ogbunude, al-Jaser, & Baer, 1991). As informações do composto Dilazep estão descritas na **tabela 13**.

Tabela 13. Perfil farmacológico do composto Dilazep.

Dilazep	
Aprovado?	Sim.
Informações gerais	O composto é um vasodilatador coronário, utilizado para tratamento de arritmia. Atua como um inibidor de reabsorção de adenosina. Inibidor de agregação plaquetária e transporte membranar de nucleosídeos.
Classificação	Este composto pertence à classe de compostos orgânicos azepinas.
Perfil terapêutico	Neurotransmissão
Mecanismo de ação	O composto atua através da inibição de proteínas transportadoras de nucleosídeos, bloqueando a recaptção de adenosina.
Farmacocinética não disponível.	Absorção intestinal: sim Barreira hemato-encefálica: não
Predição no Swiss	Permeabilidade Caco-2: sim Toxicidade AMES: não Não carcinogênico Toxicidade aguda em ratos: LD ₅₀ = 2,39 mol/kg
Potenciais alvos	<i>Equilibrative nucleoside transporter 1</i> ^{1,2}
Descrito para <i>Leishmania, T. cruzi</i> or <i>T. brucei</i> ?	Sim ³ .

1. (Visser *et al.*, 2002) 2. (Playa *et al.*, 2014) 3. (Carter, Berger, & Fairlamb, 1995).

4.22.4. SKF- 95282

Os receptores histamínicos são uma classe de receptores acoplados à proteína G, os quais possuem a histamina como ligante. Estão amplamente distribuídos nas células humanas, sendo assim, cruciais para diversas vias de transdução de sinal. Existem quatro grupos de receptores, os quais são denominados: **H₁**, responsáveis pela contração do íleo, modulação do ciclo circadiano, vasodilatação sistêmica; **H₂**, associados à aceleração da frequência cardíaca, secreção do ácido gástrico, inibição da síntese de anticorpos, proliferação das células T e produção de citocinas inflamatórias; **H₃**, o qual atua como neurotransmissor do sistema nervoso central, na modulação da produção de histamina pelo organismo, e **H₄**, que apresenta atividade de regulação nos níveis de produção de células brancas do sangue.

Antagonistas anti-histamínicos são fármacos que se ligam seletivamente aos receptores histamínicos e, por competição, impedem a ligação da histamina, bloqueando assim a ativação do receptor. Atualmente, são utilizados para diversas indicações, sendo que os mais tradicionais são prescritos para tratamento de alergias (anti-histamínico H₁), de gastrite e úlceras gástricas (anti-histamínico H₂), de distúrbios de movimento, obesidade, esquizofrenia, anomalias no sono (anti-histamínico H₃) e de condições alérgicas e inflamatórias (anti-histamínico H₄).

Em nosso ensaio de infecção por *Leishmania*, selecionamos o composto SKF-95282, também conhecido como Zolantidine, que é um derivado de benzotiazol, possuindo atividade antagonista potente e seletiva contra os receptores de histamina H₂ (Calcutt *et al.*, 1988). Esse composto vem sendo estudado em diferentes modelos, para melhor entendimento do papel desses receptores em processos fisiológicos e patologias, tais como: colestase (Hasanein, 2011), sensibilidade à dor (Hough, Nalwalk, & Battles, 1990; Wei, Jin, Viisanen, You, & Pertovaara, 2014) e secreção de ácido gástrico (Coruzzi, Adami, Pozzoli, Poli, & Bertaccini, 1994).

No campo de desenvolvimento de fármacos para leishmaniose, Pinto e colaboradores descreveram pela primeira vez a atividade anti-*Leishmania* dos antagonistas histamínicos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Dentre o set de moléculas testadas, o composto cinarizina, um bloqueador de receptor H₁, apresentou um valor promissor de EC₅₀ (21 µM) e não mostrou toxicidade contra fibroblastos de camundongo. Além disso, a formulação lipossomal do composto, administrada por rota intraperitoneal durante oito dias, reduziu em 54% a carga parasitária no fígado, quando comparado aos controles não tratados (Pinto, da Costa-Silva & Tempone, 2014).

Outra forma de analisarmos o composto Zolantidine é através da classe química que a molécula pertence; nesse caso, um derivado de benzotiazol que se caracteriza por um composto aromático heterocíclico, com fórmula química C_7H_5NS . Trata-se de um núcleo quimicamente atrativo, uma vez que apresentaram diversos sítios de reação para síntese de compostos análogos (revisado por Achaiah *et al.*, 2016). Por isso, são moléculas amplamente exploradas em termos de desenvolvimento de novas alternativas de fármacos, com uma expressiva gama de atividade biológica: antibacteriana (Sahu *et al.*, 2012), antifúngica (Alang *et al.*, 2010), antiprotozoária (Ongarora *et al.*, 2012), anti-inflamatória (Mehta & Batra, 2016; Santagati *et al.*, 1994) e antineoplásica (D'Angelo *et al.*, 2011; Lindgren *et al.*, 2014). Especificamente para o modelo de *Leishmania*, a classe está sendo foco de diferentes grupos de pesquisa, mostrando resultados promissores. Exemplo disso, é o trabalho realizado por Tapia e colaboradores, no qual derivados de benzoatiazol apresentaram atividade antiparasitária, com valores de EC_{50} na grandeza de nanomolar contra promastigotas de *Leishmania* (Tapia *et al.*, 2002). Em outro estudo, uma atividade moderada contra amastigotas intracelulares foi obtida a partir de uma pequena biblioteca desses compostos (EC_{50} aproximadamente de 20 μM) (Fazal *et al.*, 2015). As informações a respeito do composto estão apresentadas na tabela a seguir.

Tabela 14. Perfil farmacológico do composto SKF- 95282.

SKF-95282 dimaleate salt	
Aprovado?	Não.
Informações gerais	O composto é um potente antagonista de receptor de histamina H ₂ .
Classificação	O composto consiste em um derivado de benzotiazol.
Perfil terapêutico	Neurotransmissão
Mecanismo de ação	O composto atua como um antagonista de receptor de histamina, o qual tem como principal função a estimulação da atividade da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, a transdução de sinal celular.
Farmacocinética não disponível.	– Absorção intestinal: Não Barreira hemato-encefálica: Sim
Predição no SwissADME	Permeabilidade Caco-2: Não Toxicidade AMES: Não Não carcinogênico Toxicidade aguda em ratos: LD50 = 2,59, mol/kg
Potenciais alvos	Receptor histamínico H ₂ ^{1,2}
Descrito para <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> or <i>T. brucei</i> ?	Não.

1.(Calcutti *et al.*, 1988) 2. (Coruzzi *et al.*, 1994).

4.23. Avaliação dos *hits* selecionados da triagem da biblioteca LOPAC no painel de cepas estabelecido

Os quatro compostos selecionados da triagem da biblioteca LOPAC foram adquiridos novamente e avaliados em um painel de cepas viscerais de *Leishmania*, considerando ambas as formas do ciclo de vida do parasita: a fase de promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares (**figura 51**).

Os compostos **CB 1954** e **SKF - 95282** apresentaram alta eficiência contra todas as cepas testadas, nas duas formas de vida do parasita, alcançando atividades máximas que variaram de 60 a 100%. Em contrapartida, os compostos **Dilazep** e **MDL 28170** foram capazes de inibir o crescimento das formas de promastigotas, com eficiência próxima a 100%; enquanto que, contra as formas de amastigotas intracelulares, apresentaram uma atividade dependente da cepa, sendo que o composto **MDL 28170** teve atividade expressiva apenas contra a cepa de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 (cerca de 80%). De forma geral, os compostos mostraram uma maior eficiência nas formas promastigotas; no entanto, para o composto **CB1954**, as atividades observadas nas duas fases do ciclo celular foram mais consistentes, para todos os representantes do parasita *Leishmania*.

Em termos de potência dos compostos, foi possível observar um amplo espectro de atividade, cepa a cepa e para diferentes fases do ciclo de vida do parasita. Para um mesmo composto, exceto para *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046, os valores de EC_{50} obtidos no ensaio com promastigotas foram significativamente mais baixos, quando comparados aos valores encontrados para as formas intracelulares, sendo que para o composto **MDL 28170** foi possível gerar curva de atividade apenas contra amastigotas de *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046 ($EC_{50} = 0,72 \mu\text{M}$). Ainda considerando as formas de parasitas intracelulares, para o composto **Dilazep**, valores de EC_{50} foram calculados apenas para três cepas do grupo estudado, os quais variaram de 13,5 a 80 μM .

Já para o composto **SKF - 95282**, curvas de dose-resposta foram geradas contra as duas formas de vida do parasita, para todas as cepas testadas, sendo que nos ensaios de promastigotas extracelulares, obtivemos valores de EC_{50} bastante consistentes, com média de 6,7 μM . Para amastigotas intracelulares, com exceção da *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV, o composto apresentou potência alta ou relativamente moderada, a qual sofreu maior variação, dependente da cepa (entre 5,2 – 37,7 μM).

Dentre as moléculas estudadas, a de potencial mais promissor foi o composto **CB1954**, uma vez que apresentou alta eficiência (> 70%) contra todas as cepas estudadas, nas duas formas do ciclo de vida, e alta potência, com valores de EC_{50} menores que 9 μM e 4,5 μM , contra amastigotas intracelulares e promastigotas, respectivamente. Nenhuma das amostras químicas apresentou citotoxicidade na célula hospedeira THP-1, para as concentrações testadas.

Dois pontos importantes devem ser discutidos aqui: a diferença de atividade entre as formas do parasita e a variação de atividade entre cepas/espécies viscerais. De maneira geral, os compostos foram mais ativos contra as formas de promastigotas do que contra os amastigotas, dados que corroboram com resultados previamente reportados. Esse perfil pode ser explicado pelo fato de que, considerando os parasitas intracelulares, a droga necessita atravessar diversas membranas da célula e, talvez, do parasita, para alcançar seu alvo terapêutico. Além disso, amastigotas de *Leishmania* residem no vacúolo parasitóforo, um compartimento bastante ácido (pH ~ 5,5), o que poderia influenciar na estabilidade da droga (Field *et al.*, 2017).

O mesmo perfil de variação de atividade foi observado para diferentes cepas/espécies, demonstrando assim a importância da avaliação dos compostos em um painel de representantes viscerais. Essas diferenças de atividade podem apresentar implicações clínicas importantes, como revisado por Zulfiqar e colaboradores, os quais discutem que a eficiência terapêutica dos fármacos é dependente da espécie de *Leishmania*, da região geográfica e manifestação clínica e, por isso, os dados experimentais e clínicos não podem/devem ser generalizados (Zulfiqar, Shelper & Avery, 2017).

Apesar de parte desses compostos já terem sido reportados como agentes leishmanicidas, pela primeira vez, eles foram estudados mais detalhadamente, sendo testados em diferentes cepas e formas do parasita, sob as mesmas condições experimentais. As curvas de dose-resposta dos compostos estudados para as formas de promastigotas e amastigotas intracelulares estão ilustradas na **figura 52** e **figura 53**, respectivamente.

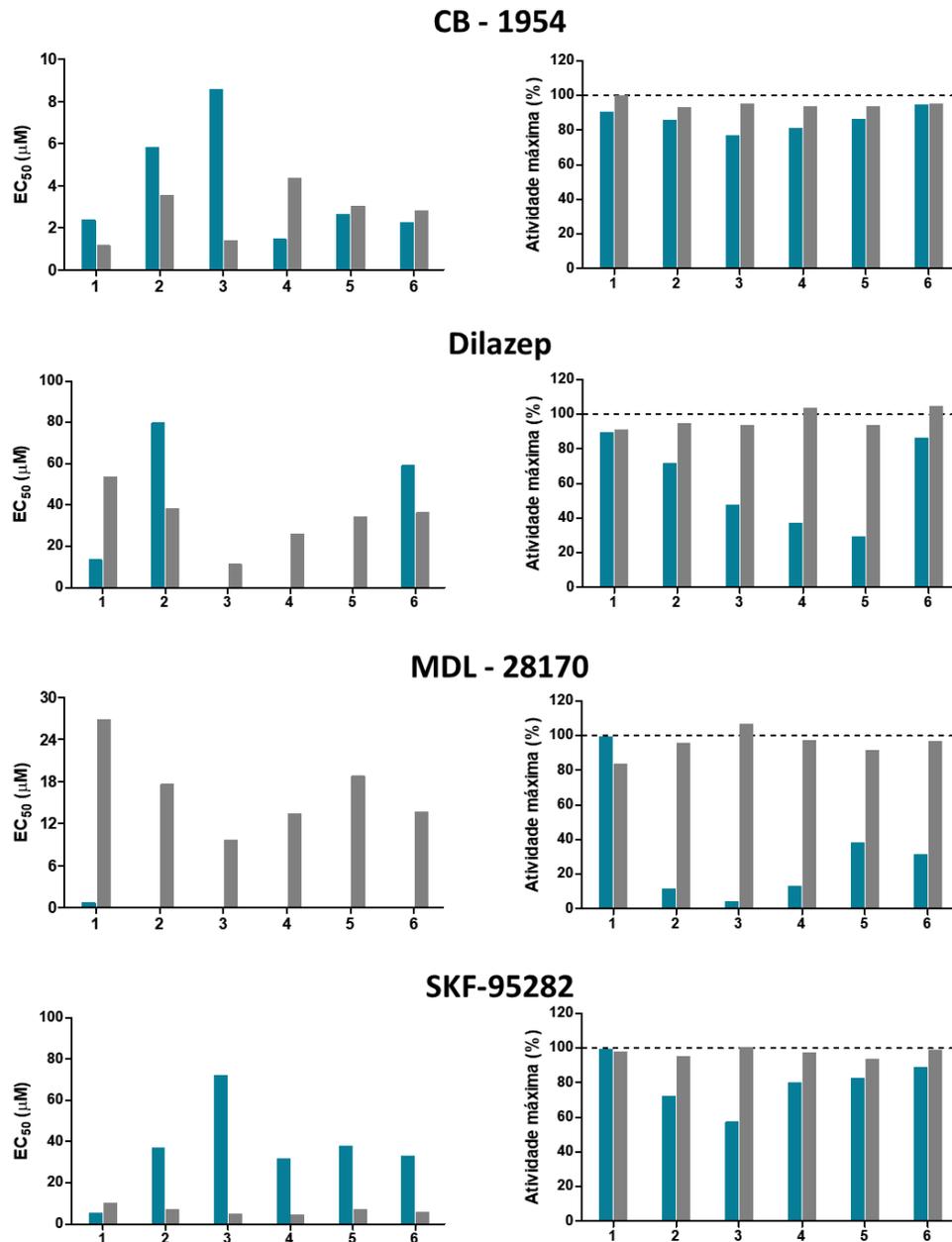


Figura 51. Atividade biológica dos compostos CB1954, Dilazep, MDL 28170 e SKF-95282 contra diferentes cepas e formas do ciclo de vida do parasita *Leishmania*. Os valores de EC₅₀ e atividade máxima referem-se a média de dados obtidos em dois experimentos independentes. Legenda: azul: forma amastigota intracelular; cinza: forma promastigota extracelular. Promastigotas foram expostos às drogas por 72 horas; enquanto que o sistema de infecção foi exposto por 96 horas (com exceção da *L.infantum* MHOM/BR/1972/BH046, a qual foi exposta por 72 horas). Lista de cepas de *Leishmania*: **1. *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH46; **2.** *L. infantum* MHOM/BR/1974/PP75; **3.** *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV; **4.** *L. donovani* MHOM/IN/1980/DD8; **5.** *L. donovani* MHOM/IN/95/9515; **6.** *L. donovani* MHOM/SD/62/1S.**

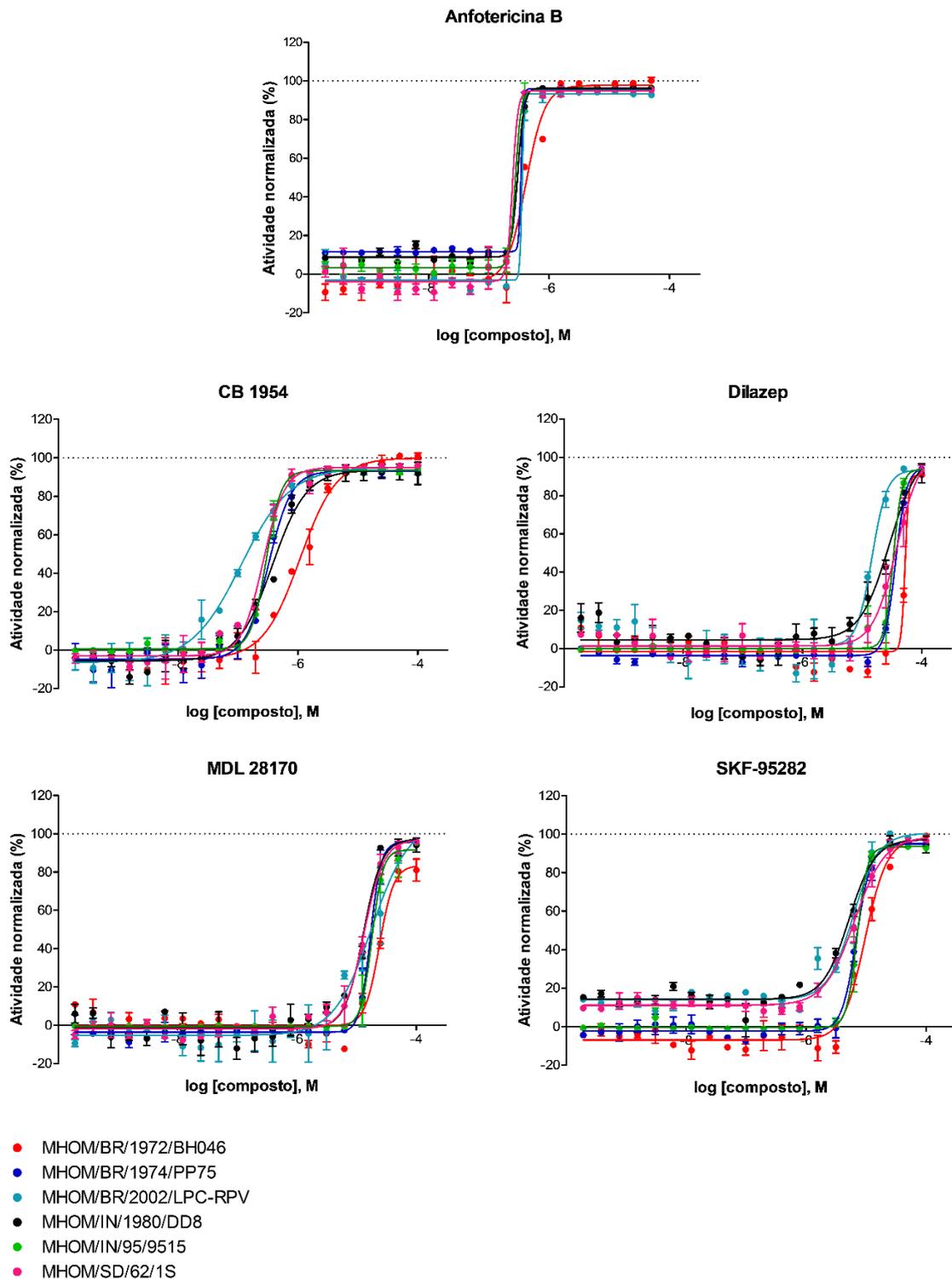


Figura 52. Curvas dose-reposta dos *hits* selecionados da biblioteca LOPAC[®] contra as formas de promastigotas, após 72 horas de exposição às drogas. Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (GraphPad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada dos compostos em relação aos controles. As cores representam as diferentes espécies/cepas de *Leishmania*, como indicado na legenda da figura.

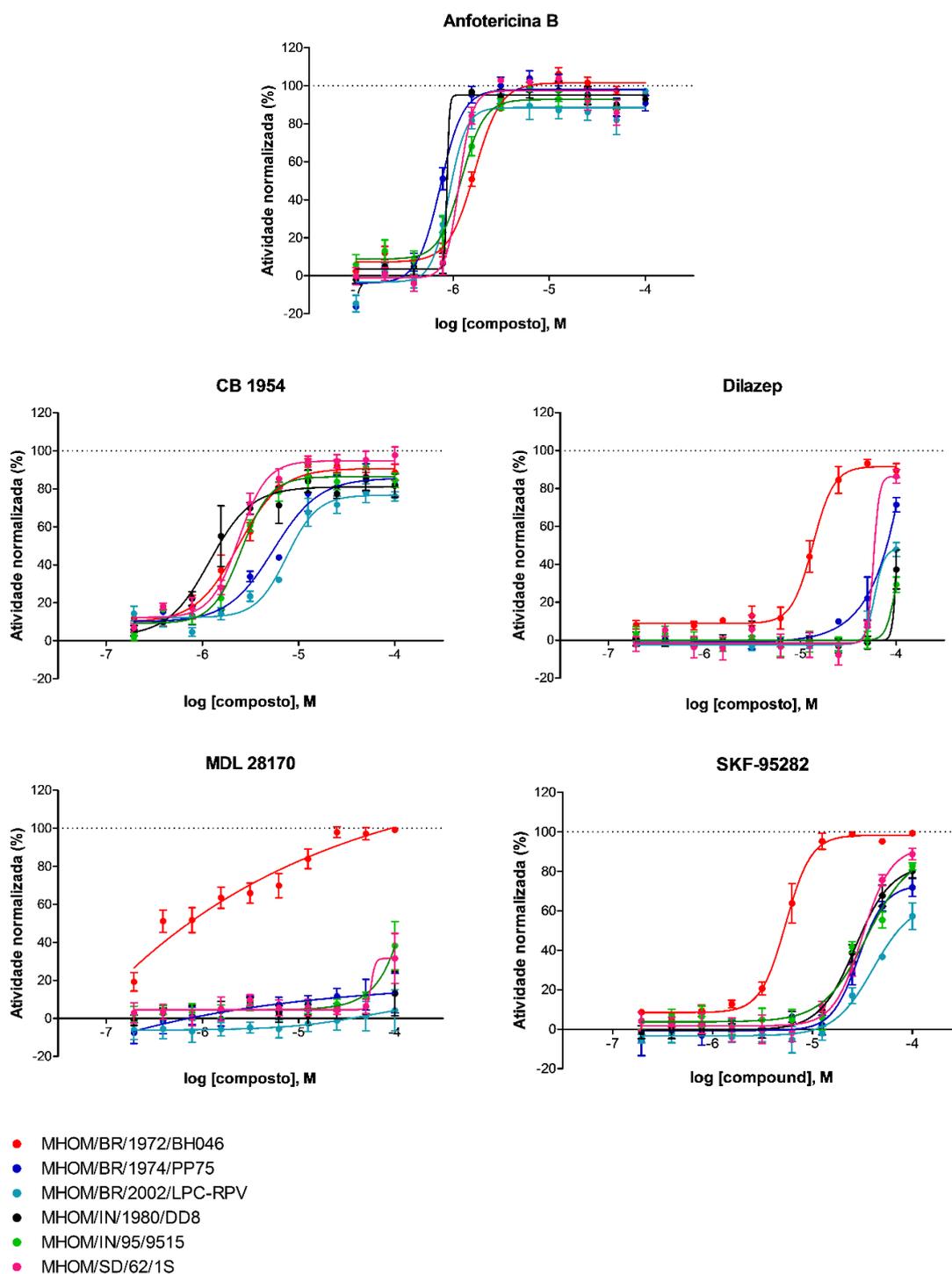


Figura 53. Curvas dose-reposta dos *hits* selecionados da biblioteca LOPAC® contra as formas de amastigotas intracelulares, após 96 horas de exposição às drogas (72 horas, para *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046). Curvas foram geradas por equação de regressão não linear (GraphPad Prism). Cada ponto no gráfico indica a atividade normalizada dos compostos em relação aos controles. As cores representam as diferentes espécies/cepas de *Leishmania*, como indicado na legenda figura.

4.24. Combinação dos *hits* encontrados com compostos referência

Considerando a atividade antiparasitária dos *hits* selecionados através da triagem da biblioteca LOPAC, o estudo da associação dessas moléculas com os fármacos disponíveis para tratamento de leishmaniose visceral poderia representar uma abordagem interessante para identificação de potenciais alternativas de tratamento para a doença. Nesse contexto, os compostos **CB 1954**, **Dilazep**, **MDL 28170** e **SKF – 95282** foram combinados com os compostos referência anfotericina B e miltefosina, utilizando o método de isobogramas de razão-fixa de concentração. Células THP-1 infectadas com *L. infantum* MHOM/1972/BR/BH046 foram então expostas às diferentes combinações por 72 horas. Após o período de incubação, as placas foram fixadas, coradas e processadas pelo sistema de imagens de alto conteúdo Operetta. Os dados foram processados e, através das curvas dose-resposta e a determinação dos valores de EC_{50} , calculamos os valores de FIC (do inglês, *fractional inhibition concentration*) para cada combinação realizada.

As associações de anfotericina B e os compostos estudados resultaram em perfis gerais de interação variáveis (**tabela 15**), apresentando especialmente o modo de interação aditiva ou indiferente, onde os valores das médias da ΣFIC foram: 0,79 para **CB 1954**, 1,11 para **Dilazep** e 0,93 para **SKF – 95282**. No entanto, para o composto **Dilazep**, a combinação de 4:1 apresentou efeito sinérgico, onde o valor de ΣFIC foi estabelecido em 0,39. Já a combinação com o composto **MDL 28170** apresentou efeito sinérgico para todas as concentrações testadas, resultando em uma média da ΣFIC igual a 0,32.

Tabela 15. Perfil de combinação da anfotericina B com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC, destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.

Composto	Razão	FIC Anfo B	FIC <i>hit</i>	Σ FIC	Modo de interação
CB 1954	4:1	0,62	0,16	0,78	Aditiva
	3:2	0,57	0,32	0,89	
	2:3	0,47	0,45	0,92	
	1:4	0,09	0,46	0,55	
Dilazep	4:1	1,05	0,70	1,75	Aditiva
	3:2	0,51	0,90	1,41	
	2:3	0,20	0,70	0,90	
	1:4	0,03	0,36	0,39	
MDL 28170	4:1	0,32	0,10	0,42	Sinérgica
	3:2	0,20	0,09	0,29	
	2:3	0,03	0,18	0,21	
	1:4	0,04	0,31	0,35	
SFK - 95282	4:1	0,90	0,63	1,53	Aditiva
	3:2	0,32	0,54	0,86	
	2:3	0,20	0,35	0,55	
	1:4	0,10	0,69	0,79	

Os dados de FIC estão representados como a média de valores obtidos em dois experimentos independentes. A “razão” indica a proporção do composto referência em relação ao *hit* estudado.

Através dos isobogramas gerados (**figura 54**), foi possível observar que no gráfico referente ao composto **CB 1954**, os pontos se encontram bastante próximos da linha de aditividade, enquanto que para o composto **MDL 28170**, todos os pontos se localizam abaixo da mesma linha. Já para os outros dois compostos testados, pudemos notar que houve a presença de pontos tanto acima quanto abaixo da linha de aditividade, dependendo da concentração dos compostos na combinação; no entanto, essas combinações ainda foram consideradas aditivas, pois a média geral da Σ FIC foi estabelecida em próxima de 1.

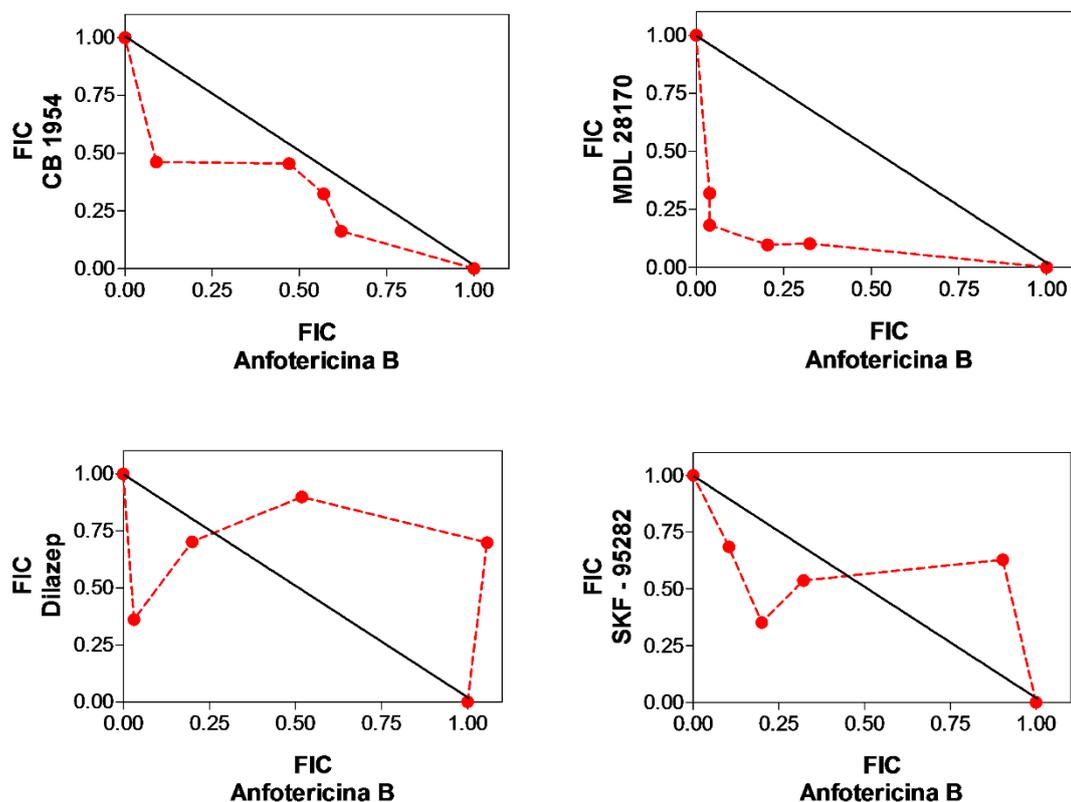


Figura 54. Isobologramas de combinação entre *hits* da biblioteca LOPAC com o composto referência anfotericina.

Já para as combinações realizadas com o composto referência miltefosina (**tabela 16**), o perfil de interação sinérgico/sutilmente sinérgico foi observado em três das associações feitas: em associação com **Dilazep** (médias da $\Sigma FIC = 0,58$), **MDL 28170** (médias da $\Sigma FIC = 0,37$) e **SKF - 95282** (médias da $\Sigma FIC = 0,57$). Em contrapartida, com o composto **CB 1954** foi obtido um modo de interação aditivo ou indiferente.

Tabela 16. Perfil de combinação da miltefosina com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC, destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.

Composto	Razão	FIC Milt	FIC hit	Σ FIC	Modo de interação
CB 1954	4:1	0,92	0,16	1,06	Aditiva
	3:2	0,67	0,52	1,19	
	2:3	0,47	0,85	1,32	
	1:4	0,09	0,46	0,55	
Dilazep	4:1	0,66	0,54	1,20	Levemente sinérgica
	3:2	0,31	0,06	0,37	
	2:3	0,16	0,14	0,30	
	1:4	0,15	0,31	0,46	
MDL 28170	4:1	0,47	0,15	0,62	Sinérgica
	3:2	0,33	0,10	0,43	
	2:3	0,05	0,25	0,30	
	1:4	0,03	0,11	0,14	
SKF - 95282	4:1	0,24	0,68	0,92	Levemente sinérgica
	3:2	0,26	0,52	0,78	
	2:3	0,14	0,32	0,46	
	1:4	0,05	0,11	0,16	

Os dados de FIC estão representados como a média de valores obtidos em dois experimentos independentes.

Analisando os isobogramas gerados para cada combinação (**figura 55**), podemos notar que apesar da média da Σ FIC para os compostos **CB 1954** e **Dilazep** indicarem para uma interação aditiva e fracamente sinérgica, respectivamente, podemos observar a presença de pontos acima e abaixo da linha de aditividade. De forma interessante, considerando o composto **SKF-95282**, todos os pontos se localizaram abaixo da linha de aditividade, para todas as combinações testadas. Por fim, o efeito sinérgico observado para a combinação com **MDL 28170** pela média da Σ FIC foi notado também no isobograma gerado.

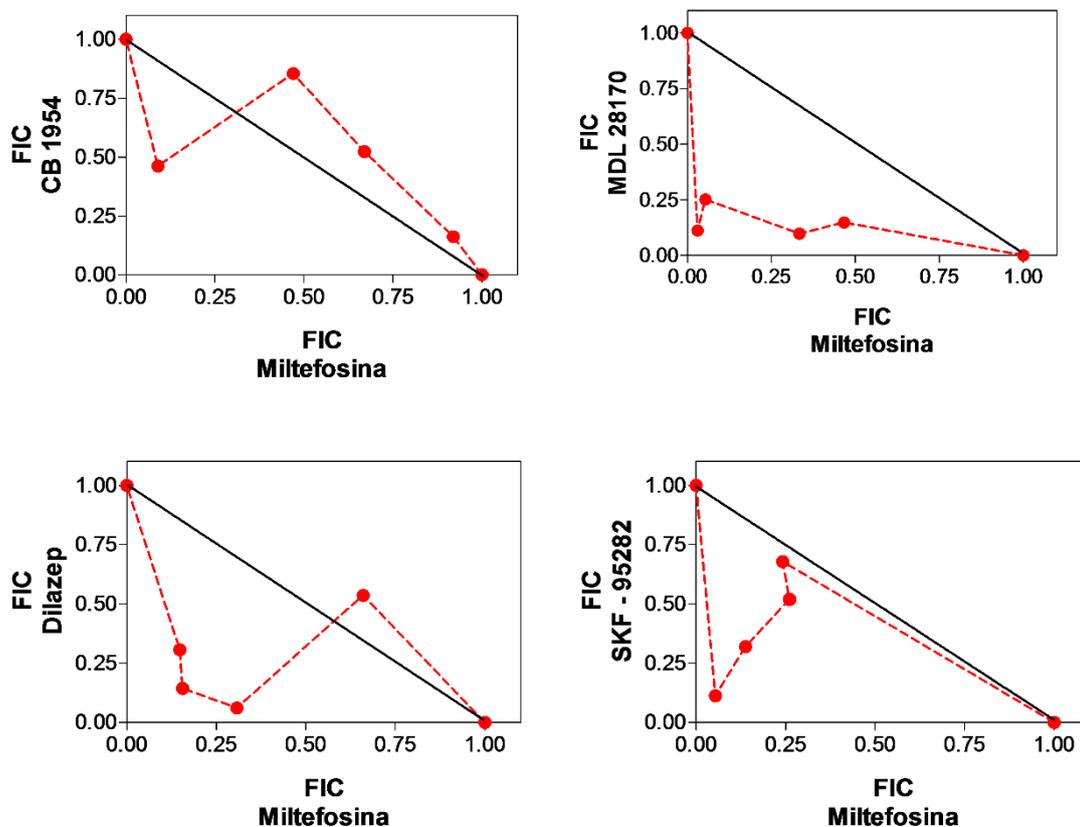


Figura 55. Isobologramas de combinação entre *hits* da biblioteca LOPAC com o composto referência miltefosina.

4.25. Avaliação dos *hits* selecionados da triagem da biblioteca LOPAC em outras espécies de *Leishmania*, *T.brucei* e *T.cruzi*

Além de terem sido testados no painel de cepas associadas à forma visceral de leishmaniose, os compostos selecionados também foram avaliados em outros tripanossomatídeos de importância média, *T. brucei*, agente etiológico da Doença do Sono, e *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. Os dados estão apresentados na **tabela 17**. Considerando o modelo de *T. brucei*, todos os compostos foram ativos, com valores de EC_{50} variando entre 0,09 a 2,3 μ M e valores de atividade máxima próximas ou em 100% (a droga referência pentamidina apresentou EC_{50} de 2nM e atividade máxima de 100%). Já no modelo de *T. cruzi*, todos os compostos apresentaram alta eficiência (93,8 – 100%) e potência variável, sendo que o composto **CB 1954** eliminou a infecção em todas as concentrações testadas. Dentre

o set de moléculas testadas, o composto **CB 1954** apresentou amplo espectro de atividades contra os tripanossomatídeos estudados.

Tabela 17. Atividade biológica dos compostos selecionados em diferentes modelos de tripanossomatídeos.

	<i>T.cruzi</i>		<i>T.brucei</i>	
	EC ₅₀ (µM)	Atividade máxima (%)	EC ₅₀ (µM)	Atividade máxima (%)
Nifurtimox	0,5	100,0	n.t.	n.t.
Pentamidina	n.t.	n.t.	0,002	100,0
CB1954	*	100,0	0,09	99,8
MDL 28170	12,4	98,1	1,9	99,4
Dilazep	27,8	100,0	2,3	100,0
Zolantidine	12,4	93,8	1,6	100,0

Os dados referem-se a médias de valores obtidos em dois experimentos independentes. n.t.: não testado. *: composto apresentou valor de EC₅₀ menor que a mínima concentração testada.

5. Considerações finais

No trabalho apresentado, estabelecemos um ensaio de alto conteúdo para triagem de compostos contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*. Baseado em ensaios previamente descritos na literatura, foi desenvolvido um protocolo otimizado que se mostrou mais robusto, sensível e reprodutível, capaz de identificar adequadamente moléculas candidatas para descoberta de fármacos para leishmaniose visceral. Através da metodologia, acreditamos que será possível aumentar o *throughput* dos ensaios de alta vazão, aumentando a taxa de confirmação de *hits* e diminuindo o número de falhas e perdas de compostos em etapas mais avançadas. Vale salientar que a abordagem apresentada aqui é pioneira no Brasil, nos colocando em evidência no cenário mundial.

Otimizando as condições padronizadas para a espécie *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046, construímos um painel com mais cinco cepas/espécies relacionadas à manifestação visceral da doença. As otimizações foram realizadas para cada cepa/espécie em

particular, focando no modelo biológico e no software de análise. Além de observamos mudanças no perfil de infecção das cepas estudadas, em termos da taxa de infecção, do número de parasitas intracelulares e, principalmente, da razão de amastigotas em replicação; também pudemos avaliar as variações de atividade anti-*Leishmania* de compostos- referência. Enquanto a anfotericina B apresentou uma atividade consistente para todas as cepas estudadas, mudanças no perfil de eficiência e potência da miltefosina foram observadas. Dessa forma, sugerimos que, através do estudo cepa-atividade, frequentemente ignorado em triagens de alta escala, poderemos ter um melhor entendimento do perfil de atividade de determinado composto e, conseqüentemente, realizar uma melhor priorização de candidatos.

Utilizando a metodologia estabelecida, realizamos a prospecção *in vitro* de novas moléculas com atividade antiparasitária, focando em bibliotecas naturais e sintéticas. Fomos capazes de triar aproximadamente 20.000 pontos, incluindo ensaios primários e confirmatórios, de diferentes parceiros brasileiros e internacionais. Dentre eles, podemos citar: Comissão europeia (projeto FP7) e DNDi (*Drugs for neglected diseases initiative*), bem como colaboradores da Griffith University (Austrália), UNICAMP, USP, UFSCAR, UFV, UNB, UFG, entre outras. Como resultado dessas parcerias, diversos artigos foram publicados ou estão em fase de preparação para publicação.

Considerando a triagem da biblioteca de extratos naturais Hypha's MycoDiverse™, a partir de extratos fúngicos, foi possível isolar cinco compostos puros, os quais apresentaram atividade anti-*Leishmania* promissora, sendo que algumas moléculas se tratam de compostos inéditos, sem precedentes na literatura. Ensaios de ADME, toxicidade e experimentos em modelo animal estão sendo realizados no momento. Para o mesmo consórcio, ainda triamos uma biblioteca de extratos naturais de plantas do Sudão, da qual selecionamos três compostos ativos purificados, e uma biblioteca sintética focada em derivados de chalconas.

Quanto às coleções de compostos/extratos provenientes de diferentes colaboradores, no total, foram testadas aproximadamente 800 amostras em nosso modelo, de diferentes fontes, entre elas: síntese química, extratos de plantas e extratos de fungos. Dentre o set de compostos, destacamos os resultados adquiridos em colaboração com o Prof. Carlos Roque (UNICAMP, SP), Prof. Hélio Stefani (USP, SP), Profa. Carolina Horta (UFG, GO) e Prof. Simon Cämmerer (UNICAMP, SP). Através dessas triagens, identificamos diferentes classes terapêuticas e químicas, algumas previamente reportadas como agente inibidor do parasita *Leishmania*, porém ainda pouco exploradas, e outras inéditas no campo de estudo. Ainda, encontramos, potenciais candidatos, os quais apresentaram valores de EC₅₀ abaixo de 10 µM e atividade máxima próxima a 100%, representando assim moléculas e *scaffolds* iniciais

para otimização química e estudos mais detalhados (painel de cepas, dinâmica de atividade, ensaios com outros tripanossomatídeos, testes em modelo animal).

Por fim, utilizamos da abordagem de reposicionamento e triamos a biblioteca comercial LOPAC, constituída de 1,280 moléculas com atividade biológica conhecida. Apesar de previamente triada contra o modelo de *Leishmania*, pela primeira vez, um *screening* paralelo com duas espécies diferentes do parasita foi feito, para traçar um perfil de atividade dos compostos contra representantes viscerais da doença. Como resultado, identificamos classes terapêuticas e químicas, ainda não reportadas ou pouco exploradas para *Leishmania*, e selecionamos quatro compostos ativos contra *L. infantum* MHOM/BR/1972/BH046, os quais foram prosseguidos para estudos mais detalhados: (i) avaliação da atividade contra diferentes cepas/espécies de *Leishmania*, nas diferentes formas do ciclo de vida do parasita (ii) verificação da atividade em outros modelos de tripanossomatídeos: *T. cruzi* e *T. brucei*, (iii) investigação dos compostos na literatura quanto a estrutura química, perfil terapêutico, características farmacocinéticas, entre outros parâmetros, e (iv) ensaios de combinação com compostos referência. Os compostos selecionados foram: **CB 1954**, **MDL 28170**, **Dilazep** e **Zolantidine**. Dentre este set, o composto **CB 1954** apresentou-se com amplo espectro de atividade, não citotóxico e, segundo método de predição, com características farmacocinéticas interessantes. Apesar de previamente publicado como agente anti-tripanosomátídeos, em nosso trabalho, investigamos mais detalhadamente seu efeito em diferentes cepas/espécies de *Leishmania*, bem como em diferentes formas do ciclo de vida do parasita. Além disso, para os outros compostos estudados, no modelo *in vitro* de *T. brucei*, todos apresentaram atividade promissora, com valores de EC₅₀ próximos a 2 µM; enquanto que, para o parasita *T. cruzi*, apenas os compostos **MDL 28170** e **Zolantidine** apresentaram potência satisfatória (aproximadamente 12 µM). Ainda, realizamos ensaios de combinação entre os *hits* selecionados e os compostos referência anfotericina B ou miltefosina. Dentre as combinações testadas, os compostos CB 1954, Dilazep e Zolantidine apresentaram perfis de aditividade (ou indiferença) em todas as combinações feitas, enquanto que o composto MDL 28170 apresentou efeito sinérgico em combinação com ambos os compostos referência. Dessa forma, ensaios com MDL28170 combinado com anfotericina b e miltefosina podem representar uma possível alternativa para trabalhos envolvendo as outras cepas de *Leishmania*.

Em resumo, a metodologia descrita nesse trabalho representa uma importante contribuição para os processos iniciais de desenvolvimento de fármacos contra *Leishmania*. Diversas abordagens foram empregadas nesse projeto, para realizar a prospecção de candidatos

a fármacos contra amastigotas intracelulares de *Leishmania*, os quais poderão ser explorados futuramente como potencial alternativa de quimioterapia para leishmanioses.

6. Referências

- Achaiah, G., Goud, N. S., Kumar, K. P., & Mayuri, P. (2016). Review on 2-substituted benzothiazoles: Diversity of synthetic methods and biological activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*, 7(4), 1375–1382.
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*10(3): e0004349.
- Alang, G., Kaur, G., Kaur, R., Singh, A., & Tiwari, R. (2010). Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of certain 6-methyl-2(3H)-benzo-1, 3-thiazolyl-1'-ethylidene-2-(o, p-Substituted Acetophenones) Hydrazine Analogs. *Journal of Young Pharmacists*, 2(4), 394–398.
- Alirol, E., Schruppf, D., Amici Heradi, J., Riedel, A., de Patoul, C., Quere, M., & Chappuis, F. (2013). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières experience in the Democratic Republic of the Congo. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(2), 195–203.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine *Leishmaniasis*. In *Advances in parasitology* (Vol. 57, pp. 1–88).
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... Das, P. (2012). *Leishmaniasis* Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671.
- Alzahrani, K. J. H., Ali, J. A. M., Eze, A. A., Looi, W. L., Tagoe, D. N. A., Creek, D. J., ... de Koning, H. P. (2017). Functional and genetic evidence that nucleoside transport is highly conserved in *Leishmania* species: Implications for pyrimidine-based chemotherapy. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 7(2), 206–226.
- Amato, V., Amato, J., Nicodemo, A., Uip, D., Amato-Neto, V., & Duarte, M. (1998). Treatment of mucocutaneous *Leishmaniasis* with pentamidine isothionate. *Annales de Dermatologie*

- et de Venereologie*, 125(8), 492–5.
- Andersen, E. M., Cruz-Saldarriaga, M., Llanos-Cuentas, A., Luz-Cjuno, M., Echevarria, J., Miranda-Verastegui, C., ... Berman, J. D. (2005). Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous *Leishmaniasis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(2), 133–7.
- Andrews, K. T., Fisher, G., & Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 4(2), 95–111.
- Ang, M. L. T., & Pethe, K. (2016). Contribution of high-content imaging technologies to the development of anti-infective drugs. *Cytometry Part A*, 89(8), 755–760. <http://doi.org/10.1002/cyto.a.22885>
- Annang, F., Pérez- Moreno, G., García-Hernández, R., Cordon- Obras, C., Martín, J., Tormo, J. ., ... Gonzáles-Pacanowska, D. (2015). High-Throughput Screening Platform for Natural Product–Based Drug Discovery Against 3 Neglected Tropical Diseases: Human African Trypanosomiasis, *Leishmaniasis*, and Chagas Disease. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 82–91.
- Antunes, A. P., Ribeiro, A. L. P., Sabino, E. C., Silveira, M. F., Oliveira, C. D. L., Botelho, A. C. de C., ... Botelho, A. C. de C. (2016). Benznidazole therapy for Chagas disease in asymptomatic *Trypanosoma cruzi* -seropositive former blood donors: evaluation of the efficacy of different treatment regimens. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(6), 713–720.
- Aponte, J. C., Castillo, D., Estevez, Y., Gonzalez, G., Arevalo, J., Hammond, G. B., & Sauvain, M. (2010). *In vitro and in vivo anti-Leishmania activity of polysubstituted synthetic chalcones*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Vol. 20).
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P., Estaquier, J., & Ameisen, J. (2002). On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death and Differentiation*, 9, 65–81.
- Aronow, B., Kaur, K., McCartan, K., & Ullman, B. (1987). Two high affinity nucleoside transporters in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22(1), 29–37.
- Ashutosh, Gupta, S., Ramesh, Sundar, S., & Goyal, N. (2005). Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3776–83.

- Atkinson, H. J., Babbitt, P. C., & Sajid, M. (2009). The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends in Parasitology*, 25(12), 573–81.
- Aulner, N., Danckaert, A., Rouault-Hardoin, E., Desrivot, J., Helynck, O., Commere, P.-H., ... Prina, E. (2013). High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-*Leishmanial* drug discovery. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2154.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the *Leishmaniases*: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1–458.
- Batovska, D., & Todorova, I. (2010). Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, 5(1), 1–29.
- Bhargava, P., Kumar, K., Chaudhaery, S. S., Saxena, A. K., & Roy, U. (2010). Cloning, overexpression and characterization of *Leishmania donovani* squalene synthase. *FEMS Microbiology Letters*, 311(1), 82–92.
- Bhattacharya, S. K., Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., ... Berman, J. D. (2004). Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral *Leishmaniasis* in India. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(2), 217–21.
- Bhattarai, A., Ali, A. S., Kachur, S. P., Mårtensson, A., Abbas, A. K., Khatib, R., ... Snow, R. (2007). Impact of Artemisinin-Based Combination Therapy and Insecticide-Treated Nets on Malaria Burden in Zanzibar. *PLoS Medicine*, 4(11), e309.
- Bickle, M. (2010). The beautiful cell: high-content screening in drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 219–226.
- Blackwell, J. M., Fakiola, M., Ibrahim, M. E., Jamieson, S. E., Jeronimo, S. B., Miller, E. N., ... Wilson, M. E. (2009). Genetics and visceral *Leishmaniasis*: of mice and man. *Parasite Immunology*, 31(5), 254–66.
- Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., ... Rafati, S. (2011). Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Experimental Parasitology*, 127(3), 637–645.
- Bot, C., Hall, B. S., Bashir, N., Taylor, M. C., Helsby, N. A., & Wilkinson, S. R. (2010). Trypanocidal Activity of Aziridinyl Nitrobenzamide Prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4246–4252.
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P., & Mosser, D. M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell

- adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(6), 3102–11.
- Brodin, P., & Christophe, T. (2011). High-content screening in infectious diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(4), 534–539.
- Buchser, W., Collins, M., Garyantes, T., Guha, R., Haney, S., Lemmon, V., ... Trask, O. J. (2004). *Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Buckner, F. S., & Wilson, A. J. (2005). Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(5), 600–5.
- Calcutt, C. R., Ganellin, C. R., Griffiths, R., Leigh, B. K., Maguire, J. P., Mitchell, R. C., ... Young, R. C. (1988). Zolantidine (SK&F 95282) is a potent selective brain-penetrating histamine H₂-receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 93(1), 69–78.
- Callahan, H. L., Portal, A. C., Devereaux, R., & Grogl, M. (1997). An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(4), 818–22.
- Cammerer, S. B., Jimenez, C., Jones, S., Gros, L., Lorente, S. O., Rodrigues, C., ... Gilbert, I. H. (2007). Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4049–61.
- Carter, N. S., Berger, B. J., & Fairlamb, A. H. (1995). Uptake of Diamidine Drugs by the P2 Nucleoside Transporter in Melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei**. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28153–28157.
- Castelli, G., Galante, A., Verde, V. Lo, Migliazzo, A., Reale, S., Lupo, T., ... Bruno, F. (2014). Evaluation of Two Modified Culture Media for *Leishmania infantum* Cultivation Versus Different Culture Media. *Journal of Parasitology*, 100(2), 228–230.
- Cazzulo, J. J. (2002). Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(11), 1261–71.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2013). Leishmaniasis - Biology. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 17 out 2017.
- Chakraborty, A. K., & Majumder, H. K. (1988). Mode of action of pentavalent antimonials: Specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2), 605–611.

- Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in *Leishmaniasis*. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 167–76.
- Chan, M. M.-Y., Bulinski, J. C., Chang, K.-P., & Fong, D. (2003). A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. *Parasitology Research*, 89(4), 266–71.
- Chatelain, E., & Ioset, J. R. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. *Drug Design, Development and Therapy*, 5, 175 - 181
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D., Madhubala, R., Davis, B., ... Bradford, M. (2011). Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin –Susceptible –Resistant *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*, 6(10), e26660.
- Childs, G. E., Foster, kris A., & McRoberts, M. J. (1978). Insect cell culture media for cultivation of new world *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 8(4), 255–258.
- Childs, G. E., McRoberts, M. J., & Moussa, M. A. (1979). Systems for the in vitro large-scale propagation of New World *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73(4), 395–396.
- Christofferson, A., & Wilkie, J. (2009). Mechanism of CB1954 reduction by *Escherichia coli* nitroreductase. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 413–418.
- Chrusciak-Talhari A., Dietze R., Chrusciak Talhari C., da Silva R. M., Gadelha Yamashita E. P., de Oliveira Penna G. , *et al.* (2011) Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 84(2), 255–60.
- Chung-Faye, G., Palmer, D., Anderson, D., Clark, J., Downes, M., Baddeley, J., ... Kerr, D. J. (2001). Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: a phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(9), 2662–8.
- Cobb, L. M., Connors, T. A., Elson, L. A., Khan, A. H., Mitchley, B. C., Ross, W. C., & Whisson, M. E. (1969). 2,4-dinitro-5-ethyleneiminobenzamide (CB 1954): a potent and selective inhibitor of the growth of the Walker carcinoma 256. *Biochemical Pharmacology*, 18(6), 1519–27.
- Colli, S., Maderna, P., Morazzoni, G., Speroni, C., & Tremoli, E. (1983). Effects of dilazep on human platelets and rat vascular tissue: in vitro studies on platelet aggregation, and arachidonic acid oxidation. *Pharmacological Research Communications*, 15(6), 593–602.

- Convit, J., Ulrich, M., Fernández, C. T., Tapia, F. J., Cáceres-Dittmar, G., Castés, M., & Rondón, A. J. (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous *Leishmaniasis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 444–448.
- Cortázar, T. M., Coombs, G. H., & Walker, J. (2007). *Leishmania panamensis*: Comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Experimental Parasitology*, 116(4), 475–482.
- Coruzzi, G., Adami, M., Pozzoli, C., Poli, E., & Bertaccini, G. (1994). Activity of the new histamine H₂-receptor antagonist Zolantidine at cardiac and gastric H₂-receptors. *Pharmacology*, 48(2), 69–76.
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., & Chan, J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36(16), 2633–6.
- Croft, S. L., & Olliaro, P. (2011). *Leishmaniasis chemotherapy*—challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1478–1483.
- Croft, S. L., Snowdon, D., & Yardley, V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(6), 1041–7.
- Croft, S. L., Yardley, V., & Kendrick, H. (2002). Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96 Suppl 1, S127–9.
- Cruz, D. J. M., Koishi, A. C., Taniguchi, J. B., Li, X., Milan Bonotto, R., No, J. H., ... Freitas-Junior, L. H. (2013). High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2073.
- Curtis, N. R., Kulagowski, J. J., Leeson, P. D., Ridgill, M. P., Emms, F., Freedman, S. B., ... Patel, S. (1999). Synthesis and SAR of 2- and 3-substituted 7-azaindoles as potential dopamine D₄ ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(4), 585–588.
- D'Angelo, N. D., Kim, T.-S., Andrews, K., Booker, S. K., Caenepeel, S., Chen, K., ... Norman, M. H. (2011). Discovery and Optimization of a Series of Benzothiazole Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Dual Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(6), 1789–1811.
- D'Avila-Levy, C. M., Marinho, F. A., Santos, L. O., Martins, J. L., Santos, A. L. S., &

- Branquinha, M. H. (2006). Leishmanicida activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(2), 138–142.
- da Luz, R. I., Vermeersch, M., Dujardin, J.-C., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5197–203.
- Dagley, M. J., Saunders, E. C., Simpson, K. J., & McConville, M. J. (2015). High-content assay for measuring intracellular growth of *Leishmania* in human macrophages. *Assay and Drug Development Technologies*, 13(7), 389–401.
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE*, 5(1), e8668.
- DaMata, J. P., Mendes, B. P., Maciel-Lima, K., Menezes, C. A. S., Dutra, W. O., Sousa, L. P., & Horta, M. F. (2015). Distinct Macrophage Fates after in vitro Infection with Different Species of *Leishmania*: Induction of Apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but Not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLOS ONE*, 10(10), e0141196.
- de Mello, T. F. P., Bitencourt, H. R., Pedroso, R. B., Aristides, S. M. A., Lonardon, M. V. C., & Silveira, T. G. V. (2014). Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Experimental Parasitology*, 136, 27–34.
- de Mello, T. F. P., Cardoso, B. M., Lopes, S. N., Bitencourt, H. R., Voltarelli, E. M., Hernandez, L., ... Silveira, T. G. V. (2015). Activity of synthetic chalcones in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology Research*, 114(10), 3587–3600.
- de Moraes, C. G. V., Castro Lima, A. K., Terra, R., dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A. G., Dutra, P. M. L., ... o. (2015). The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *BioMed Research International*, 2015, 324915.
- De Muylder, G., Ang, K. K. H., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C., & McKerrow, J. H. (2011). A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1253.
- De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., ... Gray, D. W. (2013). Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7),

2913–22.

- de Souza, W., & Rodrigues, J. C. F. (2009). Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Antitrypanosomatid Drugs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 642502.
- Decuypere, S., Vanaerschot, M., Brunker, K., Imamura, H., Müller, S., Khanal, B., ... Rosen, B. (2012). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Natural *Leishmania* Populations Vary with Genetic Background. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1514.
- Desjeux, P. (2004). *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318.
- DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, 22(2), 151–185.
- Diniz, J. L. C. P., Costa, M. O. da R., & Gonçalves, D. U. (2011). Mucocutaneous *Leishmaniasis*: clinical markers in presumptive diagnosis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (Impresso)*, 77(3), 380–384.
- Doisy, X., Dekhane, M., Le Hyaric, M., Rousseau, J.-F., Singh, S. K., Tan, S., ... Dodd, R. H. (1999). Synthesis and benzodiazepine receptor (ω receptor) affinities of 3-substituted derivatives of pyrrolo[2,3-c]pyridine-5-carboxylate, a novel class of ω 1 selective ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(5), 921–932.
- Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de vries, P. J. (2012). Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of *Leishmaniasis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597.
- Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & De Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of *Leishmaniasis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2576 – 2597.
- Dube, A., Gupta, R., & Singh, N. (2009). Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 25(9), 432–9.
- Durieu, E., Prina, E., Leclercq, O., Oumata, N., Gaboriaud-Kolar, N., Vougianniopoulou, K., ... Rachidi, N. (2016a). From Drug Screening to Target Deconvolution: a Target-Based Drug Discovery Pipeline Using *Leishmania* Casein Kinase 1 Isoform 2 To Identify Compounds with AntiLeishmanial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2822–33.
- Durieu, E., Prina, E., Leclercq, O., Oumata, N., Gaboriaud-Kolar, N., Vougianniopoulou, K., ... Rachidi, N. (2016b). From Drug Screening to Target Deconvolution: a Target-Based Drug Discovery Pipeline Using *Leishmania* Casein Kinase 1 Isoform 2 To Identify

- Compounds with Anti*Leishmanial* Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2822–33.
- Dyall, J., Coleman, C. M., Hart, B. J., Venkataraman, T., Holbrook, M. R., Kindrachuk, J., ... Frieman, M. B. (2014). Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4885–93.
- Echalier, A., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Lozach, O., Clément, M., Valette, A., ... Meijer, L. (2008). Meriolins (3-(Pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): Synthesis, Kinase Inhibitory Activity, Cellular Effects, and Structure of a CDK2/Cyclin A/Meriolin Complex †. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(4), 737–751.
- Eissa, M. M., Amer, E. I., & El Sawy, S. M. F. (2011). *Leishmania* major: Activity of tamoxifen against experimental cutaneous *Leishmaniasis*. *Experimental Parasitology*, 128(4), 382–390.
- Ennes-Vidal, V., Menna-Barreto, R. F. S., Santos, A. L. S., Branquinha, M. H., & d'Avila-Levy, C. M. (2010). Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(7), 1395–1398.
- Ennes-Vidal, V., Menna-Barreto, R. F. S., Santos, A. L. S., Branquinha, M. H., & d'Avila-Levy, C. M. (2011). MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PloS One*, 6(4), e18371.
- Ersfeld, K., Barraclough, H., & Gull, K. (2005). Evolutionary Relationships and Protein Domain Architecture in an Expanded Calpain Superfamily in Kinetoplastid Parasites. *Journal of Molecular Evolution*, 61(6), 742–757.
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., & Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, 81(2), 151–7.
- Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, 46(1), 695–729.
- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., ... Dumon, H. (1997a). In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral *Leishmaniasis*.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(4), 827–30.
- Faraut-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., ... Dumon, H. (1997b). In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral *Leishmaniasis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(4), 827–30.
- Faria, J., Moraes, C., Song, R., Pascoalino, B., Lee, N., Siqueira-Neto, J., ... Freitas-Junior, L. (2015). Drug Discovery for Human African Trypanosomiasis: Identification of Novel Scaffolds by the Newly Developed HTS SYBR Green Assay for *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 70–81.
- Fazal, R., Samreen, Taha, M., Saad, S. M., Perveen, S., Khan, M., ... Choudhary, M. I. (2015). *AntiLeishmanial activities of benzothiazole derivatives*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37 (1), 157 - 161
- Fernández, M. M., Malchiodi, E. L., & Algranati, I. D. (2011). Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 86–93.
- Fernandez, O. L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodriguez, I., ... Saravia, N. G. (2014). Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2871.
- Field, M. C., Horn, D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A. J., Gray, D. W., Read, K. D., ... Gilbert, I. H. (2017). Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nature Reviews Microbiology*, 15(4), 217–231.
- Forestier, C.-L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., & Späth, G. F. (2011). Imaging Host Cell-*Leishmania* Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host & Microbe*, 9(4), 319–330.
- Frearson, J. A., Brand, S., McElroy, S. P., Cleghorn, L. A. T., Smid, O., Stojanovski, L., ... Wyatt, P. G. (2010). N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature*, 464(7289), 728–732.
- Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., & Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral *Leishmaniasis* treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 11–19.
- Fu, Y., Buryanovskyy, L., & Zhang, Z. (2005). Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with cancer prodrug CB1954. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*, 336(1), 332–338.
- Gasser, R. A., Magill, A. J., Oster, C. N., Franke, E. D., Grögl, M., & Berman, J. D. (1994). Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of *Leishmaniasis*. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 18(1), 83–90.
- Gavin, J. J., Ebetino, F. F., Freedman, R., & Waterbury, W. E. (1966). The aerobic degradation of 1-(5-nitrofurfurylideneamino)-2-imidazolidinone (NF-246) by *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 113(2), 399–404.
- Gebre-Hiwot, A., Tadesse, G., Croft, S. L., & Frommel, D. (1992). An in vitro model for screening anti*Leishmanial* drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta Tropica*, 51(3-4), 237–245.
- Gero, A. M., Scott, H. V., O’Sullivan, W. J., & Christopherson, R. I. (1989). Antimalarial action of nitrobenzylthioinosine in combination with purine nucleoside antimetabolites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34(1), 87–97.
- Gilbert, I. H. (2013). Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(20), 7719–26.
- Gontijo, V. S., Judice, W. A. S., Codonho, B., Pereira, I. O., Assis, D. M., Januário, J. P., ... Henrique dos Santos, M. (2012). Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 613–623.
- Goupil, L. S., & McKerrow, J. H. (2014). Introduction: Drug Discovery and Development for Neglected Diseases. *Chemical Reviews*, 114(22), 11131–11137.
- Gradoni, L. (2015). Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 94–100.
- Griffith, D. A., & Jarvis, S. M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286(3), 153–81.
- Gupta, S., & Nishi. (2011). Visceral *Leishmaniasis*: experimental models for drug discovery. *The Indian Journal of Medical Research*, 133(1), 27–39.
- Gupta, S., Yardley, V., Vishwakarma, P., Shivahare, R., Sharma, B., Launay, D., ... Puri, S. K. (2015). Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral *Leishmaniasis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 518 – 527.
- Gustavsen, K., & Hanson, C. (2009). Progress in public-private partnerships to fight neglected diseases. *Health Affairs*, 28(6), 1745–1749.

- Hailu, A., Musa, A., Wasunna, M., Balasegaram, M., Yifru, S., Mengistu, G., ... *Leishmaniasis East Africa Platform (LEAP) group.* (2010). Geographical Variation in the Response of Visceral *Leishmaniasis* to Paromomycin in East Africa: A Multicentre, Open-Label, Randomized Trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e709.
- Hajjaran, H., Mohebbali, M., Akhavan, A., Taheri, A., Barikbin, B., & Soheila, N. S. (2013). Unusual presentation of disseminated cutaneous *Leishmaniasis* due to *Leishmania major*: Case reports of four Iranian patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(4), 333–336.
- Haldar, A. K., Sen, P., Roy, S., Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of antimony in the treatment of *Leishmaniasis*: current status and future directions. *Molecular Biology International*, 2011, 571242.
- Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73(9), 919–34.
- Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, 44, 1–39.
- Haney, S. A., LaPan, P., Pan, J., & Zhang, J. (2006). High-content screening moves to the front of the line. *Drug Discovery Today*, 11(19), 889–894.
- Hartley, M.-A., Drexler, S., Ronet, C., Beverley, S. M., & Fasel, N. (2014). The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic *Leishmaniasis*. *Trends in Parasitology*, 30(8), 412–422.
- Harvey, A. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19-20), 894–901.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111–129.
- Hasanein, P. (2011). Two histamine H₂ receptor antagonists, zolantidine and cimetidine, modulate nociception in cholestatic rats. *Journal of Psychopharmacology*, 25(2), 281–288.
- Holzer, T. R., McMaster, W. R., & Forney, J. D. (2006). Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146(2), 198–218.
- Hombach, A., Ommen, G., MacDonald, A., & Clos, J. (2014). A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 21), 4762–73.
- Hong, S., Kim, J., Seo, J. H., Jung, K. H., Hong, S.-S., & Hong, S. (2012). Design, Synthesis, and Evaluation of 3,5-Disubstituted 7-Azaindoles as Trk Inhibitors with Anticancer and

- Antiangiogenic Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(11), 5337–5349.
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., ... Bell, G. I. (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26(2), 163–175.
- Hough, L. B., Nalwalk, J. W., & Battles, A. H. (1990). Zolantidine-induced attenuation of morphine antinociception in rhesus monkeys. *Brain Research*, 526(1), 153–5.
- Hu, Z., Lan, K.-H., He, S., Swaroop, M., Hu, X., Southall, N., ... Liang, T. J. (2014). Novel cell-based hepatitis C virus infection assay for quantitative high-throughput screening of anti-hepatitis C virus compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 995–1004.
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–49.
- Iraji, F., & Sadeghinia, A. (2005). Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous *Leishmaniasis*: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(1), 3–9.
- Islam, S., Kenah, E., Bhuiyan, M. A. A., Rahman, K. M., Goodhew, B., Ghalib, C. M., ... Bern, C. (2013). Clinical and immunological aspects of post-kala-azar dermal *Leishmaniasis* in Bangladesh. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(2), 345–53.
- Izumo, T., Suzuki, G., Chen, Z., Fujii, Y., & Kamei, C. (1999). Effects of certain cerebral circulation activating drugs on regional cerebral blood flow in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 21(4), 279–83.
- Jain, S. K., Sahu, R., Walker, L. A., & Tekwani, B. L. (2012). A parasite rescue and transformation assay for anti*Leishmanial* screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (70).
- Jayapradhacheekurthy, A., Rambabu, C., & Kumar, A. (2016). Validation of Reported Single Nucleotide Polymorphisms in the Genes Associated With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Dia Res Ther*, 2(1).
- Jeronimo, S. M. B., Duggal, P., Ettinger, N. A., Nascimento, E. T., Monteiro, G. R., Cabral, A. P., ... Wilson, M. E. (2007). Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(8), 1261–9.
- Jha, T. K., Giri, Y. N., Singh, T. K., & Jha, S. (1995). Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral *Leishmaniasis* in north Bihar, India. *The American Journal of Tropical*

- Medicine and Hygiene*, 52(6), 536–8.
- Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., ... Berman, J. (1999). Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral *Leishmaniasis*. *New England Journal of Medicine*, 341(24), 1795–1800.
- Jia, Z., Petrounevitch, V., Wong, A., Moldoveanu, T., Davies, P. L., Elce, J. S., & Beckmann, J. S. (2001). Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophysical Journal*, 80(6), 2590–6.
- Kamiński, D. M. (2014). Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European Biophysics Journal*, 43(10-11), 453–467.
- Kawabata, M., Haneda, M., Wang, T., Imai, M., & Takabatake, T. (2002). Effects of a nucleoside transporter inhibitor, dilazep, on renal microcirculation in rats. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 25(4), 615–21.
- Kawagoe, J., Abe, K., Ikuta, J., Igarashi, N., Shimizu, S., Yamauchi, Y., & Kogure, K. (1992). Effect of dilazep dihydrochloride against ischemia and reperfusion-induced disruption of blood-brain barrier in rats: a quantitative study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 345(4), 485–488.
- Kaye, P., & Scott, P. (2011a). *Leishmaniasis*: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604–615.
- Kaye, P., & Scott, P. (2011b). *Leishmaniasis*: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604–615.
- Keas, B. E. (1999). Microscopy of *Leishmania* species. Retrieved June 15, 2017, from <https://msu.edu/course/zol/316/lspscope.htm>
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593.
- Khare, S., Nagle, A. S., Biggart, A., Lai, Y. H., Liang, F., Davis, L. C., ... Supek, F. (2016). Proteasome inhibition for treatment of *Leishmaniasis*, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*, 537(7619), 229–233.
- Kim, D. H., Chung, H. J., Bleys, J., & Ghohestani, R. F. (2009). Is Paromomycin an Effective and Safe Treatment against Cutaneous *Leishmaniasis*? A Meta-Analysis of 14 Randomized Controlled Trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(2), e381.
- Kiss, A., Farah, K., Kim, J., Garriock, R. J., Drysdale, T. A., & Hammond, J. R. (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and

- inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochemical Journal*, 352(2), 363.
- Knox, R. J., Friedlos, F., Jarman, M., & Roberts, J. J. (1988). A new cytotoxic, DNA interstrand crosslinking agent, 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide, is formed from 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by a nitroreductase enzyme in walker carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 37(24), 4661–4669.
- Knox, R. J., Friedlos, F., Marchbank, T., & Roberts, J. J. (1991). Bioactivation of CB 1954: reaction of the active 4-hydroxylamino derivative with thioesters to form the ultimate DNA-DNA interstrand crosslinking species. *Biochemical Pharmacology*, 42(9), 1691–7.
- Korn, K., & Krausz, E. (2007). Cell-based high-content screening of small-molecule libraries. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5), 503–510.
- Kuhlmann, F. M., Robinson, J. I., Bluemling, G. R., Ronet, C., Fasel, N., & Beverley, S. M. (2017). Antiviral screening identifies adenosine analogs targeting the endogenous dsRNA *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) pathogenicity factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(5), E811–E819.
- Kumar Saha, A., Mukherjee, T., & Bhaduri, A. (1986). Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 19(3), 195–200.
- Landfear, S. M. (2001). Molecular genetics of nucleoside transporters in *Leishmania* and African trypanosomes. *Biochemical Pharmacology*, 62(2), 149–155.
- Le Hyaric, M., Almeida, M. V. de, & Souza, M. V. N. de. (2002). Síntese e reatividade de azaindoís: aplicações na preparação de moléculas de interesse biológico. *Química Nova*, 25(6b), 1165–1171.
- Leboho, T. C., Giri, S., Popova, I., Cock, I., Michael, J. P., & de Koning, C. B. (2015). Double Sonogashira reactions on dihalogenated aminopyridines for the assembly of an array of 7-azaindoles bearing triazole and quinoxaline substituents at C-5: Inhibitory bioactivity against *Giardia duodenalis* trophozoites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15), 4943–4951.
- Lei, S. M., Romine, N. M., & Beetham, J. K. (2010). Population changes in *Leishmania chagasi* promastigote developmental stages due to serial passage. *The Journal of Parasitology*, 96(6), 1134–8.
- Lightburn, E., Morand, J. J., Meynard, J. B., Kraemer, P., Chaudier, B., Pages, F., ... Chouc, C. (2003). Management of American cutaneous *Leishmaniasis*. Outcome apropos of 326 cases treated with high-dose pentamidine isethionate. *Medecine Tropicale : Revue Du*

- Corps de Sante Colonial*, 63(1), 35–44.
- Lindgren, E. B., de Brito, M. A., Vasconcelos, T. R. A., de Moraes, M. O., Montenegro, R. C., Yoneda, J. D., & Leal, K. Z. (2014). Synthesis and anticancer activity of (E)-2-benzothiazole hydrazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86, 12–16.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C., & Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21(8), 363–369.
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 83.
- Llanos-Cuentas, A., Tulliano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verastegui, C., Santamaria-Castrellon, G., Ramirez, L., ... Chappuis, F. (2008). Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous *Leishmaniasis* in Peru. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 223–31.
- Lucumi, A., Robledo, S., Gama, V., & Saravia, N. G. (1998). Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 1990–1995.
- M Nail, A., & M Imam, A. (2013). Visceral *Leishmaniasis*: Clinical and demographic features in an African population. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 29(2), 485–9.
- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. (2010) Miltefosine in the Treatment of Cutaneous *Leishmaniasis* Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. *PLoS Negl Trop Dis*4(12): e912.
- Maes, L., Beyers, J., Mondelaers, A., Van den Kerkhof, M., Eberhardt, E., Caljon, G., & Hendrickx, S. (2016). In vitro “time-to-kill” assay to assess the cidal activity dynamics of current reference drugs against *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72 (2), 428 - 430.
- Magili, A., Grogl, M., Gasser, R., Sun, W., & Oster, C. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N. Engl J Med*, 328, 1383 – 1387.
- Mahmoudzadeh-Niknam, H., & McKerrow, J. H. (2004). *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Experimental Parasitology*, 106(3), 158–163.
- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., Volf, P., Gradoni, L., ... Volf, P. (2011). Experimental Transmission of *Leishmania infantum* by Two Major Vectors: A

- Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1181.
- Marinho, F. A., Gonçalves, K. C. S., Oliveira, S. S. C., Gonçalves, D. S., Matteoli, F. P., Seabra, S. H., ... Branquinha, M. H. (2014). The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. *PLoS ONE*, 9(1), e87659.
- Marinho, F. de A., Gonçalves, K. C. da S., Oliveira, S. S. de, Oliveira, A.-C. de S. C. de, Bellio, M., d'Avila-Levy, C. M., ... Branquinha, M. H. (2011). Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 507–9.
- Marra, F., Chiappetta, M. C., & Vincenti, V. (2014). Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous *Leishmaniasis*: A literature review. *Acta Biomedica*, 85(1), 3–7.
- Marsden, P. D. (1986). Mucosal *Leishmaniasis* ("espundia"; Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6), 859–76.
- Marzilli, M., Trivella, M. G., Levantesi, D., Pelosi, G., Dalle Vacche, M., Taddei, L., & L'Abbate, A. (1985). Effect of dilazep on coronary and systemic circulations. *Pharmacology*, 31(2), 82–7.
- Matoussi, N., Ameer, H. B., Amor, S. B., Fitouri, Z., & Becher, S. B. (2007). Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37, S257–S259.
- McCall, L.-I., Zhang, W.-W., Matlashewski, G., Murray, H., Berman, J., Davies, C., ... Bern, C. (2013). Determinants for the Development of Visceral *Leishmaniasis* Disease. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003053.
- McKerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J., & Bouvier, J. (1993). The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 821–853.
- Mebrahtu, Y., Lawyer, P., Githure, J., Were, J. B., Muigai, R., Hendricks, L., ... Roberts, C. (1989). Visceral *Leishmaniasis* unresponsive to pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(3), 289–94.
- Medeiros, R., Kitazawa, M., Chabrier, M. A., Cheng, D., Baglietto-Vargas, D., Kling, A., ... LaFerla, F. M. (2012). Calpain Inhibitor A-705253 Mitigates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Cognitive Decline in Aged 3xTgAD Mice. *The American Journal of Pathology*, 181(2), 616–625.
- Mehdi, S. (1991). Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 150–153.

- Mehta, M. R., & Batra, S. (2016). Synthesis of Benzothiazole-Benzimidazole Thiazolidin Derivatives as Anti-Inflammatory and Analgesic. *Journal of Sciences J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. A*, 6(62), 410–418.
- Merlen, T., Sereno, D., Brajon, N., Rostand, F., Lemesre, J., & Able, T. (1999). *Leishmania* Spp.: Completely Defined Medium Without Serum and Macromolecules (Cdm / Lp) for the Continuous in Vitro Cultivation of Infective Promastigote Forms, 60(1), 41–50.
- Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Andreoli, W. K., Mortara, R. A., & Uliana, S. R. B. (2007). Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis amastigotes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 526–34.
- Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., & Uliana, S. R. B. (2008). Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania* amazonensis infections in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(6), e249.
- Miguel, D. C., Zauli-Nascimento, R. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Pereira, L. I. A., Jerônimo, S. M. B., Ribeiro-Dias, F., ... Uliana, S. R. B. (2011). Clinical isolates of New World *Leishmania* from cutaneous and visceral *Leishmaniasis* patients are uniformly sensitive to tamoxifen. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saude (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). (n.d.). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). (n.d.). Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015.
- Mitchell, D. J., & Minchin, R. F. (2008). E. coli nitroreductase/CB1954 gene-directed enzyme prodrug therapy: role of arylamine N-acetyltransferase 2. *Cancer Gene Therapy*, 15(11), 758–764.
- Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., ... Pahissa, A. (2014). Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 370(20), 1899–1908.
- Molina-Arcas, M., Casado, F., & Pastor-Anglada, M. (2009). Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), 426–434.
- Mondal, D., Alvar, J., Hasnain, M. G., Hossain, M. S., Ghosh, D., Huda, M. M., ... Arana, B. (2014). Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral *Leishmaniasis* in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study. *The Lancet*

- Global Health*, 2(1), e51–e57.
- Monte-Alegre, A., Ouaisi, A., & Sereno, D. (2006). *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 5, 6.
- Moraes, C. B., Giardini, M. A., Kim, H., Franco, C. H., Araujo-Junior, A. M., Schenkman, S., ... Freitas-Junior, L. H. (2014). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific Reports*, Published Online: 16 April 2014; / doi:10.1038/srep04703, 57, 390–395.
- Morais-Teixeira, E., Damasceno, Q. S., Galuppo, M. K., Romanha, A. J., & Rabello, A. (2011). The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 106(4), 475–478.
- Moreira, D. S., & Murta, S. M. F. (2016). Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in *Leishmania braziliensis* antimony resistance phenotype. *Parasites & Vectors*, 9(1), 641.
- Moreira, D., Santarém, N., Loureiro, I., Tavares, J., Silva, A. M., Amorim, A. M., ... Silvestre, R. (2012). Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1469.
- Moretti, D., Del Bello, B., Cosci, E., Biagioli, M., Miracco, C., & Maellaro, E. (2009). Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: cisplatin-induced changes in vitro and differential expression in melanocytic lesions. *Carcinogenesis*, 30(6), 960–967.
- Mpia, B., & Pepin, J. (2002). Combination of eflornithine and melarsoprol for melarsoprol-resistant Gambian trypanosomiasis. *Tropical Medicine and International Health*, 7(9), 775–779.
- Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Gedamu, L., Wilson, M., Behiw, C., Iatrou, K., ... Liu, M. (2005). Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Molecular Biology* 2005 6:1, 64(7), 1810–1818.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in *Leishmaniasis*. *The Lancet*, 366(9496), 1561–1577.
- Musa, A. M., Younis, B., Fadlalla, A., Royce, C., Balasegaram, M., Wasunna, M., ... Khalil, E. (2010). Paromomycin for the Treatment of Visceral *Leishmaniasis* in Sudan: A Randomized, Open-Label, Dose-Finding Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10),

e855.

- Naderer, T., & McConville, M. J. (2007). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular Microbiology*, *10*(2), 301–308.
- Naderer, T., & McConville, M. J. (2011). Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays In Biochemistry*, *51*, 81–95.
- Naderer, T., Vince, J. E., & McConville, M. J. (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current Molecular Medicine*, *4*(6), 649–65.
- Nes, W. D. (2011). Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. *Chemical Reviews*, *111*, 6423–6451.
- Noji, T., Karasawa, A., & Kusaka, H. (2004). Adenosine uptake inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, *495*(1), 1–16.
- Nühs, A., De Rycker, M., Manthri, S., Comer, E., Scherer, C. A., Schreiber, S. L., ... Gray, D. W. (2015). Development and Validation of a Novel *Leishmania donovani* Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(9), e0004094.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(1), 1–1.
- Ogbunude, P. O., al-Jaser, M. H., & Baer, H. P. (1991). *Leishmania donovani*: characteristics of adenosine and inosine transporters in promastigotes of two different strains. *Experimental Parasitology*, *73*(3), 369–75.
- Okanya, P. W., Mohr, K. I., Gerth, K., Jansen, R., & Müller, R. (2011). Marinoquinolines A–F, Pyrroloquinolines from *Ohtaekwangia kribbensis* (Bacteroidetes). *Journal of Natural Products*, *74*(4), 603–608.
- Okuno, T., Goto, Y., Matsumoto, Y., Otsuka, H., & Matsumoto, Y. (2003). Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Experimental Animals*, *52*(2), 109–18.
- Olego-Fernandez, S., Vaughan, S., Shaw, M. K., Gull, K., & Ginger, M. L. (2009). Cell Morphogenesis of *Trypanosoma brucei* Requires the Paralogous, Differentially Expressed Calpain-related Proteins CAP5.5 and CAP5.5V. *Protist*, *160*(4), 576–590.
- Ongarora, D. S. B., Gut, J., Rosenthal, P. J., Masimirembwa, C. M., & Chibale, K. (2012). Benzoheterocyclic amodiaquine analogues with potent antiplasmodial activity: Synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *22*(15),

5046–5050.

- Opartkiattikul, N., Sukpanichnant, S., Wanachiwanawin, W., Fucharoen, S., Funahara, Y., Sumiyoshi, A., ... Thientadakul, P. (1997). A double-blind placebo control trial of dilazep in beta-thalassemia/hemoglobin E patients. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 28 Suppl 3, 167–71.
- Orenes Lorente, S., Gómez, R., Jiménez, C., Cammerer, S., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., ... Gilbert, I. H. (2005). Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(10), 3519–3529.
- Paape, D., Bell, A. S., Heal, W. P., Hutton, J. A., Leatherbarrow, R. J., Tate, E. W., & Smith, D. F. (2014). Using a Non-Image-Based Medium-Throughput Assay for Screening Compounds Targeting N-myristoylation in Intracellular *Leishmania* Amastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12), e3363.
- Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 852–9.
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 56(1), 45–50.
- Patterson, S., & Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30(6), 289–98.
- Paulai, F. R., Serrano, S. H. P., & Tavares, L. C. (2009). Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, 32(4), 1013–1020.
- Pécoul, B., Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., & Torreele, E. (2004). New Drugs for Neglected Diseases: From Pipeline to Patients. *PLoS Medicine*, 1(1), e6.
- Pedrique, B., Strub-Wourgaft, N., Some, C., Olliaro, P., Trouiller, P., Ford, N., ... Bradol, J. H. (2013). The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): A systematic assessment. *The Lancet Global Health*.
- Peña, I., Pilar Manzano, M., Cantizani, J., Kessler, A., Alonso-Padilla, J., Bardera, A. I., ... Julio Martín, J. (2015). New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. *Scientific Reports*, 5(1), 8771.
- Pescher, P., Blisnick, T., Bastin, P., & Späth, G. F. (2011). Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology*, 13(7), 978–991.

- Pimentel, I. A. S., Paladi, C. de S., Katz, S., Júdice, W. A. de S., Cunha, R. L. O. R., & Barbiéri, C. L. (2012). In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium Compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS ONE*, 7(11), e48780.
- Pinazo, M.-J., Espinosa, G., Gállego, M., López-Chejade, P. L., Urbina, J. A., & Gascón, J. (2010). Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 583–7.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M.-A., & Bendig, M. (2005). Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(9), 727–740.
- Pinto, E. G., da Costa-Silva, T. A., & Tempone, A. G. (2014). Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania (L.) infantum*: an in vitro and in vivo evaluation using phosphatidylserine-liposomes. *Acta Tropica*, 137, 206–210.
- Piscopo, T. V., & Mallia Azzopardi, C. (2007). *Leishmaniasis*. *Postgraduate Medical Journal*, 83(976), 649–57.
- Playa, H., Lewis, T. A., Ting, A., Suh, B.-C., Muñoz, B., Matuza, R., ... Buolamwini, J. K. (2014). Dilazep analogues for the study of equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 (ENT1 and ENT2). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(24), 5801–5804.
- Prajapati, V. K., Mehrotra, S., Gautam, S., Rai, M., & Sundar, S. (2012). In vitro anti*Leishmanial* drug susceptibility of clinical isolates from patients with Indian visceral *Leishmaniasis*--status of newly introduced drugs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 655–7.
- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., ... Kande, V. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet*, 374(9683), 56–64.
- Pućkowska, A., Drozdowska, D., Rusak, M., Bielawski, T., Bruzgo, I., & Midura-Nowaczek, K. (2012). Amino and chlorambucil analogues of pentamidine--synthesis and biological examinations. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(1), 63–73.
- Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., & Loiseau, P. M. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1425–30.
- Ramesh, V., Kaushal, H., Mishra, A. K., Singh, R., Salotra, P., Alvar, J., ... Ostry, B. (2015). Clinico-epidemiological analysis of Post kala-azar dermal *Leishmaniasis* (PKDL) cases in India over last two decades: a hospital based retrospective study. *BMC Public Health*,

- 15(1), 1092.
- Randriamboavonjy, V., & Fleming, I. (2010). The Role of Calpain in Diabetes-Associated Platelet Hyperactivation. In *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* (Vol. 59, pp. 235–257).
- Reimão, J. Q., Miguel, D. C., Taniwaki, N. N., Trinconi, C. T., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., & Uliana, S. R. B. (2014). Anti*Leishmanial* Activity of the Estrogen Receptor Modulator Raloxifene. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2842.
- Rey, L. (2008). *Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais* (4^a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Rijal, S., Ostry, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P. C., ... Koirala, B. P. (2013). Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, 56(11), 153 – 158.
- Roberts, J. J., Friedlos, F., & Knox, R. J. (1986). CB 1954 (2,4-dinitro-5-aziridinyl benzamide) becomes a DNA interstrand crosslinking agent in Walker tumour cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140(3), 1073–8.
- Rodrigues, M. L. O, Costa, R. S., Souza, C. S., Foss, N. T. & Roselino, A. M. F. (1999). Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (glucantime) in the treatment of generalized cutaneous *Leishmaniasis*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41(1), 33–37.
- Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M. X., Ouellette, M., & Saravia, N. G. (2006). Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(10), 1375–83.
- Romero, G. A., Guerra, M. V, Paes, M. G., & Macêdo, V. O. (2001). Comparison of cutaneous *Leishmaniasis* due to *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 456–65.
- Roperto, S., De Tullio, R., Raso, C., Stifanese, R., Russo, V., Gaspari, M., ... Roperto, F. (2010). Calpain3 Is Expressed in a Proteolytically Active Form in Papillomavirus-Associated Urothelial Tumors of the Urinary Bladder in Cattle. *PLoS ONE*, 5(4), e10299.
- Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector - host interactions in *Leishmaniasis*. *Annu. Rev. Microbiol*, 55:453–83
- Sacks, D., & Perkins, P. (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223(4643).

- Sahu, P. K., Sahu, P. K., Gupta, S. K., Thavaselvam, D., & Agarwal, D. D. (2012). Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 4H-pyrimido[2,1-b]benzothiazole, pyrazole and benzylidene derivatives of curcumin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *54*, 366–378.
- Sakthianandeswaren, A., Foote, S. J., & Handman, E. (2009). The role of host genetics in *Leishmaniasis*. *Trends in Parasitology*, *25*(8), 383–391.
- Salotra, P., Duncan, R. C., Singh, R., Subba Raju, B. V., Sreenivas, G., & Nakhasi, H. L. (2006). Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal *Leishmaniasis*. *Microbes and Infection*, *8*(3), 637–644.
- Sanderson, L., Yardley, V., & Croft, S. L. (2014). Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(7), 1888–1891.
- Sangnoi, Y., Sakulkeo, O., Yuenyongsawad, S., Kanjana-opas, A., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A., & Suwanborirux, K. (2008). Acetylcholinesterase-inhibiting activity of pyrrole derivatives from a novel marine gliding bacterium, *Rapidithrix thailandica*. *Marine Drugs*, *6*(4), 578–86.
- Santagati, M., Modica, M., Santagati, A., Russo, F., Caruso, A., Cutuli, V., ... Amico-Roxas, M. (1994). Synthesis and pharmacological properties of benzothiazole, 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Die Pharmazie*, *49*(12), 880–4.
- SANTARÉM, N., CUNHA, J., SILVESTRE, R., SILVA, C., MOREIRA, D., OUELLETTE, M., & CORDEIRO-DA-SILVA, A. (2014). The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology*, *141*(02), 192–205.
- Saporito, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S., & Colomba, C. (2013). Visceral *Leishmaniasis*: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *International Journal of Infectious Diseases*, *17*(8), e572–e576.
- Sarkar, P., & Manna, M. (2015). Anti *Leishmanial* Activities of Some Antidepressant Drugs. *Research & Reviews: Journal of Zoological Sciences*, *4*(1), 1–8.
- Saxena, A., Worthey, E. A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K. D., & Myler, P. J. (2003). Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *129*(1), 103–14.
- Schröder, J., Noack, S., Marhöfer, R. J., Mottram, J. C., Coombs, G. H., & Selzer, P. M. (2013). Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors

- of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. *PLoS ONE*, 8(10), e77460.
- Seifert, K., Escobar, P., & Croft, S. L. (2010). In vitro activity of anti-*Leishmanial* drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 508–511.
- Seifert, K., Escobar, P., & Croft, S. L. (2010). In vitro activity of anti-*Leishmanial* drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 508–11.
- Serafim, T. D., Figueiredo, A. B., Costa, P. A. C., Marques-da-Silva, E. A., Gonçalves, R., de Moura, S. A. L., ... Afonso, L. C. C. (2012). *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), e1833.
- Sereno, D., Holzmuller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaiissi, A., & Lemesre, J. L. (2001). Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7), 2064–9.
- Sesana, A. M., Monti-Rocha, R., Vinhas, S. A., Morais, C. G., Dietze, R., & Lemos, E. M. (2011). In vitro activity of amphotericin B coxleates against *Leishmania chagasi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(2), 251–253.
- Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., & Zilberstein, D. (2001). Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 3971–3976.
- Shang, N., Li, Q., Ko, T.-P., Chan, H.-C., Li, J., Zheng, Y., ... Guo, R.-T. (2014). Squalene Synthase As a Target for Chagas Disease Therapeutics. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004114.
- Shuralyova, I., Tajmir, P., Bilan, P. J., Sweeney, G., & Coe, I. R. (2004). Inhibition of glucose uptake in murine cardiomyocyte cell line HL-1 by cardioprotective drugs dilazep and dipyrindamole. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 286(2), 627H–632.
- Singh, K., Garg, G., & Ali, V. (2016). Current therapeutics, their problems and thiol metabolism as potential drug targets in *Leishmaniasis*. *Current Drug Metabolism*, 17, 897–919.
- Singh, N., Humar, M., & Sing, R. (2012). *Leishmaniasis*: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 485 – 497.
- Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). *Leishmaniasis*: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(6), 485–497.
- Singh, N., Mishra, B. B., Bajpai, S., Singh, R. K., & Tiwari, V. K. (2014). Natural product based leads to fight against *Leishmaniasis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(1), 18–45.

- Singh, O. P., Gidwani, K., Kumar, R., Nylén, S., Jones, S. L., Boelaert, M., ... Sundar, S. (2012). Reassessment of immune correlates in human visceral *Leishmaniasis* as defined by cytokine release in whole blood. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 19(6), 961–6.
- Singh, O. P., Singh, B., Chakravarty, J., Sundar, S., Narain, J., Dash, A., ... Alam, S. (2016). Current challenges in treatment options for visceral *Leishmaniasis* in India: a public health perspective. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(1), 19.
- Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 758–777.
- Sinha, P. K., & Bhattacharya, S. (2014). Single-dose liposomal amphotericin B: an effective treatment for visceral *Leishmaniasis*. *The Lancet Global Health*. S2214-109(13) 70151-7
- Siqueira-Neto, J. L., Moon, S., Jang, J., Yang, G., Lee, C., Moon, H. K., ... Freitas-Junior, L. H. (2012). An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Siqueira-Neto, J. L., Song, O. R., Oh, H., Sohn, J. H., Yang, G., Nam, J., ... Freitas-Junior, L. H. (2010). Anti*Leishmanial* high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J*, 328, 721–732.
- Steert, K., Berg, M., Mottram, J. C., Westrop, G. D., Coombs, G. H., Cos, P., ... Augustyns, K. (2010). α -Ketoheterocycles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. *ChemMedChem*, 5(10), 1734–1748.
- Stein, A. (2003). Equilibrative Nucleoside Transporter Family Members from *Leishmania donovani* Are Electrogenic Proton Symporters. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35127–35134.
- Storr, S. J., Zhang, S., Perren, T., Lansdown, M., Fatayer, H., Sharma, N., ... Martin, S. G. (2014). The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*, 7(30), 47927–47937.
- Sundar, S., Agrawal, G., Rai, M., Makharia, M. K., & Murray, H. W. (2001). Treatment of Indian visceral *Leishmaniasis* with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 323(7310), 419–22.
- Sundar, S., Agrawal, N., Arora, R., Agarwal, D., Rai, M., & Chakravarty, J. (2009). Short-

- course paromomycin treatment of visceral *Leishmaniasis* in India: 14-day vs 21-day treatment. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(6), 914–8.
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2010). Liposomal amphotericin B and *Leishmaniasis*: dose and response. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 159–66.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K., & Rai, M. (2006). Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral *Leishmaniasis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, S26–S33.
- Sundar, S., Makharia, A., More, D. K., Agrawal, G., Voss, A., Fischer, C., ... Murray, H. W. (2000). Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral *Leishmaniasis*. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31(4), 1110–3.
- Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., ... Murray, H. W. (2000). Failure of pentavalent antimony in visceral *Leishmaniasis* in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31(4), 1104–7.
- Sundar, S., & Olliaro, P. L. (2007). Miltefosine in the treatment of *Leishmaniasis*: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 733–40.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M. K., Goyal, A. K., Mandal, A. K., Voss, A., ... Murray, H. W. (1998). Trial of oral miltefosine for visceral *Leishmaniasis*. *The Lancet*, 352(9143), 1821–1823.
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Ostin, B., ... Chakravarty, J. (2012). Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral *Leishmaniasis* in India After a Decade of Use. *Clinical Infectious Diseases*, 55(4), 543–550.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., ... Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral *Leishmaniasis* in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, 377(9764), 477–486.
- Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(7), 507–519.
- Sykes, M. L., & Avery, V. M. (2015). Development and application of a sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*,

- 5(3), 215–228.
- Tapia, R. A., Prieto, Y., Pautet, M., Domard, M., Sarciron, M. E., Walchshofer, N., & Fillion, H. (2002). Synthesis and anti*Leishmanial* activity of indoloquinones containing a fused benzothiazole ring. *European Journal of Organic Chemistry*, (23), 4005–4010.
- Taylor, D., Walden, J. C., Robins, A. H., & Smith, P. J. (2000). Role of the neurotransmitter reuptake-blocking activity of antidepressants in reversing chloroquine resistance in vitro in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2689–92.
- Tegazzini, D., Díaz, R., Aguilar, F., Peña, I., Presa, J. L., Yardley, V., ... Cantizani, J. (2016). A replicative in vitro assay for drug discovery against *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6):3524-32.
- Thakur, C. P., Sinha, G. P., Pandey, A. K., Barat, D., & Sinha, P. K. (1993). Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. *The National Medical Journal of India*, 6(2), 57–60.
- Tovar, J., Wilkinson, S., Mottram, J. C., & Fairlamb, A. H. (1998). Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Molecular Microbiology*, 29(2), 653–660.
- Trinconi, C. T., Reimão, J. Q., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Miguel, D. C., & Uliana, S. R. B. (2014). Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous *Leishmaniasis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2608–13.
- Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., & Ford, N. (2002). Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*, 359(9324):2188-94.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–6.
- Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), 311–318.
- Urbina, J. A. (2015). Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 149–156.
- Urbina, J. A., Concepcion, J. L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., & Hiyoshi, H. (2004). In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2379–87.
- Urbina, J. A., Concepcion, J. L., Rangel, S., Visbal, G., & Lira, R. (2002). Squalene synthase

- as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 125(1-2), 35–45.
- Vacchina, P., & Morales, M. A. (2014). In vitro screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1825–8.
- Vainzof, M., de Paula, F., Tsanaclis, A. M., & Zatz, M. (2003). The effect of calpain 3 deficiency on the pattern of muscle degeneration in the earliest stages of LGMD2A. *Journal of Clinical Pathology*, 56(8), 624–6.
- Valencia, C., Arévalo, J., Dujardin, J. C., Llanos-Cuentas, A., Chappuis, F., & Zimic, M. (2012). Prediction score for antimony treatment failure in patients with ulcerative *Leishmaniasis* lesions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1656.
- Van Baelen, G., Hostyn, S., Dhooghe, L., Tapolcsányi, P., Mátyus, P., Lemièrre, G., ... Pieters, L. (2009). Structure–activity relationship of antiparasitic and cytotoxic indoloquinoline alkaloids, and their tricyclic and bicyclic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(20), 7209–7217.
- Van Belle, H. (1993). Nucleoside transport inhibition: a therapeutic approach to cardioprotection via adenosine? *Cardiovascular Research*, 27(1), 68–76.
- van der Meide, W. F., Sabajo, L. O. A., Jensema, A. J., Peekel, I., Faber, W. R., Schallig, H. D. F. H., & Fat, R. F. M. L. A. (2009). Evaluation of treatment with pentamidine for cutaneous *Leishmaniasis* in Suriname. *International Journal of Dermatology*, 48(1), 52–58.
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., Boelaert, M., ... al., et. (2010). Combination therapy for visceral *Leishmaniasis*. *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(3), 184–94.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., & Ouellette, M. (2006). A Proteomics Screen Implicates HSP83 and a Small Kinetoplastid Calpain-related Protein in Drug Resistance in *Leishmania donovani* Clinical Field Isolates by Modulating Drug-induced Programmed Cell Death. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(1), 88–101.
- Verma, N. K., & Dey, C. S. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), 3010–5.
- Vermeersch, M., da Luz, R. I., Toté, K., Timmermans, J.-P., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to anti*Leishmanial* reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3855–9.
- Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K., & Ouellette, M. (2014).

- Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), 20–27.
- Visser, F., Vickers, M. F., Ng, A. M. L., Baldwin, S. A., Young, J. D., & Cass, C. E. (2002). Mutation of Residue 33 of Human Equilibrative Nucleoside Transporters 1 and 2 Alters Sensitivity to Inhibition of Transport by Dilazep and Dipyridamole. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 395–401.
- Voak, A. A., Seifert, K., Helsby, N. A., & Wilkinson, S. R. (2014). Evaluating aziridinyl nitrobenzamide compounds as leishmanicidal prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 370–7.
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S., & Saha, B. (2009). Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-*Leishmanial* Immune Response. *The Journal of Immunology*, 182(11), 7146–7154.
- Warburg Alon, Saraiva Elvira, Lanzaro Gregory C, Titus Richard G., N. F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* Sibling Species Differs in Its Composition and Capacity to Enhance *Leishmaniasis*. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 345(1312), 223 – 230.
- Wei, H., Jin, C.-Y., Viisanen, H., You, H.-J., & Pertovaara, A. (2014). Histamine in the locus coeruleus promotes descending noradrenergic inhibition of neuropathic hypersensitivity. *Pharmacological Research*, 90, 58–66.
- Weiss, F., Vogenthaler, N., Franco-Paredes, C., Parker, S. R. S., BL, H., RL, J., ... CF, A. (2009). *Leishmania tropica*-Induced Cutaneous and Presumptive Concomitant Viscerotropic *Leishmaniasis* With Prolonged Incubation. *Archives of Dermatology*, 145(9), 3145–3156.
- WHO. (2010). WHO Technical Report Series Control of the *Leishmaniases*. II. *World Health Organization*. III. Series. ISBN, 978, 22–26.
- WHO. (2016). Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire, 91, 285–296. Retrieved from <http://www.who.int/wer>
- WHO. (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases*, 3.9, 67–71.
- Woodland, A., Thompson, S., Cleghorn, L. A. T., Norcross, N., De Rycker, M., Grimaldi, R., ... Gilbert, I. H. (2015). Discovery of Inhibitors of *Trypanosoma brucei* by Phenotypic Screening of a Focused Protein Kinase Library. *ChemMedChem*, 10(11), 1809–20.
- World Health Organization. (2016a). *Leishmaniasis*. Number of cases of cutaneous *Leishmaniasis* reported: 2015. Retrieved July 4, 2017, from

- http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html
- World Health Organization. (2016b). *Leishmaniasis*. Number of cases of visceral *Leishmaniasis* reported: 2015. Retrieved July 4, 2017, from http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html
- Wyllie, S., Patterson, S., & Fairlamb, A. H. (2013). Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(2), 901–6.
- Wyllie, S., Patterson, S., Stojanovski, L., Simeons, F. R. C., Norval, S., Kime, R., ... Fairlamb, A. H. (2012). The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral *Leishmaniasis*. *Science Translational Medicine*, *4*(119), 119re1–119re1.
- Zang, R., Li, D., Tang, I.-C., Wang, J., & Yang, S.-T. (2012). Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, *1*, 31–51.
- Zauli-Nascimento, R. C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Pereira, L. I. A., Pelli de Oliveira, M. A., Ribeiro-Dias, F., ... Uliana, S. R. B. (2009). In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine & International Health*, *15*(1), 68–76.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Hughes, M. M., Wade, M. A., ... Duff, K. (2010). Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neuroscience*, *30*(36), 11938–11950.
- Zeng, H., Liu, S., Wang, P., Qu, X., Ji, H., Wang, X., ... Zhu, H. (2014). Dilazep synergistically reactivates latent HIV-1 in latently infected cells. *Molecular Biology Reports*, *41*(11), 7697–7704.
- Zhang, J.-H., Chung, & Oldenburg. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening*, *4*(2), 67–73.
- Zhang, Y., Legare, D. J., Geiger, J. D., & Lutt, W. W. (1991). Dilazep potentiation of adenosine-mediated superior mesenteric arterial vasodilation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *258*(3), 767–71.
- Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). *Leishmaniasis* drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, *6446*(17).

ANEXOS

Anexo I:

Laura M. Alcântara, Thalita C. S. Ferreira, Vanessa Fontana, Eric Chatelain, Carolina B. Moraes and Lucio H. Freitas-Junior. **A *Leishmania* multi-species high content screening assay for discovery of broad-spectrum activity anti*Leishmanials*.**

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação em revista indexada.

Abstract

Leishmaniasis is a complex of diseases that range from a mild, self-healing cutaneous form to an often deadly visceral form. The different forms of the disease are caused by different groups of *Leishmania* species. The few treatment options available for leishmaniasis are mostly unsatisfactory and show variable efficacy depending on the clinical form and geographical location. Here a multi-species high content assay to screen compounds against distinct clinically relevant *Leishmania* parasites is described. The semi-automated assay is based on the infection of THP-1 macrophages with *Leishmania* promastigotes and the evaluation of compound activity against intracellular amastigotes, and uses commercially available instruments for image analysis. The assay has been validated for *L. infantum*, *L. donovani*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, with a library containing FDA-approved and experimental drugs, screened in duplicate. The library screening resulted in the identification of compounds active against one or more *Leishmania* species with high efficacy and relatively moderate potency; however, only the dinitrobenzamide CB1954 presented activity against the full species panel. The described assay provides the basis for the discovery of novel broad spectrum anti-*Leishmanial* agents, while screening results highlight the reduced number of compounds with pan-*Leishmanial* activity that might be available from primary screening of diversity libraries.

Anexo II:

Alcântara, Laura M.; Moraes, Carolina B.; Freitas – Junior, Lucio H. ***Leishmania* high content screening: impact of different visceral strains in reference drugs activity and hit molecules prospection.**

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação em revista indexada.

Abstract

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Because the current treatment present critical drawbacks, the discovery and development of new drugs are priority. Among the assays available for drug candidates' triage, the High Content Screening (HCS) represent a potential alternative, as the technique correlates the high throughput efficiency with biologically relevant models. However, HCS protocols have been developed, to the date, for a limited number of *Leishmania* strains, mostly *L. donovani* representatives, although different strains may diverge considerably in regard to drug susceptibility. In this context, we established a panel of *Leishmania* visceral strains in order to investigate differences in infection profiles and evaluate both reference drugs and candidates anti*Leishmanial* activity. For each strain, the biological model was established by determining the best conditions of host cell and parasite culture, infection and period of drug exposition. In addition, an image analysis method was standardized using a commercial software. Among the strains established, differences were observed in the general infection parameters: such as infection ratio, intracellular amastigotes number and multiplying amastigotes ratio; also, diverging results were verified for reference compounds activity: while amphotericin B presented consistent activity against the representatives, with EC₅₀ values between 0.7 and 1.9 μM, miltefosine showed strain dependent-activity (EC₅₀ = 0.4 a 7.6 μM). The strain-specificity profile also occurred in the killing kinetics of reference compounds and in the activity of potential candidates. It provides a profile on a compound's activity against different strains, which could be determinant for an appropriate selection of candidates as starting points for drug discovery and contribute to the development of novel broad spectrum anti-*Leishmanial* agents.

Anexo III:

Gomes M., Alcântara L., Neves B., Melho-Filho C., Freitas – Junior L., Moraes C., Ma R., Franzblau S., Muratov E., Andrade C. **Computer-Aided Discovery of Two Novel Chalcone-Like Compounds Active and Selective Against *Leishmania infantum***. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 (2017) 2459–2464



Contents lists available at ScienceDirect

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/0960894X>

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

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



Computer-aided discovery of two novel chalcone-like compounds active and selective against *Leishmania infantum*



Marcelo N. Gomes^a, Laura M. Alcântara^b, Bruno J. Neves^{a,c}, Cleber C. Melo-Filho^a, Lucio H. Freitas-Junior^d, Carolina B. Moraes^b, Rui Ma^e, Scott G. Franzblau^e, Eugene Muratov^{f,g,h}, Carolina Horta Andrade^{a,*}

^a LabMol – Laboratory for Molecular Modeling and Drug Design, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Rua 240, Qd.87, Setor Leste Universitário, Goiânia, Goiás 74605-510, Brazil

^b Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), 13083-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil. ^d Instituto Butantan – Sao Paulo, Sao Paulo 05503-900, Brazil

^c Postgraduate Program on Society, Technology and Environment, University Center of Anápolis/UniEVANGELICA, Anápolis, Goiás 75083-515, Brazil

^d Instituto Butantan –Sao Paulo, Sao Paulo 05503-900, Brazil

^e Institute for Tuberculosis Research, University of Illinois at Chicago, 833 South Wood Street, Chicago, IL 60612, United States

^f Laboratory for Molecular Modeling, Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, United States

^g Department of Chemical Technology, Odessa National Polytechnic University, Odessa 65000, Ukraine

^h Currently Visiting Professor at Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Endemic in 88 countries, leishmaniasis are infectious diseases caused by parasites of genus *Leishmania* and transmitted to the humans by the bite of female phlebotomine sandfly.^{1,2} According to the World Health Organization (WHO), around 1.3 million new cases occur per year.³ Visceral leishmaniasis (VL), also known as Kala-azar, is the most severe form, in which vital organs are affected causing chronic fever, liver issues, spleen enlargement, anemia, and other blood problems.^{4,5}

The first-line drugs for treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials, meglumine antimoniate (Glucantime[®]) and sodium stibogluconate (Pentosan[®]). If they fail, second-line drugs

such as pentamidine, amphotericin B and miltefosine are used.² However, the long-term treatment and severe side effects are limitations of the available drugs. Moreover, resistance development against the available drugs has increased over the years. Additionally, the high cost of some therapies has limited their use for poor people in developing countries. Thus, there is an urgent need for the discovery of new drugs based on new molecular scaffolds for this neglected disease.⁴

Recent advances in genomics have triggered a shift in drug discovery from the paradigm of focusing on strong single-target interaction to more global and comparative analysis of multi-targets network.^{6,7} *In silico* methods, including target- and ligand-based strategies, are widely used in industry and academia complementary to experimental techniques.⁸ For instance, *in silico* target fishing can enable the discovery of a number of putative targets for a given set of small molecules with known biological effects.⁹

* Corresponding author at: LabMol, Laboratory for Molecular Modeling and Drug Design, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Rua 240, Qd.87, Setor Leste Universitário, Goiânia, GO 74605-170, Brazil.

E-mail addresses: carolhandrade@gmail.com, carolina@ufg.br (C.H. Andrade).

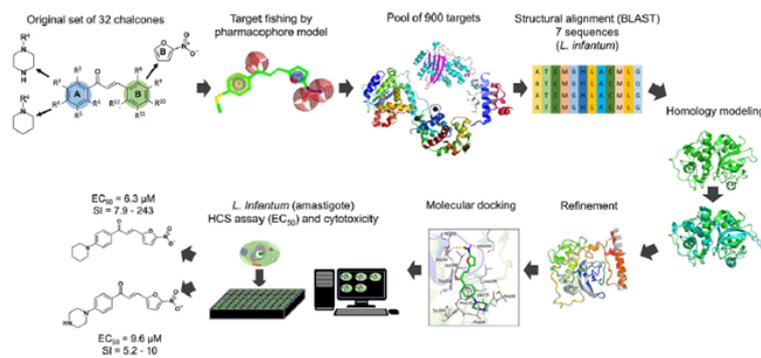


Fig. 1. Computer-aided approach to discovery new chalcones with antileishmanial activity.

Table 1

Results obtained from sequence alignment on BLAST.

Target	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identity
Actin	590	590	99%	0.0	70%
Casein Kinase II	400	400	97%	6.00E-143	62%
Cathepsin B	256	256	97%	2.00E-86	45%
Cathepsin L	382	382	86%	4.00E-132	49%
CKdhfr-ts	249	249	99%	1.00E-82	45%
GG3PD	408	408	63%	2.00E-147	85%
Heat stock protein 70	687	687	70%	0.0	73%

Dhfr-ts: Dihydrofolate reductase; GG3PD: Glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Table 2

Summary of statistics of obtained 3D models of *L. infantum* proteins.

Target Uniprot (ID)	Template information			PROCHECK analysis			
	Cov.	Seq. Id.	Temp.	MFR	AAR	GAR	DR
Actin (P60010)	99%	72%	1YAG	95.3%	4.3%	0.3%	0.0%
CK2 (P68400)	90%	57%	3PE2	93.7%	6.0%	0.0%	0.4%
CathepsinB (Q6R7Z5)	90%	52%	3MOR	93.3%	5.7%	0.5%	0.5%
Cathepsin L (P07711)	62%	41%	1 CJL	90.4%	9.2%	0.0%	0.4%
Dhfr-ts (A7ASX7)	91%	44%	3NRR	89.1%	9.3%	0.7%	0.9%
G3PD (P22513)	96%	85%	1K3T	92.2%	5.2%	1.6%	1.0%
Hsp70 (P54652)	99%	71%	5FPN	94.7%	5.3%	0.0%	0.0%

CK2: Creatine kinase 2; Cov.: coverage; Seq. Id.: Sequence Identity; Temp.: Template; MFR: Most Favoured Regions; AAR: Additional Allowed Regions; GAR: Generously Allowed Regions; DR: Disallowed Regions.

Chalcones are biologically classified as secondary metabolites of low molecular weight. In medicinal chemistry, they are considered privileged structures for research and development of new drugs, due to the diversity of substituents that can be linked to conjugated system scaffold.¹⁰ Chemically, chalcones are classified as 1,3-diaryl-2-propen-1-ones and possess a broad spectrum^{11–24} of properties including antileishmanial activity.²⁵ Previous studies have reported the *in vitro* and *in vivo* activity of chalcones and chalcone-like (heteroaryl chalcone) compounds against *Leishmania donovani*,^{26,27} suggesting that chalcones have potential as antileishmanial agents.

The goal of this study was to identify novel antileishmanial compounds among 32 previously synthesized chalcones and heteroaryl chalcones (chalcone-like) compounds.²⁸ The general workflow is shown in Fig. 1. Initially, 32 compounds have been submitted to a target fishing approach using pharmacophore modelling. Then, the 3D structures of selected targets were obtained by homology modeling and we performed molecular docking with the 32 chalcones and the selected targets. Finally, the *in vitro* biological activity on *Leishmania infantum*, cytotoxicity on macrophages and

Vero cells and selectivity of promising compounds were evaluated experimentally.

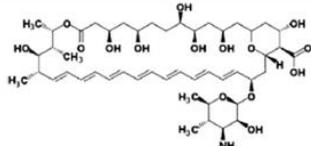
On the search of potential targets for the antileishmanial hits, we used the PharmMapper server,^{7,29} a database that is backed up by a large, in-house repertoire of pharmacophore information extracted from all the targets available in TargetBank, DrugBank, BindingDB, and PDTD (Potential Drug Target Database). The original dataset of 32 chalcones and chalcone-like compounds was submitted to the web server, generating a list of targets and a maximum of 300 conformations for each ligand, which were ranked by the fit score to the pharmacophore model. These results are presented on Table S1 (Supporting Information). Then, all targets were aligned on BLAST server.³⁰ As a result, 7 sequences were identified as potential targets for *L. infantum* hits (Table 1), all presenting high primary sequence identity (>30%).

Based on these results, homology models of the seven selected proteins were built on SWISS-MODEL server³¹ (Table 2), by comparing target sequences with sequences of other proteins with available 3D structures, which were used as templates. The quality of the models was evaluated in PROCHECK³², and the quality of dihedral angles

Table 3
In vitro antileishmanial activity EC₅₀ (μM), toxicity (CC₅₀ μM) and selectivity index (SI) in macrophages and Vero cells of chalcones and chalcones-like.

Code	Structure	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI	CC ₅₀ (μM)	SI
LabMol-69		>50	>50	N.D	N.D	N.D
LabMol-73		9.6	>50	>5.2	>100	10
LabMol-65		6.3	>50	>7.9	349	55
LabMol-67		30.7	>50	>1.6	N.D	N.D
LabMol-70		>50	>50	N.D	N.D	N.D
LabMol-76		>50	>50	N.D	>100	2
LabMol-86		31.07	8.4	0.2	>100	3
LabMol-90		>50	>50	N.D	N.D	N.D
LabMol-72		10.9	31.1	2.8	>100	10
LabMol-82		23.8	14.9	0.6	68.8	2.9
LabMol-92		9.3	13.1	1.4	40.7	4.3
LabMol-78		27.1	49.5	1.8	>100	3.6

Table 3 (continued)

Code	Structure	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI	CC ₅₀ (μM)	SI
Amph.B		1.9	9.8	>5.2	N.D	N.D

* Macrophage.
 ** Vero cells.

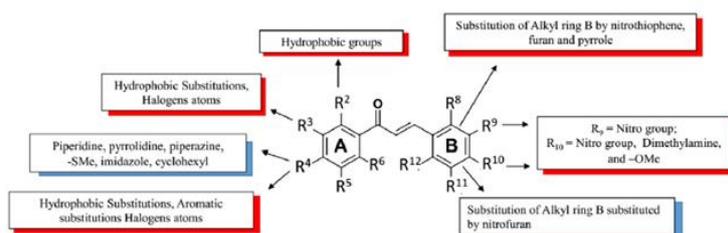


Fig. 2. Derived SAR rules highlighting structural moieties favorable and unfavorable to the anti-leishmanial activity. Red boxes are unfavorable groups and blue boxes are favorable groups.

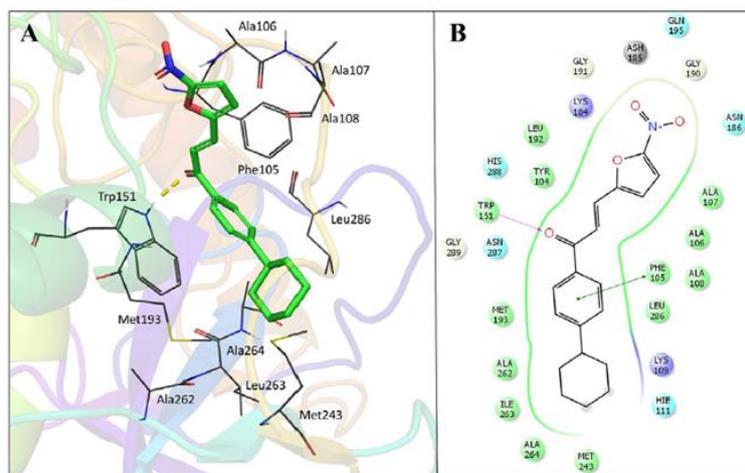


Fig. 3. 3D (A) and 2D (B) visualization of interactions of LabMol-72 within the binding site of procathepsin L, obtained by docking.

(phi and psi) was analyzed. Furthermore, GalaxyWEB³³ was used to refine loop and terminus regions of the best template of each target. The results are presented on Table 2 and Supplementary Fig. S1 (A–G). It can be observed that 89.1–94.7% of residues from the modeled proteins are on the most favored regions (red), 5.2–9.3% on the allowed regions (yellow), 0.0–1.6% on the generously allowed regions (beige) and just 0.0–1.0% on the disallowed regions (white).

The residues in the disallowed regions were located in regions far from the binding sites, and therefore, did not affect the quality of the models. Therefore, the generated homology models could be used for the estimation of the binding modes and affinity of ligands to the proteins by docking.

After the building, selection, and analysis of the homology models, they were used to perform molecular docking of chalcone and chalcone-like compounds. Chemical structures were carefully curated following the protocols developed by Fourches et al.^{34–36} Based on the results of docking (Supplemental Table S2), we have selected nine promising compounds (LabMol-69, 73, 65, 67, 70, 76, 86, 90, and 72) and potentially inactive compounds (LabMol-82, 92, and 78) as negative controls.

Twelve selected chalcone-like compounds and amphotericin B, used as positive control, were tested against *L. infantum* amastigotes and differentiated THP-1 macrophages (Table 3). Three out of nine selected compounds (LabMol-65, LabMol-72,

and **LabMol-73**) showed reasonably high activity ($6.32 < EC_{50} < 10.98 \mu\text{M}$). Other six compounds were inactive. Amphotericin B exhibits EC_{50} of $1.9 \mu\text{M}$. Among negative controls, **LabMol-72**, and **LabMol-73** were expectedly inactive, while **LabMol-92** has demonstrated EC_{50} of $9.31 \mu\text{M}$. Among four active compounds, during cytotoxicity assays on macrophages, only **LabMol-65** and **LabMol-73** showed $CC_{50} > 50 \mu\text{M}$ that resulted in SI > 5.2 and 7.9 , respectively (Table 3). Amphotericin B exhibits CC_{50} of $9.8 \mu\text{M}$ and SI of 5.2 ; therefore, **LabMol-65** exhibited SI higher than the control and **LabMol-73** showed selectivity index (SI) similar to or higher than the control. All active compounds were also tested against Vero cells²⁸ (Table 3). **LabMol-65** and **LabMol-73** demonstrated SI's in the range 55 – 243 and 4 – 10 , respectively, that make them promising anti-leishmanial agents. All the details regarding conducted experiments and the complete table with biologic evaluation (Table S3) are available in Supplemental Information.

Based on the experimental results, we derived structure–activity relationships (SAR) rules to reveal the structural fragments responsible for antileishmanial activity (Fig. 2). On the aryl ring B, independently of substituent positions on ring A, nitro group in position R^9 and nitro-, dimethylamino-, and methoxy- groups in position R^{10} decrease the activity. The substitution of aryl ring B by furan and 5-nitrothiophene are also unfavorable. However, the substitution of aryl ring B by 5-nitrofurane is favorable to biological activity. Bulky groups and electron donor groups on R^4 position of aryl ring A, e.g., piperidine, pyrrolidine, piperazine, methylthiole, imidazole, and cyclohexyl are favorable for antileishmanial activity, while methyl, *t*-butyl, buthyl, phenyl, morpholine and halogens atoms are unfavorable. The hydrophobic substituents and halogen atoms tested in positions R^2 and R^3 also demonstrated negative contribution to antileishmanial activity.

The results of target fishing approach, followed by homology modeling and molecular docking allowed us to rationalize the mode of action of four active compounds (**LabMol-65**, **LabMol-72**, **LabMol-73**, and **LabMol-92**). They might interact with the cysteine protease procathepsin L, demonstrating their potential for blocking the replication and differentiation of *Leishmania* *in vitro* and *in vivo*. These analyses revealed that the exploration of modifications on scaffolds of chalcones identified here could afford new promising candidates against *L. infantum* and suggest that the mode of action of these compounds could be by inhibition of cysteine proteases of the parasite.

Cysteine proteases constitute an important class of enzymes responsible for virulence factors, essential to parasite survival and are potential drug targets.^{37–39} Fig. 3A and B show the obtained docked poses for **LabMol-72** and its molecular interactions in the active site of procathepsin L. As we can see, hydrophobic interactions and the hydrogen bond are showed. The analysis of the hits in the active site cavity reveals that the hydrophobic pocket is important for interaction with procathepsin L. Moreover, Trp151 plays a significant role by performing a hydrogen bond with the carboxyl group of chalcone (see SI Figs. S2, S3, S4 and Table S4 on Supplementary data).

To summarize, the set of 32 recently synthesized²⁸ chalcone and chalcone-like compounds was evaluated by computational approaches to verify their potential antileishmanial activity. By results of this *in silico* evaluation, nine potentially active and three potentially inactive compounds were experimentally tested against *L. infantum* amastigotes. Four compounds showed $EC_{50} < 11 \mu\text{M}$. Among them, two compounds, **LabMol-65** and **LabMol-73**, exhibited cytotoxicity in macrophages $> 50 \mu\text{M}$ that resulted in better selectivity than the standard drug amphotericin B. These two compounds also demonstrated low cytotoxicity and high selectivity towards Vero cells. Based on modeling results, we suggested that activity of these compounds is caused by their interaction with cysteine proteases of the parasite. We also

conducted SAR analysis to derive structural recommendations useful for molecular design of new chalcones or chalcone-like compounds with antileishmanial activity. For instance, the substitution of aryl ring B by 5-nitrofurane is favorable. The other nitrofurane analogues, nitrothiophenes, aromatic rings, pyrrole, and furan analogues were inactive against amastigotes of *L. infantum* (see Supplementary Table S3). These results corroborates with other studies which demonstrated that chalcones^{5,25} and nitroheterocycle⁴⁰ compounds are active against *Leishmania* species.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

The authors thank Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES and FAPEG for financial support and fellowships. E.M. acknowledge NIH (grant 1U01CA207160), and CNPq (grant 400760/2014-2) for partial financial support. C.H.A. is productivity fellow of CNPq. We are grateful to OpenEye Scientific Software, Inc. and ChemAxon for providing academic license of their software.

A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.010>.

References

- Capriles PVSZ, Baptista LPR, Guedes IA, et al. *J Mol Graph Model*. 2015;55:134–147.
- dos Santos MS, Oliveira MLV, Bernardino AMR, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21:7451–7454.
- World Health Organization Leishmaniasis Fact sheet N°375 2016.
- Moreno MA, Alonso A, Alcolea PJ, et al. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014;4:347–354.
- Ogungbe IV, Erwin WR, Setzer WN. *J Mol Graph Model*. 2014;48:105–117.
- Rognan D. *Br J Pharmacol*. 2007;152:38–52.
- Liu X, Ouyang S, Yu B, et al. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:5–7.
- Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. *Drug Discovery Today*. 2011;16:298–310.
- Erić S, Ke S, Barata T, et al. *Bioorg Med Chem*. 2012;20:5220–5228.
- Nicolaou K, Pfefferkorn J, Roecker A, Cao G, Barleunga S. *J Am Chem Soc*. 2000;122:9939–9953.
- Syam S, Abdelwahab SI, Al-Mamary MA, Mohan S. *Molecules*. 2012;17:6179–6195.
- Aoki N, Muko M, Ohta E, Ohta S. *J Nat Prod*. 2008;71:1308–1310.
- Chen YH, Wang WH, Wang YH, Lin ZY, Wen CC, Chern CY. *Molecules*. 2013;18:2052–2060.
- Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V. *Eur J Med Chem*. 2015;98:69–114.
- Rizvi SUF, Siddiqui HL, Johns M, Deterio M, Schinazi RF. *Med Chem Res*. 2012;21:3741–3749.
- Hans RH, Guantai EM, Lategan C, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20:942–944.
- Chen M, Zhai L, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2023–2029.
- Ouattara M, Sissouma D, Koné MW, Hervé E, Touré SA, Ouattara L. *Trop J Pharm Res*. 2011;10:767–775.
- López SN, Castelli MV, Zacchino SA, et al. *Bioorg Med Chem*. 2001;9:1999–2013.
- Avila-Villarreal G, Hernández-Abreu O, Hidalgo-Figueroa S, et al. *Phytomedicine*. 2013.
- Yamamoto T, Yoshimura M, Yamaguchi F, et al. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68:1706–1711.
- Jamal H, Ansari WH, Rizvi SJ. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22:673–681.
- Lam KW, Uddin R, Liew CY, et al. *Med Chem Res*. 2011;21:1953–1966.
- Sato Y, He J-X, Nagai H, Tani T, Akao T. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:145–149.
- Passalacqua TG, Torres FAE, Nogueira CT, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25:3564–3568.
- Gupta S, Shivahare R, Korthikunta V, et al. *J Med Chem*. 2014;57:3342–3357.
- Gupta S, Shivahare R, Korthikunta V, Singh R, Gupta S, Tadioppula N. *Eur J Med Chem*. 2014;81:359–366.
- Gomes MN, Braga RC, Grzelak EM, et al. *Eur J Med Chem – Accept*. 2017.
- Liu X. PharmMapper.
- NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, 2016.

31. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:W252–W258.
32. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. *J Appl Crystallogr.* 1993;26:283–291.
33. Ko J, Park H, Heo L, Seok C. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:294–297.
34. Fourches D, Muratov EN, Tropsha A. *J Chem Inf Model.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00129>.
35. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. *J Chem Inf Model.* 2010;50:1189–1204.
36. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. *Nat Chem Biol.* 2015;11:535.
37. Caffrey CR, Steverding D. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;167:12–19.
38. Ascenzi P, Bocedi A, Visca P, Antonini G, Gradoni L. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309:659–665.
39. Ascenzi P, Salvati L, Bolognesi M, Colasanti M, Politicelli F, Venturini G. *Curr Protein Pept Sci.* 2001;2:137–153.
40. Petri E, Silva SCS, Palace-Berl F, Tavares LC, Soares SRC, Lindoso JAL. *Exp Parasitol.* 2016;163:68–75.

Anexo IV:

Gabrielle Frizzo Souza, Simon Bernhard Cämmerer, Caio Haddad Franco, Laura Maria Alcantara, Carolina Borsoi Moraes, Lúcio Holanda Freitas-Junior, **N-[4-[Benzyloxy]benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular Amastigotes from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*. 2016, 4 (11): 570 – 578**

Simon Bernhard Cämmerer et al, IJCPS, 2016, 4(11): 575–583

CODEN (USA): IJCPNH | ISSN: 2321-3132



International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences

Journal Home Page: www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps



Research Article

Open Access

N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* Amastigotes

Gabrielle Frizzo Souza¹, **Simon Bernhard Cämmerer**^{1*}, **Caio Haddad Franco**², **Laura Maria Alcantara**², **Carolina Borsoi Moraes**², **Lucio Holanda Freitas-Junior**^{2*}

¹Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato S/N, Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Chagas disease and Leishmaniasis, caused respectively by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*, are neglected tropical diseases for which only unsatisfactory chemotherapeutic options are available. Therefore, there is still an urgent need to develop novel and improved pharmaceuticals for the treatment of these diseases. Inhibition of sterol biosynthesis has been proposed as a strategy for chemotherapy of *Trypanosoma spp.* and *Leishmania spp.*, because they mainly depend on endogenous ergosterol. Benzyl farnesyl amine has been proven to exhibit high inhibition of human squalene synthase (SQS), a key enzyme of cholesterol biosynthesis in man. Isosteric replacement of the farnesyl chain for benzyloxybenzyl substituent has been demonstrated to result in derivatives with stronger inhibition of human SQS and higher metabolic stability. These mimetics of benzyl farnesyl amine have never been tested for biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. In this study, a small library of substituted N-[4-[benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines was prepared by chemical synthesis and tested for biological activity against these pathogenic tropical protozoa. All compounds exhibited high activity against intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. N-[4-[3',4'-Dimethoxy]-benzyloxy]benzyl]-benzenemethaneamine hydrochloride **6 c** showed, with EC₅₀ : 2.8 μM, the highest potency against *Trypanosoma cruzi*, comparable to the activity of the positive control benznidazole (EC₅₀ : 3.0 μM), whereas (S)-α-methyl-N-[4-[benzyloxy]benzyl]-benzenemethaneamine hydrochloride **6 f** presented the most potent activity against *Leishmania infantum*, with EC₅₀ : 7.7 μM. The compounds presented a high selectivity towards *Leishmania infantum* amastigotes. This finding demonstrates that structurally simple SQS inhibitors have a high potential in anti-Chagas and anti-Leishmaniasis drug design. It is of great importance for the development of novel, low cost antitrypanosomal and antileishmanial drugs in emerging countries.

Keywords: Benzyl Farnesyl Amine Mimetics, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, Neglected Tropical Infectious Diseases Drug Discovery

ARTICLE INFO

CONTENTS

1. Introduction	576
2. Materials and Method.	577
3. Results and Discussion.	578
4. Conclusion.	579
5. Acknowledgement.	582
6. References	582

Article History: Received 18 September 2016, Accepted 15 October 2016, Available Online 27 November 2016

Citation: Simon Bernhard Cämmerer, et al. N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* Amastigotes. *Int. J. Chem. Pharm. Sci.*, 2016, 4(11): 575-583.

Anexo V:

Chiara Borsari, Nuno Santarem, Juan Torrado, Ana Isabel Olías, María Jesús Corral, Catarina Baptista, Sheraz Gul, Markus Wolf, Maria Kuzikov, Bernhard Ellinger, Gesa Witt, Philip Gribbon, Jeanette Reinshagen, Pasquale Linciano, Annalisa Tait, Luca Costantino, Lucio H. Freitas-Junior, Carolina B. Moraes, Pascoalino Bruno dos Santos, Laura Maria Alcântara, Caio Haddad Franco, *et al.* **Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 126:1129-1135.

European Journal of Medicinal Chemistry 126 (2017) 1129–1135



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Short communication

Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds



Chiara Borsari ^a, Nuno Santarem ^b, Juan Torrado ^c, Ana Isabel Olías ^{c, e},
 María Jesús Corral ^{c, e}, Catarina Baptista ^b, Sheraz Gul ^d, Markus Wolf ^d, Maria Kuzikov ^d,
 Bernhard Ellinger ^d, Gesa Witt ^d, Philip Gribbon ^d, Jeanette Reinshagen ^d,
 Pasquale Linciano ^a, Annalisa Tait ^a, Luca Costantino ^a, Lucio H. Freitas-Junior ^f,
 Carolina B. Moraes ^f, Pascoalino Bruno dos Santos ^f, Laura Maria Alcântara ^f,
 Caio Haddad Franco ^f, Claudia Danielli Bertolacini ^f, Vanessa Fontana ^f,
 Paloma Tejera Nevado ^g, Joachim Clos ^g, José María Alunda ^{c, e},
 Anabela Cordeiro-da-Silva ^b, Stefania Ferrari ^a, Maria Paola Costi ^{a, *}

^a University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi 103, 41125, Modena, Italy^b Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180 Porto, Portugal and Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto and Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180, Porto, Portugal^c Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain^d Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology Screening Port, Hamburg, Germany^e Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain^f Brazilian Centre for Research in Energy and Materials, Campinas, Brazil^g Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, D-20359, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2016

Received in revised form

6 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Chalcones

*Trypanosoma brucei**Trypanosoma cruzi**Leishmania infantum*

Early toxicity studies

Cyclodextrins formulation

ABSTRACT

Chalcones display a broad spectrum of pharmacological activities. Herein, a series of 2'-hydroxy methoxylated chalcones was synthesized and evaluated towards *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. Among the synthesized library, compounds **1**, **3**, **4**, **7** and **8** were the most potent and selective anti-*T. brucei* compounds (EC₅₀ = 1.3–4.2 μM, selectivity index >10-fold). Compound **4** showed the best early-tox and antiparasitic profile. The pharmacokinetic studies of compound **4** in BALB/c mice using hydroxypropyl-β-cyclodextrins formulation showed a 7.5 times increase in oral bioavailability.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The kinetoplastid parasites *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. are responsible for potentially fatal insect-borne diseases namely, respectively, Human African Trypanosomiasis (HAT), Chagas disease and Leishmaniasis [1–3]. Despite the serious health, economic and social consequences of these parasitic infections, there are no available vaccines. Therefore,

disease control relies only on chemotherapy and prophylaxis. The available drugs suffer from many drawbacks including toxicity, poor efficacy and drug resistance [4]. Hence, there is an urgent requirement for new, safe and effective drugs. Phenotypic screening approaches have been successfully used in the field of neglected diseases, particularly for the treatment of HAT [5]. Two compounds, discovered through a phenotypic screening, have recently been progressed into clinical trials by DNDI: fexinidazole, a nitroimidazole, and SCYX-7158, an oxaborole [6]. In the drug discovery process for new antileishmanial and antitrypanosomal drugs, phenotypic screening and follow up optimization were largely applied and provided a wide range of chemical structures,

* Corresponding author.

E-mail addresses: Gesa.Witt@ime.fraunhofer.de (G. Witt), Philip.Gribbon@ime.fraunhofer.de (P. Gribbon), mariapaola.costi@unimore.it (M.P. Costi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.017>

0223-5234/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Anexo VI:

Flavio Di Pisa, Giacomo Landi, Lucia Dello Iacono, Cecilia Pozzi, Chiara Borsari, Stefania Ferrari, Matteo Santucci, Nuno Santarem, Anabela Cordeiro Da Silva, Carolina B. Moraes, Laura M. Alcantara, Vanessa Fontana, Lucio H. Freitas-Junior, Sheraz Gul, Maria Kuzikov, Birte Behrens, Ina Pöhner, Rebecca C. Wade, Maria Paola Costi *, Stefano Mangani. **Chroman-4-one derivatives targeting pteridine reductase 1 and showing anti-parasitic activity.** *Molecules*, 2017.



Article

Chroman-4-One Derivatives Targeting Pteridine Reductase 1 and Showing Anti-Parasitic Activity

Flavio Di Pisa ¹, Giacomo Landi ¹, Lucia Dello Iacono ¹, Cecilia Pozzi ¹, Chiara Borsari ², Stefania Ferrari ², Matteo Santucci ², Nuno Santarem ³, Anabela Cordeiro-da-Silva ³, Carolina B. Moraes ⁴, Laura M. Alcantara ⁴, Vanessa Fontana ⁴, Lucio H. Freitas-Junior ^{4,5}, Sheraz Gul ⁶, Maria Kuzikov ⁶, Birte Behrens ⁶, Ina Pöhner ⁷, Rebecca C. Wade ^{7,8,9}, Maria Paola Costi ^{2,*} and Stefano Mangani ^{1,10,*}

- ¹ Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, 53100 Siena, Italy; dipisa2@unisi.it (F.D.P.); landi31@unisi.it (G.L.); delloiacono3@unisi.it (L.D.I.); pozz4@unisi.it (C.P.)
 - ² Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi 103, 41125 Modena, Italy; chiara.borsari@unimore.it (C.B.); stefania.ferrari@unimore.it (S.F.); matteo.santucci@unimore.it (M.S.)
 - ³ Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180 Porto, Portugal and Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto and Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180 Porto, Portugal; santarem@ibmc.up.pt (N.S.); cordeiro@ibmc.up.pt (A.C.-d.-S.)
 - ⁴ Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPem), Campinas SP13083-100, Brazil; carolinaborsoi@gmail.com (C.B.M.); laura.alcantara@lnbio.cnpem.br (L.M.A.); fontana_vanessa@yahoo.com.br (V.F.); lucio.freitas@butantan.gov.br (L.H.F.-J.)
 - ⁵ GARDE, Instituto Butantan, São Paulo SP05503-900, Brazil
 - ⁶ Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology Screening Port, D-22525 Hamburg, Germany; Sheraz.Gul@ime.fraunhofer.de (S.G.); Maria.Kuzikov@ime.fraunhofer.de (M.K.); Birte.Behrens@ime.fraunhofer.de (B.B.)
 - ⁷ Molecular and Cellular Modeling Group, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, 69118 Heidelberg, Germany; ina.poechner@h-its.org (I.P.); rebecca.wade@h-its.org (R.C.W.)
 - ⁸ Center for Molecular Biology (ZMBH), DKFZ-ZMBH Alliance, Heidelberg University, 69120 Heidelberg, Germany
 - ⁹ Interdisciplinary Center for Scientific Computing (IWR), Heidelberg University, 69120 Heidelberg, Germany
 - ¹⁰ Magnetic Resonance Center CERM, University of Florence, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy
- * Correspondence: mariapaola.costi@unimore.it (M.P.C.); stefano.mangani@unisi.it (S.M.); Tel.: +39-0592-058579 (M.P.C.); +39-0577-234-255 or +39-0577-234-252 (S.M.)

Academic Editor: Thomas J. Schmidt

Received: 7 February 2017; Accepted: 3 March 2017; Published: 8 March 2017

Abstract: Flavonoids have previously been identified as antiparasitic agents and pteridine reductase 1 (PTR1) inhibitors. Herein, we focus our attention on the chroman-4-one scaffold. Three chroman-4-one analogues (1–3) of previously published chromen-4-one derivatives were synthesized and biologically evaluated against parasitic enzymes (*Trypanosoma brucei* PTR1–TbPTR1 and *Leishmania major*–LmPTR1) and parasites (*Trypanosoma brucei* and *Leishmania infantum*). A crystal structure of TbPTR1 in complex with compound 1 and the first crystal structures of LmPTR1–flavanone complexes (compounds 1 and 3) were solved. The inhibitory activity of the chroman-4-one and chromen-4-one derivatives was explained by comparison of observed and predicted binding modes of the compounds. Compound 1 showed activity both against the targeted enzymes and the parasites with a selectivity index greater than 7 and a low toxicity. Our results provide a basis for further scaffold optimization and structure-based drug design aimed at the identification of potent anti-trypanosomatidic compounds targeting multiple PTR1 variants.

Keywords: pteridine reductase 1; *Trypanosoma brucei*; *Leishmania* spp.; chroman-4-one; chromen-4-one; crystallographic studies

Anexo VII:

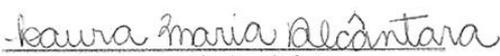


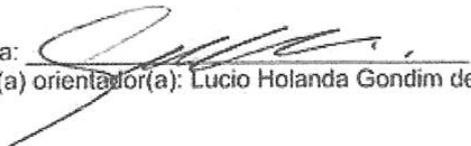
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378, email: cpgpb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **"DESCOBRIMENTO DE POTENTES CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: DO DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO BASEADO EM IMAGEM À TRIAGEM DE COMPOSTOS EM MODELOS IN VITRO"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Laura Maria Alcântara

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Lucio Holanda Gondim de Freitas Junior

Data: 15 de julho de 2017

Anexo VIII:**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Descobrimiento de candidatos a novos fármacos para tratamento de leishmaniose visceral: do desenvolvimento de um ensaio baseado em imagem à triagem de compostos em modelos in vitro**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de outubro de 2017

Assinatura : Laura Maria Alcântara
Nome do(a) autor(a): **Laura Maria Alcântara**
RG n.º MG 14.851-750

Assinatura : [Assinatura]
Nome do(a) orientador(a): **Lúcio Holanda Gondim de Freitas Júnior**
RG n.º 1107724