



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* DO CETOCONAZOL E DE SUA COMBINAÇÃO COM  
ANTIMONIAL EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Aluna:** Débora Cristina de Oliveira Nunes

**Orientadora:** Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

**UBERLÂNDIA - MG**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* DO CETOCONAZOL E DE SUA COMBINAÇÃO COM  
ANTIMONIAL EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Aluna:** Débora Cristina de Oliveira Nunes

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como  
parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Doutor em  
Genética e Bioquímica (Área  
Bioquímica).**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

N972e  
2016      Nunes, Débora Cristina de Oliveira, 1987  
            Efeito in vitro do cetoconazol e de sua combinação com antimonial  
            em Leishmania (Leishmania) amazonensis / Débora Cristina de Oliveira  
            Nunes. - 2016.  
            92 p. : il.

            Orientadora: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini.  
            Coorientador: Luiz Borges Bispo da Silva.  
            Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
            de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
            Inclui bibliografia.

            1. Bioquímica - Teses. 2. Leishmania amazonensis - Teses. 3.  
            Leishmaniose - Teses. I. Tudini, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama. II.  
            Silva, Luiz Borges Bispo da. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
            Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* DO CETOCONAZOL E DE SUA COMBINAÇÃO COM  
ANTIMONIAL EM *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**ALUNA:** \_\_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** \_\_\_\_\_  
(Orientador)

**Examinadores:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Data da Defesa:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da  
Dissertação/Tese foram contempladas

\_\_\_\_\_  
Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini



*Dedico este trabalho aos meus pais, Tidis e Lúcia, e à minha irmã, Amanda, que sempre lutaram para que eu pudesse estudar.*

## *Agradecimentos*

- A Deus e à Nossa Senhora pela força concedida nesta conturbada etapa da minha vida, por nunca me abandonarem e por guiarem os meus caminhos da forma mais perfeita!
- À minha família pelo amor e apoio incondicionais, carinho, preces, paciência. Aos meus pais que sempre se esforçaram para garantir que eu e minha irmã tivéssemos acesso à educação e por nos incentivarem a buscar a carreira pública. Sem vocês, todas as minhas conquistas não seriam possíveis!
- Ao meu noivo Lucas, muito obrigada pela paciência, compreensão, pelo apoio em todas as minhas escolhas e por ser essa pessoa que jamais me puxa para trás!
- À professora Dra. Kelly Yoneyama pelos valiosos ensinamentos de bancada, contribuição intelectual, paciência e dedicação. Muito obrigada por me orientar e por compreender minhas dificuldades de conciliar trabalho com estudo!
- Ao professor Dr. Luiz Borges Bispo da Silva, meu super co-orientador e colega de trabalho. Você tornou possível a realização deste trabalho devido a sua preciosa contribuição com conhecimentos farmacológicos. Muito obrigada pela paciência, dedicação, disponibilidade e preocupação!
- Às professoras Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e Dra. Renata Santos Rodrigues pelas oportunidades concedidas, incentivo e amizade. Vocês fazem parte de toda a minha história na UFU, acompanharam meu crescimento profissional e pessoal ao longo desses 11 anos, me ensinando o significado de amor e responsabilidade na pesquisa!
- Às meninas Mônica, Márcia, Letícia, Isabela e Dayane pela amizade, ideias compartilhadas, torcida sincera e por me ajudarem com as minhas angústias e sofrimentos pessoais e profissionais. Que a nossa amizade perdure independente do caminho que cada uma seguir!
- À Tianinha e Marina pela atenção, presteza, preocupação e amizade ao longo de todos esses anos.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) e professores pelos ensinamentos e pela possibilidade de aperfeiçoamento profissional.
- Ao pessoal da ARFIS pela colaboração com meu doutorado.
- Às minhas mais que colegas de trabalho Simone, Danielle, Cristiane, muito obrigada pela amizade. Obrigada por serem tão dispostas a ajudar, pelo apoio, estímulo, por “segurarem as pontas no trabalho”, aguentarem meus momentos de estresse, ouvirem meus desabafos e vibrarem comigo as conquistas. Espero que a amizade construída por nós permaneça sempre viva!
- Ao professor Dr. Fábio de Oliveira por disponibilizar a célula RAW264.7 e a infraestrutura e à Dra. Danielle Reis Napolitano pela grande ajuda nos ensaios de infectividade em macrófagos de linhagem.
- À professora Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro pela colaboração na realização e análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.
- Às técnicas Rosiane e Mariane, pela imensa ajuda com o processamento das amostras e com os aparelhos de microscopia eletrônica de transmissão e confocal.
- À Lígia, técnica da microscopia eletrônica da UFTM por me socorrer na captura das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.
- Ao professor Dr. Luiz Ricardo e sua aluna Mariana pelos experimentos utilizando o citômetro de fluxo.
- À Taisa, Murilo, Fabiano e Mário Zan pela disponibilização e manutenção dos camundongos.
- A todos que indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Apresentação.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Doenças tropicais negligenciadas .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Leishmaniose.....</b>	<b>7</b>
2.1. Epidemiologia.....	7
2.2. Agente etiológico.....	9
2.3. Vetor .....	15
2.4. Ciclo de vida.....	16
2.5. Quadro clínico.....	18
<b>3. Tratamento para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....</b>	<b>21</b>
3.1. Antimonial .....	22
3.2. Pentamidina.....	24
3.3. Anfotericina B .....	25
3.4. Paramomicina.....	27
3.5. Miltefosina.....	27
3.6. Derivados azóis.....	28
<b>4. Novas abordagens terapêuticas.....</b>	<b>31</b>
4.1. Reposicionamento de drogas.....	31
4.2. Combinação de drogas e Isobolograma .....	33
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>38</b>
<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>47</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>49</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>50</b>
2.1. <i>Chemicals</i> .....	50
2.2. <i>Animals</i> .....	50
2.3. <i>Parasites – promastigote and free amastigote</i> .....	50
2.4. <i>Murine macrophage culture</i> .....	51
2.5. <i>Viability – Macrophage and free amastigote assays</i> .....	51
2.6. <i>Infectivity – Intracellular amastigote assay</i> .....	52
2.7. <i>Isobologram</i> .....	52

2.8. Statistical analysis .....	53
<b>3. Results.....</b>	<b>54</b>
3.1. <i>In vitro</i> susceptibility of amastigotes and macrophages to individual drugs .....	54
3.2. Effect of ketoconazole and antimony combination on amastigotes and isobologram.....	56
<b>4. Discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>61</b>
<b>References .....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>67</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>68</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>69</b>
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>70</b>
2.1. Chemicals .....	70
2.2. Promastigote culture .....	70
2.3. Antiproliferative assay.....	71
2.4. Evaluation of mitochondrial damage .....	71
2.5. Evaluation of autophagic vacuoles.....	72
2.6. Morphological and ultrastructural analysis .....	72
2.7. Cell death analysis .....	72
2.8. Cell cycle analysis.....	73
<b>3. Results.....</b>	<b>74</b>
3.1. Antiproliferative and cytostatic effects .....	74
3.2. Evaluation of mitochondrial transmembrane potential and autophagic vacuoles formation.....	74
3.3. Morphological and ultrastructural analysis .....	77
3.4. Cell death analysis .....	78
3.5. Cell cycle analysis.....	79
<b>4. Discussion.....</b>	<b>79</b>
<b>References .....</b>	<b>85</b>
<b>Adendo .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1:

**Figura 1.** Parasitos *Leishmania (Leishmania) amazonensis* corados com kit Panótico<sup>®</sup>: forma promastigota (A) e amastigota (B) dentro de macrófagos peritoneais murinos.

**Figura 2.** Morfologia interna de promastigota (à esquerda) e amastigota (à direita) de *Leishmania* spp.

**Figura 3.** Via metabólica simplificada da biossíntese de ergosterol e colesterol, mostrando o ponto de inibição dos compostos azóis.

**Figura 4.** Balanço redox em tripanossomatídeos mostrando a ação do sistema tripanotiona/tripanotiona redutase.

**Figura 5.** Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*.

**Figura 6.** Esquema representativo de um isoblograma. O gráfico apresenta a combinação de duas drogas cujas concentrações A e B são equipotentes. Em relação ao eixo x, a isobol côncava representa sinergismo e a isobol convexa representa antagonismo.

### CAPÍTULO 2:

**Figure 1. Cytotoxic effects of isolated drugs (ketoconazole and antimony) on free amastigotes, murine macrophages cell line RAW264.7 and intracellular amastigotes.** Concentration-effect curves to ketoconazole (white points) and antimony (black points) against *L. (L.) amazonensis* free amastigotes **(A)**, murine macrophages (B) or intracellular amastigotes (C). Data represent mean $\pm$ SEM of two to three independent experiments performed in triplicate.

**Figure 2. Ketoconazole and antimony combination on *L. (L.) amazonensis* amastigotes.** Isobologram representing *in vitro* additive ketoconazole-antimony interaction against *L. (L.) amazonensis* free **(A)** or intracellular **(B)** amastigotes by a fixed-ratio method based on the IC<sub>50</sub>. Dashed line represents an ideal theoretical line for the additive effect; the  $\bar{x} \Sigma \text{FIC}_{50}$  for all interactions tested is also shown. Concentration-effect curves concerning the inhibition of *L. (L.) amazonensis* free **(C)** and intracellular **(D)** amastigotes by different combinations of antimony (black points) and ketoconazole (white points). Data represent mean $\pm$ SEM of two independent experiments performed in triplicate.

### **CAPÍTULO 3:**

**Figure 1. *L. (L.) amazonensis* promastigotes proliferation.** **(A)** The concentration-response curves of ketoconazole on parasite proliferation after 24, 48, 72 and 96 hours of treatment. The smaller graph displays the respective EC<sub>50</sub> value for 72 hours. The cell density was obtained by direct counting in a Neubauer chamber of fixed cells. **(B)** Cytotoxic versus cytostatic assay on parasite in presence of 10  $\mu\text{M}$  ketoconazole. The arrow indicates the cultivation time in which the drug was added to the medium. The viable cell density was obtained by direct counting in a Neubauer chamber using Trypan blue stain.

**Figure 2. Mitochondrial damage induced by ketoconazole on *L. (L.) amazonensis*.** **A-C.** Flow cytometry histograms displaying changes in mitochondrial transmembranepotential ( $\Delta\Psi_m$ ) measured by Rhodamine 123 (Rh123) in different times of drug exposure: 24 **(A)**, 48 **(B)** and 72 **(C)** hours. Control: black line; Ketoconazole-treated: grey.

**Figure 3. Ketoconazole-induced autophagic vacuoles on *L. (L.) amazonensis* promastigotes.** Panels **A-B**, **E-F** and **I-J**, parasites incubated with culture medium (control parasite) for different times: 24 **(A-B)**, 48 **(E-F)** and 72 **(I-J)** hours. Panels **C-D**, **G-H** and **K-L**, parasites incubated with 10  $\mu\text{M}$  ketoconazole for different times: 24 **(C-D)**, 48 **(G-H)** and 72 **(K-L)** hours. Panels **A**, **C**, **E**, **G**, **I** and **K**, MDC labeling. Panels **B**, **D**, **F**, **H**, **J** and **L**, phase contrast. Barr: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4 – Ultrastructural and morphological alterations observed in *L. (L.) amazonensis* promastigotes treated with ketoconazole.** Transmission Electron Microscopy (TEM): **A.** Control parasite. **B – H.** Ketoconazole-treated parasites; alterations are indicated by arrows: **B.** Mitochondrial swelling and intact cell membrane (black arrow); **C.** Vesicles associated to Golgi complex (white arrow) and acidocalcisomes (black arrows); **D.** Lipid droplets (black arrows); **E.** Acidocalcisomes (black arrows) and normal kinetoplast (white arrow); **F.** Intense activity of endo/exocytose at flagellar pocket (black arrow); **G.** Flagellar alterations(stumpy, detached membrane) (black arrow); **H.** Double flagella at flagellar pocket (black arrows). Scanning Electron Microscopy (SEM): **I.** Control parasite. **J-K.** Ketoconazole-treated parasites – Double flagella (black arrow) and changes in appearance of cell membrane. m = mitochondrion.

**Figure 5. Apoptosis/Necrosis assay by flow cytometry.** Representative dot plots for annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining in *L. (L.) amazonensis* promastigotes incubated with: **(A)** medium, negative control; **(B)** ketoconazole (10  $\mu$ M; 72 hours). Lower left quadrant, viable cells (negative for both Annexin V-FITC and PI); lower right quadrant, apoptotic cells (positive for Annexin V-FITC and negative for PI); upper right quadrant, necrotic cells (positive for both Annexin V-FITC and PI).

**Figure 6. Cell cycle assay by flow cytometry.** Typical DNA content frequency histograms representing *L. (L.) amazonensis* promastigotes incubated with: **(A)** medium, negative control; **(B)** ketoconazole (10  $\mu$ M; 72 hours). The cells were stained with propidium iodide (PI) and fluorescence of the PI-stained cells was measured. Cell cycle analysis provides the estimate of percentage of cells in G0-G1, S and G2/M phases of the cycle.

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1:**

**Tabela 1.** Doenças tropicais negligenciadas definidas pela Organização Mundial de Saúde, registradas no sistema de informação de mortalidade, Brasil, 2000-2011.

**Tabela 2.** Esquema mostrando as principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da doença no homem.

**Tabela 3.** Drogas usadas no tratamento das diferentes formas clínicas da leishmaniose leishmaniose

### **CAPÍTULO 2:**

**Table 1.**  $IC_{50}$ ,  $FIC_{50}$  and  $\Sigma FIC_{50}$  of antimony-ketoconazole combination against *L. (L.) amazonensis* free and intracellular amastigotes

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AmBD:</b>	deoxicolato de anfotericina B
<b>ATP:</b>	adenosina trifosfato
<b>CD:</b>	células dendríticas
<b>DTN:</b>	doenças tropicais negligenciadas
<b>FDA:</b>	<i>food and drug administration</i>
<b>FBS:</b>	<i>fetal bovine serum</i>
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	<i>50 % inhibition concentration</i>
<b>IDH:</b>	índice de desenvolvimento humano
<b>IL:</b>	intralesional
<b>IM:</b>	intramuscular
<b>IV:</b>	intravenosa
<b>LC:</b>	leishmaniose cutânea
<b>LCD:</b>	leishmaniose cutânea difusa
<b>LCPC:</b>	leishmaniose cutânea pós-calazar
<b>LMC:</b>	leishmaniose mucocutânea
<b>LT:</b>	leishmaniose tegumentar
<b>LTA:</b>	leishmaniose tegumentar americana
<b>LV:</b>	leishmaniose visceral
<b>MDC:</b>	<i>mono dansyl cadaverine</i>
<b>MTT:</b>	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NMG:</b>	N-metilglucamina
<b>PBS:</b>	phosphate buffer saline
<b>Rho 123:</b>	<i>rhodamine 123</i>
<b>SBI:</b>	<i>sterol biosynthesis inhibitor</i>
<b>SEM:</b>	<i>scanning electron microscopy</i>
<b>SGS:</b>	estibogluconato de sódio
<b>TEM:</b>	<i>transmission electron microscopy</i>
<b>OMS:</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>WHO:</b>	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e pertence ao grupo de doenças negligenciadas prevalentes em países em desenvolvimento. Os tratamentos disponíveis para esta doença apresentam várias limitações, o que têm direcionado esforços para a busca de novas drogas ou novas combinações terapêuticas visando à efetividade e redução de custo, resistência do parasito e toxicidade dos tratamentos frequentemente usados. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* do cetoconazol, um antifúngico oral com potencial anti-*Leishmania*, isoladamente ou em associação com o antimonial, medicamento de primeira escolha para o tratamento de leishmanioses. Para a determinação *in vitro* da natureza da associação entre cetoconazol e antimonial sobre formas amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, foi utilizada o método do isoblograma de taxa fixa e as seguintes análises foram realizadas: (1) avaliação da citotoxicidade do cetoconazol e antimonial isoladamente ou em combinação sobre formas amastigota do parasito bem como em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7, pela medida da atividade de desidrogenases mitocondriais; (2) avaliação do efeito do cetoconazol e antimonial isoladamente ou em combinação sobre a infectividade de formas amastigota do parasito em macrófagos murinos RAW264.7. Os resultados obtidos sugeriram que a combinação cetoconazol-antimonial parece ter uma natureza aditiva. Para o estudo de um provável mecanismo de ação para o cetoconazol em formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, foram avaliados os efeitos da droga sobre: (1) a proliferação do promastigota; (2) a morfologia e ultraestrutura parasitária; (3) o dano mitocondrial; (4) o desenvolvimento de vacúolos autofágicos; (5) a morte celular; e (6) o ciclo celular. Concluiu-se que o modo de ação do cetoconazol sobre formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* parece ser citostático e não-citotóxico, já que a droga não apresentou efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial do parasito, não induziu morte celular (necrose, apoptose ou autofagia) e foi capaz de causar uma parada nas fases G0-G1 do ciclo celular.

Palavras-chave: Antimonial; Cetoconazol; Isoblograma; *Leishmania (Leishmania amazonensis)*



## ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoa of the *Leishmania* genus and belongs to the group of neglected diseases prevalent in developing countries. The available treatments for this disease present several limitations, which have directed efforts to search for new drugs or new therapeutic combinations aimed at the effectiveness and reduction of cost, parasite resistance and toxicity of the currently used treatments. Thus, the main objective of this study was to evaluate the *in vitro* effects of ketoconazole, an oral anti-fungal with antileishmanial potential, alone or in combination with antimony, the first choice drug for the leishmaniasis treatment. In order to determine the *in vitro* nature of the association between ketoconazole and antimony on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote, the fixed-rate isobologram method was used and the following analyzes were performed: (1) evaluation of cytotoxicity of ketoconazole and antimony alone or in combination on amastigote form as well as in murine macrophages cell line RAW264.7, by measuring mitochondrial dehydrogenases activity; (2) evaluation of the effect of ketoconazole and antimonial alone or in combination on the infectivity of amastigote forms in murine macrophages RAW264.7. The results suggested that the nature of ketoconazole-antimony combination appears to be additive. For the study of a probable mechanism of action for ketoconazole against *L. (L.) amazonensis* promastigotes, the drug effects were evaluated on: (1) promastigote proliferation; (2) parasitic morphology and ultrastructure; (3) mitochondrial damage; (4) the development of autophagic vacuoles; (5) the cell death; and (6) the cell cycle. The study concluded that the mode of action of the ketoconazole on *L. (L.) amazonensis* promastigote forms appears to be cytostatic and non-cytotoxic, since the drug had no effect on the mitochondrial membrane potential of the parasite, did not induce cell death (necrosis, apoptosis or autophagy) and was able to cause an arrest in the G0-G1 phases of the cell cycle.

Keywords: Antimony; Ketoconazole; Isobologram; *Leishmania (Leishmania amazonensis)*

# **Apresentação**

A leishmaniose é um grupo de doenças negligenciadas prevalentes em países em desenvolvimento e é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Os tratamentos disponíveis para esta doença apresentam algumas limitações como: elevada toxicidade com significativos efeitos colaterais, alto custo e podem induzir resistência no parasito. Além disso, a terapia nem sempre é eficiente e há necessidade de hospitalização para administração das drogas. Nesse sentido, muitos grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços na busca de novas drogas, novas indicações para drogas já conhecidas (reposicionamento de drogas) ou novas combinações terapêuticas, que possam ser utilizadas na quimioterapia dessa doença, com ênfase em formulações efetivas, mais baratas e que apresentem menor toxicidade quando comparadas ao tratamento frequentemente usado. Assim, o principal objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* do cetoconazol, um antifúngico oral com potencial anti-*Leishmania*, isoladamente ou em associação com o antimonial, medicamento de primeira escolha para o tratamento de leishmanioses.

A apresentação da tese foi dividida em capítulos, conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB), Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB/UFU). No capítulo 1, está apresentada uma revisão bibliográfica do assunto incluindo tópicos referentes às doenças tropicais negligenciadas, conceito de leishmaniose, epidemiologia da doença, agente etiológico e vetor, forma de transmissão, manifestações clínicas, tratamentos disponíveis para leishmaniose tegumentar e novas abordagens terapêuticas.

O capítulo 2 apresenta a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão sobre a natureza da associação *in vitro* de duas drogas - antimonial e cetoconazol, sobre formas amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, utilizando o método do isoblograma de taxa fixa. Esse capítulo é apresentado na forma de um artigo intitulado "*In vitro* additive interaction between ketoconazole and antimony against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes" submetido à revista "PLOS One". O artigo inclui estudos *in vitro*, tais como: (1) avaliação da citotoxicidade do cetoconazol e antimonial isoladamente ou em combinação sobre formas amastigota do parasito bem como em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7, pela

medida da atividade de desidrogenases mitocondriais; (2) avaliação do efeito do cetoconazol e antimonial isoladamente ou em combinação sobre a infectividade de formas amastigota do parasito em macrófagos murinos RAW264.7. O estudo possibilitou a determinação da natureza da interação entre as drogas testadas.

Finalmente, o capítulo 3 apresenta a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão sobre a proposição de um possível mecanismo de ação do cetoconazol em formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* por meio de estudos *in vitro*. Esse capítulo é apresentado na forma de um artigo intitulado “Cytostatic action *in vitro* of ketoconazole on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes” submetido à revista “Acta Tropica”. Foram avaliados os efeitos da droga sobre: (1) a proliferação do promastigota; (2) a morfologia e ultraestrutura parasitária; (3) o dano mitocondrial; (4) o desenvolvimento de vacúolos autofágicos; (5) ensaio de morte celular; e (6) ensaio sobre ciclo celular. Concluiu-se com esse estudo que o modo de ação do cetoconazol sobre formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* parece ser citostático e não-citotóxico, já que a droga não apresentou efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial do parasito e não induziu morte celular (necrose, apoptose ou autofagia) e foi capaz de causar uma parada nas fases G0-G1 do ciclo celular.

A maioria dos experimentos foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox), do INGEB/UFU, o qual participa do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em nano-Biofarmacêutica (INCT N-Biofar). Além disso, parcerias foram estabelecidas para a utilização de outros laboratórios da UFU, quando necessária.

# Capítulo 1

Fundamentação teórica

## 1. Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) compreendem um grupo diverso de doenças transmissíveis que ocorrem em 149 países, prevalecendo em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2016) com latitudes entre 35° n e 35° s, altitudes abaixo de 2.200 metros e temperaturas variando entre 15 e 40°C (LINDOSO; LINDOSO, 2009). As DTNs afetam principalmente as populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em estreito contato com vetores infecciosos e animais domésticos (OMS, 2012; WHO, 2016). Aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas no mundo todo que vivem em absoluta pobreza, principalmente nas regiões da África, Ásia e América Latina, são vulneráveis às DTNs, de modo que é aceito que DTNs e baixos índices de desenvolvimento humano (IDH) estão relacionados (LINDOSO; LINDOSO, 2009; OMS, 2012).

Diferentemente das principais doenças responsáveis por mortes, que têm sido o foco de atenção e financiamento nos países em desenvolvimento nas últimas décadas, as DTNs compreendem uma categoria especial de doenças infecciosas que carecem de investimento em novas drogas e vacinas e apresentam pouca eficácia nos seus programas de controle (LINDOSO; LINDOSO, 2009; SARTERIALE et al., 2014; VIAS et al., 2016). De fato, entre 2000 a 2011, 850 novos produtos terapêuticos (novas entidades químicas, novas indicações, novas formulações, combinações de dose fixa e vacinas) foram aprovados. Desse montante, apenas 4 % de todos os novos produtos e apenas 1 % de todas as novas entidades químicas aprovadas foram indicados para doenças negligenciadas. Ainda, somente 1 % de todos os ensaios clínicos existentes em dezembro de 2011 contemplou doenças negligenciadas (PEDRIQUE et al., 2013). Para agravar a situação, as poucas drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentam problemas relacionados a custo, segurança, estabilidade, crescente emergência de resistência, os quais limitam a sua utilização (NWAKA et al., 2009).

As DTNs são causadas por uma variedade de patógenos (tabela 1), tais como: vírus (dengue e raiva); bactérias (úlceras de Buruli, hanseníase, tracoma e boubas); protozoários (doença de Chagas, tripanossomíase humana africana e leishmanioses); e helmintos (teníase/(neuro) cisticercose, dracunculose,

equinococose, trematodíases de origem alimentar, filariose linfática, oncocercíase, esquistossomose e helmintíases transmitidas pelo solo) (WHO, 2015). Infecções por agentes causadores das DTNs podem levar à invalidez, deformações, prejuízo no crescimento infantil e no desenvolvimento cognitivo e morte (MARTINS-MELO et al., 2016), com profundos impactos social, econômico e político (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

**Tabela 1.** Doenças tropicais negligenciadas definidas pela Organização Mundial de Saúde, registradas no sistema de informação de mortalidade, Brasil, 2000-2011.

Doença	Código CID-10	Endêmica no Brasil <sup>a</sup>
<b>Protozoa</b>		
Doença de Chagas	B57	Sim
Leishmaniose	B55	Sim
Tripanossomíase humana africana (doença do sono)	B56	Não
<b>Helmintos</b>		
Esquistossomose	B65	Sim
<b>Helmintíases transmitidas pelo solo</b>		
Ascaridíase	B77	Sim
Ancilostomose	B76	Sim
Tricuríase	B79	Sim
Oncocercíase	B73	Sim
Cisticercose/Teníase	B68-B69	Sim
Equinococose	B67	Sim
Filariose	B74	Sim
Dracunculose	B72	Não
<b>Trematodíases de origem alimentar</b>		
Opistorquíase	B66.0	Não
Clonorquíase	B66.1	Não
Fasciolíase	B66,3	Não
Paragonimíase	B66,4	Não
<b>Bactéria</b>		
Hanseníase	A30-B92	Sim
Tracoma	A71	Sim
Úlcera de Buruli <sup>b</sup>	A31.1	Desconhecida
Treponema endêmica		
Bouba <sup>c</sup>	A66	Desconhecida
Pinta <sup>d</sup>	A67	Desconhecida
Sífilis não-venérea	A65	Não
<b>Vírus</b>		
Raiva	A82	Sim
Dengue	A90-A91	Sim

CID-10: Classificação internacional das doenças e problemas relacionados à saúde, 10<sup>o</sup> revisão. <sup>a</sup> Presença de áreas endêmicas (regiões, estados ou municípios). <sup>b</sup> Casos autóctones reportados, mas a endemidade não é determinada. <sup>c</sup> O Brasil já foi endêmico para Bouba, mas a situação atual é desconhecida. <sup>d</sup> Casos relatados no passado, mas nenhum caso tem sido registrado desde 1990. Fonte: Tabela traduzida de MARTINS-MELO et al., 2016.

O Brasil é o 70º país no ranking do IDH e concentra nove das 10 principais doenças tropicais consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (LINDOSO; LINDOSO, 2009). O país é responsável por grande parte da ocorrência de DTNs na América Latina: hanseníase (86 %), dengue (40 %), esquistossomose (96 %), doença de Chagas (25 %), leishmaniose cutânea (39 %) e leishmaniose visceral (93 %). Analisando a mortalidade por DTNs no Brasil de 2000-2011, verificou-se que a doença de Chagas causou o maior número de mortes (76,7 %), seguido por esquistossomose (8,2 %) e leishmaniose (4,5 %) (MARTINS-MELO et al., 2016).

## **2. Leishmaniose**

A leishmaniose é considerada um grande problema de saúde pública e representa um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2013). Primariamente, é uma infecção zoonótica, a qual afeta secundariamente a espécie humana (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014). É uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas (Leishmaniose Tegumentar, LT) (BRASIL, 2013) ou células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides (Leishmaniose Visceral, LV) (BRASIL, 2014; REY, 2001).

### **2.1. Epidemiologia**

Apesar de a leishmaniose humana ser endêmica globalmente em 98 países e 3 territórios, exceto Austrália e Antártica, os países pobres ainda são os mais afetados pela doença (PACE, 2014; WHO, 2015). De modo geral, a leishmaniose é comum em regiões tropicais e subtropicais e as áreas de ocorrência da leishmaniose são divididas em “Velho Mundo”, o qual inclui África, Ásia e países mediterrâneos, e “Novo Mundo” que abrange América do sul e central (VON STEBUT, 2014).



O número real de casos de leishmaniose é desconhecido devido à subnotificação, falta de sistema de vigilância epidemiológica ou métodos diagnósticos adequados, e a maioria dos dados de incidência disponíveis é baseada em estimativas (PACE, 2014). Além disso, a notificação é compulsória em somente 34 % dos países endêmicos (WHO, 2015). Estima-se que aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorram anualmente: 300 mil correspondem à leishmaniose visceral (90 % em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão e Sudão do sul) e 1 milhão de casos estão relacionados à leishmaniose cutânea (principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Tunísia) ou mucocutânea (principalmente no Brasil, Peru e Bolívia) (PACE, 2014; VON STEBUT, 2015; WHO, 2015).

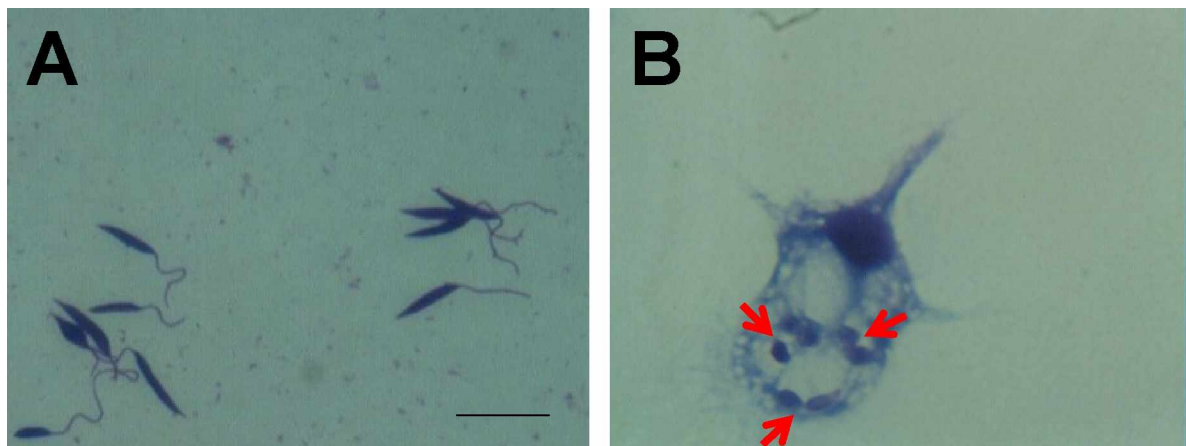
Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV somaram 48.455 casos. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, e a incidência de 2 casos/100.000 habitantes. Nesse mesmo período, os dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2014). Com relação à leishmaniose tegumentar, observam-se picos de transmissão a cada cinco anos. No período de 1985 a 2005, uma média anual de 28.568 casos autóctones foi registrada com coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes. Na década de 80, a LT estava presente em 19 unidades federativas e a partir de 2003 a sua autoctonia foi confirmada em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2013).

Especificamente em Minas Gerais, a leishmaniose tegumentar (LT) ocorre desde meados do século XX com surtos relacionados ao desflorestamento, construção de rodovias, e desenvolvimento da agricultura (FURTADO et al., 1966). A LT é considerada endêmica nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba com 14 casos humanos notificados no período de 1981 a 1986 (MACHADO et al., 1988; NISHIOKA et al., 1988). Entre julho e novembro de 1987, foi registrado um surto epidêmico de LT

(casos autóctones), às margens do rio Araguari, nos municípios de Uberlândia e Indianópolis. Nesse período foram diagnosticados 25 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) procedentes de municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (MACHADO et al., 1992). Outros trabalhos já identificaram a presença de flebotomínios responsáveis pela transmissão de leishmaniose às margens da bacia do rio Araguari (LEMOS; LIMA, 2005; PAULA et al., 2013), na área urbana de Uberlândia-MG (PAULA et al., 2008) e no Parque do Sabiá, Uberlândia-MG (RODRIGUES et al., 2011).

## 2.2. Agente etiológico

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae; Gênero *Leishmania*) que se caracterizam por apresentar duas formas durante seu ciclo de vida (figura 2): uma forma alongada, flagelada e móvel, denominada **promastigota**, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; e outra forma com flagelo internalizado, imóvel chamada de **amastigota**, observada intracelularmente em tecidos de hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014; REY, 2001).



**Figura 1.** Parasitos *Leishmania (Leishmania) amazonensis* corados com kit Panótico®: forma promastigota (A) e amastigota (B) dentro de macrófagos peritoneais murinos. As formas amastigota estão indicadas por setas. Barra: 10µm. Fonte: O autor.

As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela forma clínica da doença estão evidenciadas a seguir:

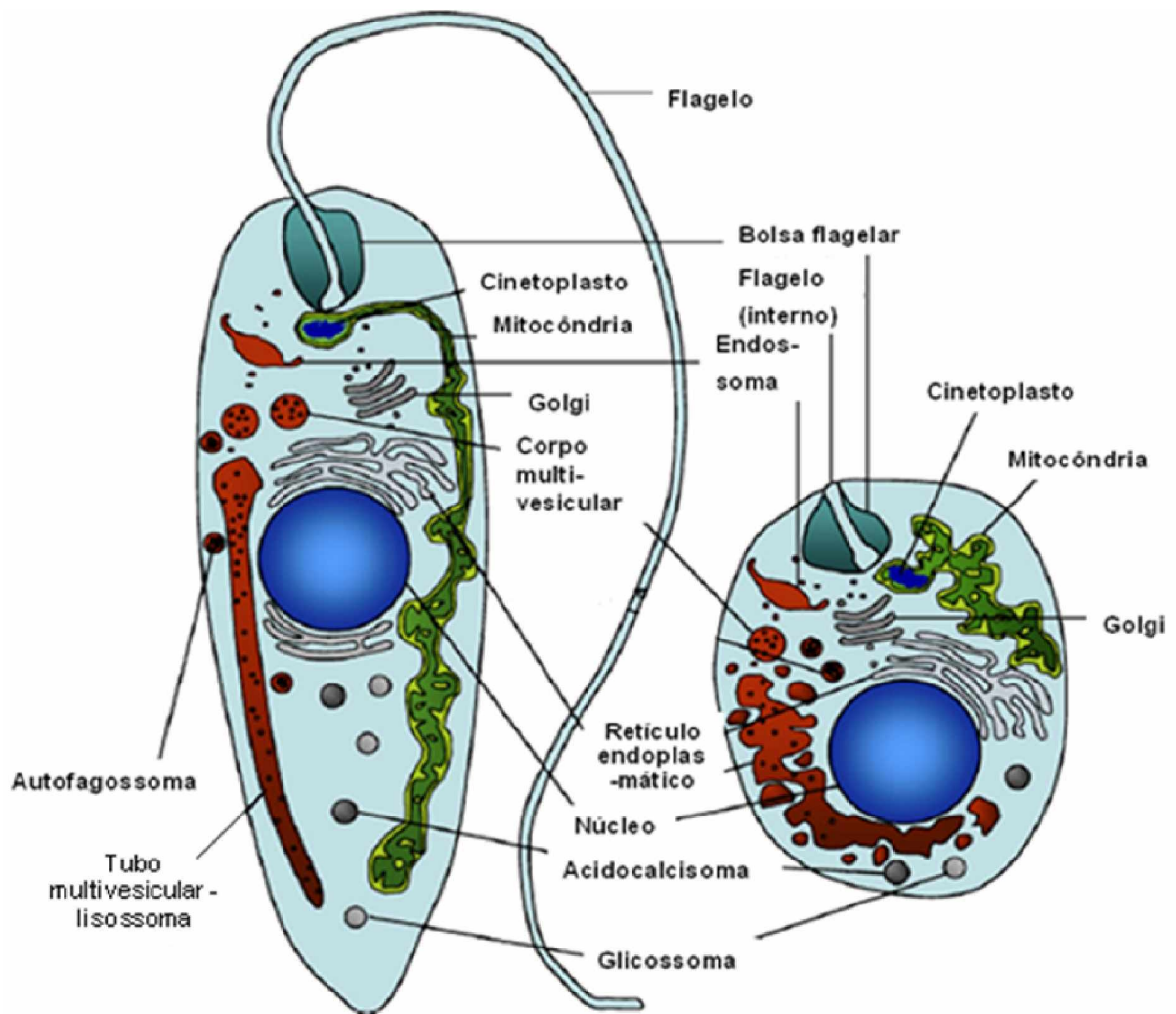
**Tabela 2.** Esquema mostrando as principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da doença no homem. Fonte: Figura modificada de WHO, 2010.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki*</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi*</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. gamham*</i>	<i>L. naifi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
Tropismo Principal	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

\* O status da espécie está em discussão

Morfologicamente (figura 4), ambas as formas apresentam uma membrana celular, sob a qual estão dispostos os microtúbulos, denominados microtúbulos supeliculares. A membrana apresenta uma invaginação na região anterior do corpo do parasito formando a bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge. A membrana da bolsa flagelar estabelece uma continuidade direta com a membrana do flagelo, porém, possui uma composição bioquímica diferente do restante da membrana e é a única região que não apresenta microtúbulos supeliculares. Há evidências de que as atividades excretora e de pinocitose sejam intensas nesse local (SOUZA, 2002). No citoplasma, além de

complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vacúolos e inclusões, observa-se: (1) o cinetoplasto, em forma de pequeno bastonete, é uma estrutura mitocondrial ligada à mitocôndria existente na célula. Em seu interior, existem estruturas filamentosas circulares formadas por ácido desoxirribonucléico, denominado k-DNA (NEVES, 2011; SOUZA; RODRIGUES, 2009); (2) a mitocôndria, que em protozoários parasitos membros da família Tripanossomatidae, é única, grande e fornece ATP por meio da fosforilação oxidativa acoplada à respiração na maioria dos estágios do ciclo de vida (RODRIGUES; SOUZA, 2008); (3) as acidocalcisomas que se caracterizam por apresentar natureza ácida, alta densidade eletrônica e por ser local de armazenamento de polifosfatos, cálcio, magnésio e outros elementos (MORENO; DOCAMPO, 2009); (4) glicossoma é uma estrutura citoplasmática envolta por membrana assemelhando-se aos peroxissomos em células de mamíferos. Geralmente, apresenta uma matriz homogênea e levemente densa e o número e a área que tal organela ocupa no citoplasma varia de acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento. Enzimas glicolíticas envolvidas na conversão de glicose a 3-fosfoglicerato estão localizadas nessa organela (SOUZA, 2002).



**Figura 2.** Morfologia interna de promastigota (à esquerda) e amastigota (à direita) de *Leishmania* spp. Fonte: Figura modificada de BESTEIRO et al., 2007.

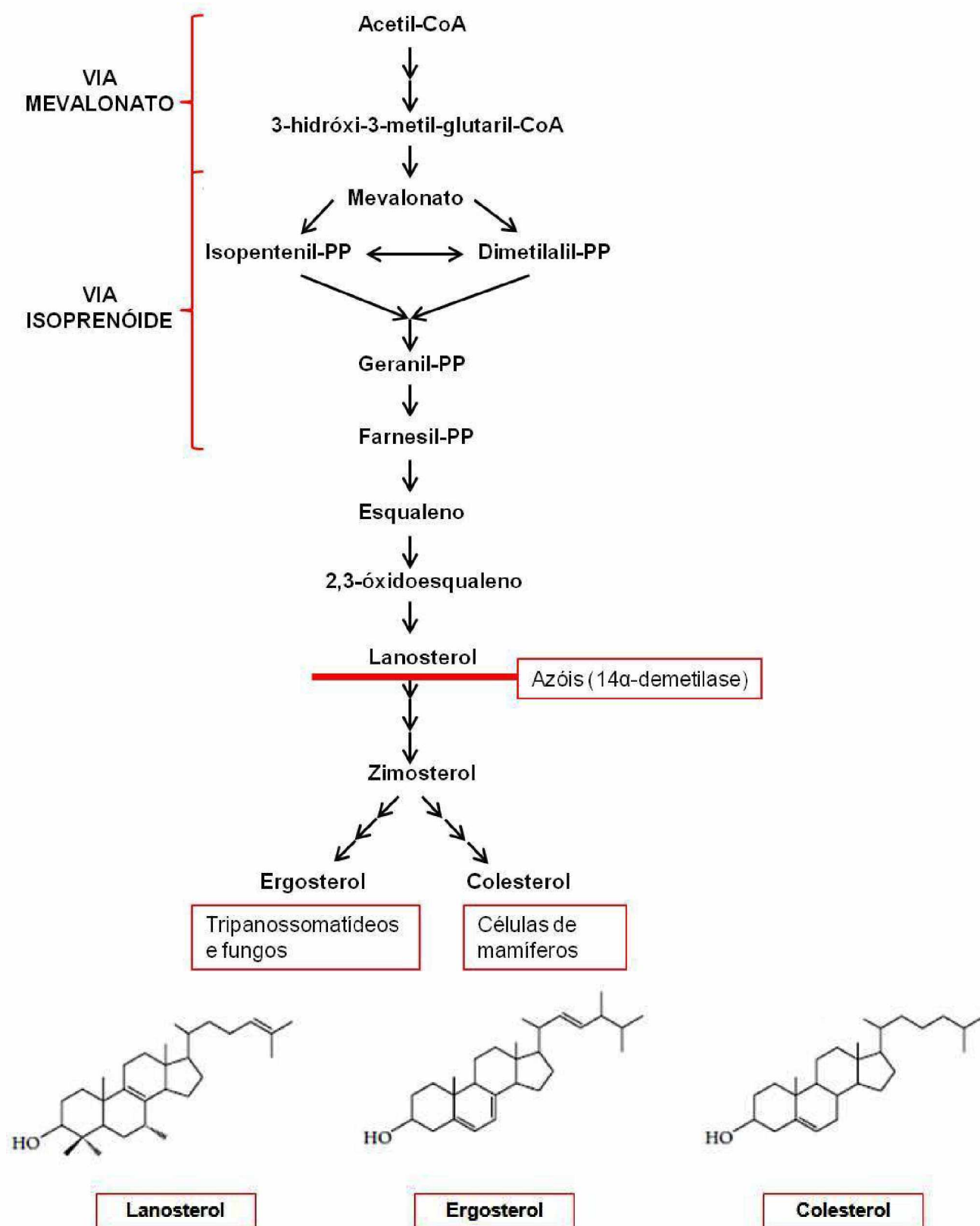
Metabolicamente, as formas promastigota utilizam aminoácidos e açúcares como principais fontes de combustível em condições aeróbicas, pH em torno de 7 e a temperatura variando entre 25-27°C. Tais condições assemelham-se às encontradas no intestino do inseto vetor. Já a forma amastigota vive dentro do sistema fagolisossomal de fagócitos mononucleares, os quais apresentam pH e temperatura em torno de 4 a 5 e 37°C, respectivamente. Nessa forma parasitária, a principal fonte de energia consiste de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são transformados pelo amastigota em CO<sub>2</sub> e água (BALAÑA-FOURCE et al., 1998).

Apesar das diferenças ambientais, promastigotas e amastigotas apresentam características metabólicas comuns que distinguem os metabolismos do parasito e do hospedeiro. Em bioenergética, a principal

diferença entre parasitos e hospedeiros mamíferos é que no parasito as enzimas glicolíticas são compartimentalizadas em uma organela específica chamada glicossoma (figura 3), uma característica comum a todos os tripanossomatídeos, diferentemente da localização citosólica dessas enzimas em células de mamíferos (BERMAN, 1988; BALAÑA-FOURCE et al., 1998). A inibição da glicólise e da  $\beta$ -oxidação nos parasitos parece ser parte do mecanismo de ação dos antimoniais (BERMAN, 1988).

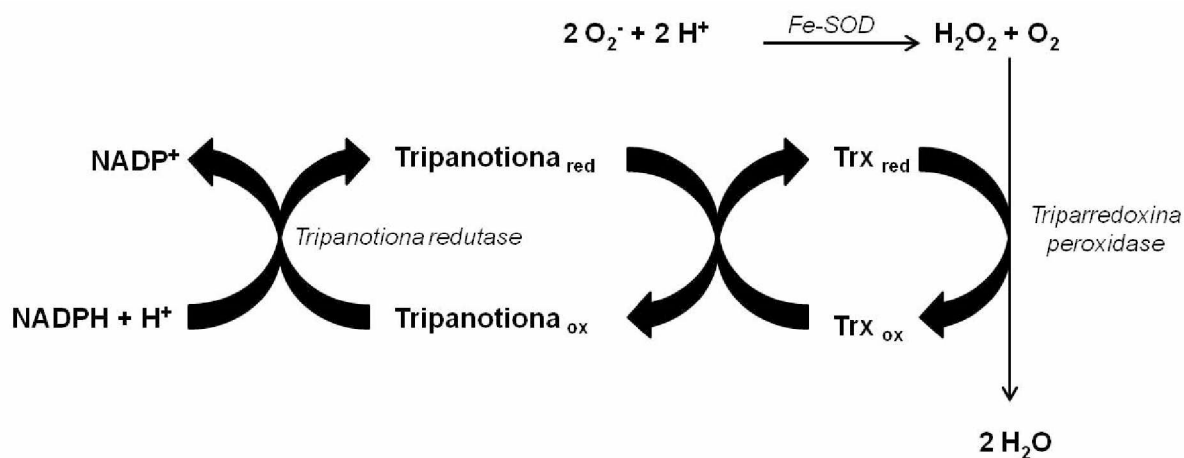
No que diz respeito ao metabolismo de purinas, existem várias diferenças entre parasitos do gênero *Leishmania* e células de mamíferos: (1) parasitos são incapazes de sintetizar anéis de purina *de novo* a partir de precursores metabólicos e devem obtê-los do hospedeiro. Como consequência, desenvolveram um sistema de transporte muito efetivo de purinas do meio; (2) o metabolismo de salvamento de purinas é ativo e constitui o meio pelo qual os promastigotas sintetizam as purinas. A enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase pode usar análogos de inosina aberrantes como substrato e transformá-los em nucleosídeos correspondentes. Esse é o ponto no qual a droga alopurinol atua (BERMAN, 1988; BALAÑA-FOURCE et al., 1998).

Quanto ao metabolismo de lipídeo, diferentemente de mamíferos, nos fungos e nos tripanossomatídeos, o ergosterol é o principal esterol sintetizado a partir da demetilação do lanosterol (figura 4), e não o colesterol. Sendo assim, a via de biossíntese de esteróis é alvo para vários agentes terapêuticos como os compostos azóis, anfotericina B e outros antifúngicos (BERMAN, 1988; BALAÑA-FOURCE et al., 1998).



**Figura 3.** Via metabólica simplificada da biossíntese de ergosterol e colesterol, mostrando o ponto de inibição dos compostos azóis. Fonte: Modificada de SOUZA; RODRIGUES, 2009.

Com relação ao balanço redox (figura 5), tripanossomatídeos não possuem catalase e nem glutathione peroxidase, mas sintetizam a tripanotiona ( $T(S)_2$ ) que consiste de duas moléculas de glutathione conjugadas a uma molécula de espermidina (TURRENS, 2004). O sistema tripanotiona/tripanotiona-redutase (TR) mantém a tripanotiona no estado reduzido ( $T(SH)_2$ ) e consequentemente mantém o balanço redox do parasito, protegendo-o de danos oxidativos, xenobióticos, metais pesados tóxicos, regulando o conteúdo de espermidina e oferecendo equivalentes redutores para a síntese de DNA (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; HALDAR et al., 2011). Os parasitos contêm uma forma diferente de superóxido-dismutase (Fe-SOD) e uma enzima envolvida no metabolismo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a triparredoxina peroxidase. A tripanotiona reduz a triparredoxina (Trx), uma tiorredoxina encontrada em tripanossomatídeos e com papel central no metabolismo de peróxido. A triparredoxina reduzida é doadora de hidrogênio para a reação da triparredoxina peroxidase, que converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (TURRENS, 2004).



**Figura 4.** Balanço redox em tripanossomatídeos mostrando a ação do sistema tripanotiona/tripanotiona redutase. Fonte: Modificada de TURRENS, 2004.

### 2.3. Vetor

Os vetores da leishmaniose são insetos conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. Pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (“Novo Mundo”) e *Phlebotomus* (“Velho Mundo”) (BRASIL, 2013, 2014). Os



flebotominios são primariamente noturnos, evitam vento e podem voar somente pequenas distâncias. Ocorrem em qualquer lugar do mundo onde as temperaturas não caem abaixo de 10°C, sendo encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Devido à globalização e ao aquecimento global, entretanto, os flebotomíneos ultimamente têm se espalhado para regiões do norte europeu (VON STEBUT, 2015).

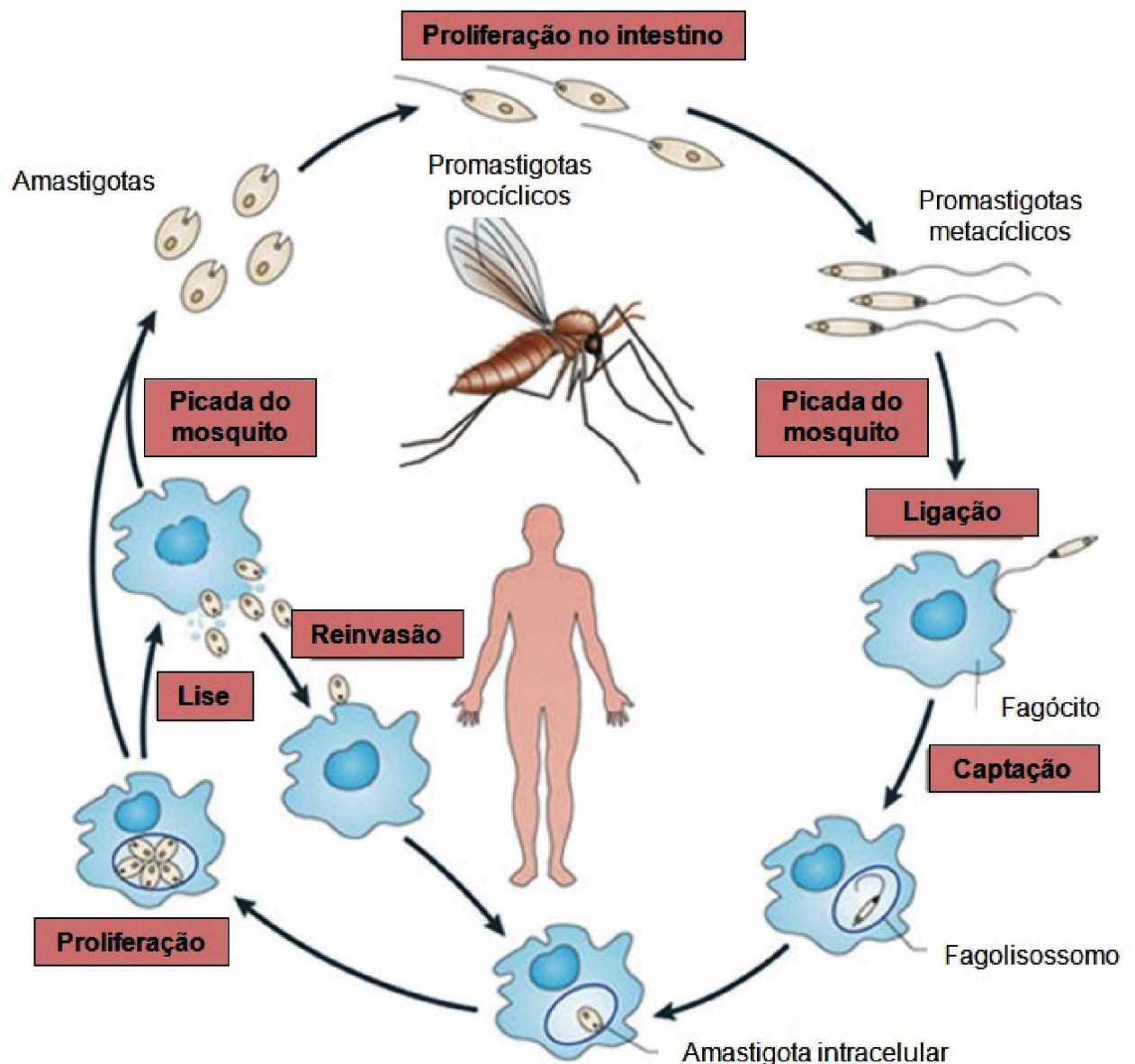
Flebotomínios fêmeas são hematófagos, sendo este hábito essencial para a ovoposição (VON STEBUT, 2015). É um silencioso artrópode com 2-3 mm de comprimento cuja cor varia do preto ao branco e, ao contrário de outras espécies de dípteros, posiciona caracteristicamente suas asas de modo a permanecerem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso (PACE, 2014; REY, 2001). A maioria das espécies de flebotomíneos pica ao ar livre desde o anoitecer até o amanhecer, embora existam algumas espécies que picam dentro de casa e à luz do dia (PACE, 2014).

#### **2.4. Ciclo de vida**

Parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo evolutivo heteroxênico (digenético), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados mamíferos e insetos vetores, responsáveis pela transmissão do parasito (ANTOINE et al., 2004). Nesses hospedeiros, o parasito alterna-se em duas formas de vida: promastigota e amastigota, conforme descrito anteriormente (figura 3).

A fêmea dos flebotomíneos (inseto vetor) infecta-se ao ingerir amastigotas livres e/ou macrófagos contendo amastigotas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado (figura 6) (NEVES, 2011). No intestino do flebotomínio, os amastigotas existentes dentro de células fagocíticas desenvolvem-se em formas promastigota procíclicas, altamente replicativas e não infectivas. Ocorre, então, a metaciclogênese, processo de diferenciação no qual promastigotas procíclicos diferenciam-se em formas promastigota metacíclicas, infectivas e incapazes de se dividir (KAYE; SCOTT, 2011). Após esse processo de diferenciação, os parasitos infectivos destacam-se das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto

(HANDMAN, 2000; ANTOINE et al., 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BAÑULS et al., 2007). Desse modo, ao fazer um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula e regurgita na derme do hospedeiro algumas centenas de formas promastigota metacíclicas associadas à sua saliva. A saliva do vetor contém substâncias farmacologicamente ativas (anticoagulantes, vasodilatadoras, moléculas imunorreguladoras e antiinflamatórias) que alteram a resposta imune do hospedeiro vertebrado, favorecendo o estabelecimento da infecção (GREVELINK; LERNER, 1996; HANDMAN, 2000; NEVES, 2005; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; KAYE; SCOTT, 2011). Os parasitos são, na sua maioria, fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, onde são formados os fagossomos. Estes se fundem a lisossomos, formando os fagolisossomos que originam os vacúolos parasitóforos (NEVES, 2011). Após o estabelecimento de uma residência intracelular, os promastigotas transformam-se em amastigotas, parasitos intracelulares obrigatórios altamente infectivos e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. Uma vez no hospedeiro, a forma amastigota sobrevive multiplicando-se por divisão binária dentro dos macrófagos. Quando estão repletas de parasitos, as células rompem-se permitindo a reinfecção de outros fagócitos locais (HANDMAN, 2000; NEVES, 2005; ANTOINE et al., 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BAÑULS et al., 2007; KAYE; SCOT, 2011). O ciclo de transmissão é completado quando fagócitos infectados são ingeridos junto com sangue durante o repasto sanguíneo do inseto vetor (KAYE; SCOTT, 2011).



**Figura 5.** Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: Figura modificada de KAYE; SCOTT, 2011.

## 2.5. Quadro clínico

As diversas apresentações clínicas da doença dependem da subespécie de *Leishmania* causadora (tabela 2), do estado imunológico e da idade do paciente afetado (crianças e idosos são mais propensos a ter complicações) (VON STEBUT, 2015). As manifestações clínicas variam de autocura das úlceras cutâneas a uma doença sistêmica grave de múltiplos órgãos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015) e são detalhadas a seguir:

- Leishmaniose visceral (LV): a leishmaniose visceral também é conhecida como calazar e resulta da infecção de fagócitos dentro do sistema reticuloendotelial devido à metástase de parasitos e macrófagos infectados com parasitos do local inicial da infecção na pele (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). No “Velho Mundo”, a LV é causada por *Leishmania donovani* (em regiões da Índia, Paquistão, China e África) e *Leishmania infantum* (na região mediterrânea). No “Novo Mundo” o agente causador da LV é a *Leishmania infantum* (também conhecida como *Leishmania chagasi* ou *Leishmania infantum chagasi*), a qual é encontrada primariamente no Brasil (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). O período de incubação da LV é variável e as manifestações podem aparecer de 10 dias a mais de 1 ano após exposição (PACE, 2014). Os sintomas mais comuns da leishmaniose visceral incluem febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso (PACE, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Apesar do tratamento apropriado, recaídas podem ocorrer 6-12 meses depois (PACE, 2014). Se não tratada, a doença progride resultando em emagrecimento grave e imunossupressão, tornando os pacientes propensos a infecções secundárias e morte em 2-3 anos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PACE, 2014; WHO, 2015).

- Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC): é uma dermatose que acontece meses a anos após o tratamento de leishmaniose visceral. A patogênese não é completamente entendida, mas parece estar relacionada a uma agressiva resposta imunológica do hospedeiro contra parasitos dérmicos persistentes (PACE, 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; WHO, 2015). Manifesta-se como erupção cutânea na face, tronco e membros que variam em gravidade (PACE, 2014). A progressiva proliferação de parasitos dentro da pele dá origem a lesões difusas maculares, maculo-papular ou nodulares. Ocorre principalmente na Índia e no Sudão em pacientes infectados com *L. donovani* (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

- Leishmaniose cutânea (LC): é a forma menos grave da doença e é causada por várias espécies. No “Novo Mundo”, a LC é causada por *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L.*

*panamensis* e *L. peruviana*. No “Velho Mundo” os agentes etiológicos são *L. aethiopica* (causa LC difusa), *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica* (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). As manifestações da LC podem variar de assintomáticas a doenças clinicamente evidentes que podem permanecer localizadas na pele ou disseminadas para mucosas orais e sistema respiratório superior (PACE, 2014). Quando sintomática, após várias semanas ou meses de infecção, desenvolve-se inicialmente uma pápula indolor que progride para um nódulo o qual pode eventualmente ulcerar (PACE, 2014; VON STEBUT, 2015). As lesões ulcerativas ou nodulares da leishmaniose cutânea localizada (LCL) são únicas, indolores e aparecem no ou próximo ao local da picada (NEVES, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Na leishmaniose cutânea difusa (LCD), tal como a causada por *L. amazonensis*, lesões nodulares de tamanhos variados entram em erupção em várias partes do corpo frequentemente distantes do local da picada. A aparência e extensão das lesões na pele após infecção por *Leishmania* variam de acordo com a espécie, fatores genéticos do hospedeiro e extensão de ativação do sistema imunológico (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O local da picada geralmente é uma área descoberta do corpo, acessível ao mosquito, como a face, pescoço, braços e pernas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PACE, 2014; VONSTEBUT, 2015). A cura ocorre ao longo de meses/anos e pode deixar cicatrizes e alterações permanentes na pigmentação da pele (PACE, 2014).

- Leishmaniose mucocutânea (LMC): a leishmaniose mucocutânea também é conhecida como espúndia (BALAÑA-FOURCE et al., 1998) e é decorrente da disseminação linfática ou hematogênica do parasito a partir da lesão cutânea, simultaneamente ou meses/anos mais tarde, podendo resultar em infecção das mucosas oral e do trato respiratório superior (PACE, 2014). No “Novo Mundo”, as lesões mucosas são causadas por *L. braziliensis* e *L. panamensis* (em países da América do Sul, sobretudo no Brasil, Peru e Bolívia, mas também é encontrada em menores proporções na Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015) e no “Velho Mundo” essas lesões são raras (PACE, 2014). A LMC manifesta-se como nódulos e infiltrados da cartilagem nasal conduzindo a um bloqueio das

narinas, destruição do septo nasal e colapso nasal. A faringe, palato, lábio superior e laringe também podem ser acometidos e resultar em destruição tecidual grave e desfigurações (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PACE, 2014; WHO, 2015). Essa infecção horivelmente desfigurante pode progredir afetando a função respiratória e dificultando a nutrição. A doença é frequentemente refratária à quimioterapia e pacientes podem morrer em decorrência de infecções secundárias e desnutrição (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

### **3. Tratamento para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é aquela cujos agentes etiológicos são parasitos do gênero *Leishmania* do “Novo Mundo” e que se manifesta como lesões cutâneas ou mucocutâneas. Existe uma gama de terapias para as várias formas de leishmaniose (tabela 3) e a preferência por tratamento de primeira ou segunda escolha varia de acordo com o tipo da doença e é frequentemente guiada pela prática regional (de acordo com disponibilidade e efetividade da droga) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O tratamento de primeira escolha para a LTA conta com os antimoniais pentavalentes. No entanto, em caso de uma resposta insatisfatória ao tratamento ou na impossibilidade do seu uso, opta-se pelo uso de drogas de segunda escolha (BRASIL, 2013; 2014). Várias opções alternativas de tratamento estão disponíveis: isotionato de pentamidina, anfotericina B, miltefosina, agentes antifúngicos (como o cetoconazol, fluconazol, itraconazol) e paramomicina (VRIES et al., 2015).

Segundo recentes orientações da Organização Pan-Americana de Saúde, recomenda-se o tratamento local com antimonial pentavalente intralesional para pacientes com leishmaniose cutânea (lesões únicas de até 3 cm, exceto na cabeça e região periarticular) e terapia sistêmica para lesões graves e leishmaniose mucosa. Para a LC causada por *L. panamensis* e *L. guyanensis* a miltefosina ou pentamidina pode ser utilizada. Cetoconazol é recomendado para *L. mexicana* e *L. panamensis*. Outras alternativas terapêuticas incluem antimonial + pentoxifilina ou anfotericina B lipossomal ou

desoxicolato de anfotericina B ou pentamidina ou miltefosina (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). A existência de numerosos tratamentos sistêmicos e locais reflete a dificuldade de encontrar um tratamento de sucesso (HANDLER et al., 2015).

### 3.1. Antimonial

A eficácia do tártaro emético, antimonial trivalente ( $\text{Sb}^{3+}$ ), no tratamento da leishmaniose cutâneo-mucosa foi primeiramente relatada pelo médico brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna em 1912 (VIANNA, 1912). Anos mais tarde, constatou-se que essa droga era muito tóxica e instável em climas tropicais, o que conduziu à descoberta dos antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{5+}$ ) (HALDAR et al., 2011). Os antimoniais pentavalentes têm sido usados como tratamento de primeira escolha para leishmaniose em diferentes localidades geográficas desde 1945 (RAMA et al., 2015). São comercializados na forma de antimoniato de N-metilglucamina (NMG) (nome comercial Glucantime<sup>®</sup>) na América Latina e África e como estibogluconato de sódio (SGS) (nome comercial Pentostam<sup>®</sup>) na Europa e Estados Unidos (LIMA et al., 2007; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Ambos apresentam resultados semelhantes nas formas clínicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a eficácia equivalente pode ser explicada pelo fato de serem da mesma classe farmacológica e apresentarem mecanismo de ação e farmacocinética semelhantes (LIMA et al., 2007).

Apesar de ser usado há mais de 70 anos para o tratamento da leishmaniose, ainda existem lacunas importantes quanto ao preciso mecanismo de ação dos antimoniais. O mesmo, provavelmente, está relacionado a ações multifatoriais diretas em processos moleculares do parasito e a uma influência na atividade parasiticida dos macrófagos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Três modelos hipotéticos são propostos no tocante ao mecanismo de ação dessas drogas:

(1) O  $\text{Sb}^{5+}$  comporta-se como uma pró-droga, a qual sofre redução biológica para uma forma mais ativa/tóxica, o  $\text{Sb}^{3+}$ , que apresenta atividade leishmanicida. Porém, o sítio e o mecanismo de redução permanecem controversos; compostos tióis tanto do hospedeiro mamífero (glutathione),

quanto do parasito (tripanotiona) parecem estar envolvidos na redução de  $\text{Sb}^{5+}$  a  $\text{Sb}^{3+}$ . O antimonial trivalente inibiria a tripanotiona redutase, enzima que regenera a tripanotiona reduzida, biomolécula importante no metabolismo de peróxido de hidrogênio em tripanossomatídeos;  $\text{Sb}^{3+}$  também poderia se ligar a proteínas envolvidas na estrutura, replicação e reparo de DNA, (TURRENS, 2004; HALDAR et al., 2011).

(2) O  $\text{Sb}^{5+}$  possui atividade anti-*Leishmania* intrínseca. A droga causaria depleção de ATP provavelmente via inibição da glicólise e  $\beta$ -oxidação. Foi relatado também que  $\text{Sb}^{5+}$  poderia formar complexos com ribonucleosídeos, interferindo no metabolismo de purinas (HALDAR et al., 2011).

(3) Antimoniais agem na ativação de macrófagos, induzindo produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas, o que culmina com a morte de parasitos intracelulares (HALDAR et al., 2011).

Esses compostos podem ser administrados via intravenosa (IV) ou intramuscular (IM) e tem sido usados também intralesionalmente (IL) para a leishmaniose cutânea (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Ministério da Saúde, o esquema terapêutico preconizado para as lesões cutâneas e disseminadas é uma dose que varia entre 10 e 20 mg  $\text{Sb}^{5+}$ /kg/dia, sugerindo-se 15mg  $\text{Sb}^{5+}$ /kg/dia tanto para adultos quanto para crianças durante 20 dias consecutivos. Se necessário, o esquema terapêutico deverá ser repetido, prolongando-se a duração do tratamento para 30 dias (BRASIL, 2013). Para a leishmaniose mucocutânea, a dose recomendada é 20 mg  $\text{Sb}^{5+}$ /kg/dia por 28 a 30 dias (HANDLER et al., 2015). A taxa de cura varia entre 77 e 90 % dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

O principal efeito adverso dos antimoniais pentavalentes deve-se à sua ação sobre o sistema cardiovascular (BRASIL, 2013) causando arritmias cardíacas, síncope, taquicardia e fibrilação ventriculares e alterações no eletrocardiograma (RAMA et al., 2015; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Outros efeitos adversos incluem artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, edema, alterações das enzimas hepáticas e insuficiência renal aguda (BRASIL, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Além disso, os antimoniais são



contraindicados para gestantes, já que a droga atravessa a barreira transplacentária, podendo levar a severas síndromes de retardamento mental. Também há restrições de uso da droga em pacientes com idade superior a 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (BRASIL, 2013). Outras limitações à eficácia dos antimoniais é o aumento nos casos de resistência do parasito à droga (HANDLER et al., 2015) e a sua via de administração preferencialmente parenteral, o que torna o tratamento caro e difícil, sobretudo em zonas rurais (HANDLER et al., 2015).

### 3.2. Pentamidina

São diaminas aromáticas que vem sendo usadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. São comercializadas para uso em humanos nas seguintes formulações: Isotionato (di-B-hidroxietano sulfonato) e Mesilato (di-B-hidroximetil-sulfonato) (BRASIL, 2013) com os seguintes nomes comerciais 'Pentacrinat' e 'Pentam' (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Poucos estudos foram realizados nas Américas utilizando a pentamidina como terapêutica para LTA. Classicamente a dose recomendada é de 4,0 mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2,0 g (BRASIL, 2013). Tem sido usada via IV na dose de 4,0 mg/kg por 3-5 dias para o tratamento de LC da América do sul causada por *L. guyanensis* e *L. panamensis* (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). No Brasil, infecção por *L. braziliensis* tratada na dose de 4,0 mg/kg/dia em dias alternados por uma semana resultou na cura de 71 % dos pacientes (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Não é conhecido com exatidão o mecanismo de ação dessa droga, mas possivelmente sua ação parece estar relacionada à interferência na biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Sabe-se que o medicamento tem ação no metabolismo de glicose, podendo ocasionar hipoglicemia, seguida de hiperglicemia quando do seu uso. O mecanismo de resposta bifásica ainda não está esclarecido e pode ocorrer indução de citólise das células  $\beta$ -pancreáticas e, conseqüentemente,

diabetes insulino-dependente. O efeito diabetogênico parece ser cumulativo e dose-dependente (BRASIL, 2013).

As reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (BRASIL, 2013; SUNDAR; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; CHAKRAVARTY, 2015). Há contraindicação em caso de gestação, diabetes, insuficiência renal e hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 48 kg (BRASIL, 2013).

### **3.3. Anfotericina B**

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres da membrana citoplasmática dos parasitos (BRASIL, 2013). A droga interage com o ergosterol da membrana celular formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana do parasito e promovem um influxo de íons. A alteração do balanço iônico conduz à morte de promastigotas e amastigotas (LIMA et al., 2007; HANDLER et al., 2015). O deoxicolato de anfotericina B (AmBD) foi primeiramente licenciado em 1959 para uso em infecções fúngicas fatais. Por requerer aplicação intravenosa e conseqüentemente apresentar várias reações adversas, novas formulações incluindo Anfotericina B lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>; Gilead Sciences), complexo lipídico de Anfotericina B (ABLC; Abelcet<sup>®</sup>, Enzon Pharmaceuticals) e dispersão coloidal de Anfotericina B (ABCD; Amphotec<sup>™</sup>, Intermune Corp.) têm sido produzidas (ANDREWS et al., 2014).

A anfotericina B é comumente usada para tratamento de LV (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015) e para tratar leishmaniose onde a resistência ao antimonial é muito difundida. Em virtude da ocorrência de poucos trabalhos na literatura sobre o uso de anfotericina B na leishmaniose tegumentar, recomenda-se o seguinte esquema de tratamento: 1,0 mg/kg/dia administrado diariamente ou em dias alternados, não podendo ultrapassar a dose de 50 mg em cada aplicação. Essa dose deve ser administrada até atingir as doses totais (1,0-1,5 g para a forma cutânea; 2,5-3,0 g para a forma mucosa) (BRASIL, 2013). A anfotericina B tem sido bem sucedida para o tratamento de

leishmaniose cutânea no “Novo Mundo” causada por *L. braziliensis*, a qual é conhecida por ter alta resistência ao antimonial. Um estudo realizado na Bolívia com *L. braziliensis* provou que a anfotericina B lipossomal foi mais eficiente (taxa de cura de 85 %), mais bem tolerada e mais custo-efetiva que os antimoniais. Outro estudo realizado no Brasil com *L. braziliensis* mostrou uma taxa de cura de 81 %, com baixos efeitos colaterais (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; HANDLER et al., 2015; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Anfotericina B lipossomal é tipicamente usada na dose de 2,5-5,0 mg/kg/dia e sua formulação reduz o tempo total de tratamento para metade do tempo quando comparada com a forma não lipossomal (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A anfotericina B lipossomal é uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. No Brasil, a droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral, sendo então considerada uma droga “off label” (indicação não incluída na bula) para indicação de leishmaniose tegumentar. O uso “off label” de qualquer medicamento pode ser realizado por conta e risco do médico que o prescreve. Dados da literatura permitem indicar o uso da anfotericina B lipossomal para LT nos casos em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso ou contraindicadas (BRASIL, 2013).

Graves efeitos adversos estão relacionados à administração intravenosa da anfotericina B, tais como: febre, cefaleia, náusea, vômito, anorexia, tremores, calafrios, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, distúrbios do comportamento (BRASIL, 2013; ANDREWS et al., 2014; HANDLER et al., 2015; RAMA et al., 2015). É contraindicada para cardiopatas, hepatopatas e especialmente nefropatas (BRASIL, 2013). Outra limitação é que a forma lipossomal possui custo elevado (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

### 3.4. Paramomicina

É um antibiótico aminoglicosídeo que bloqueia a síntese de proteínas por se ligar ao RNA ribossomal. Tem sido utilizado em formulações tópicas e parenterais para o tratamento de leishmaniose cutânea, porém o uso sistêmico para LC é raro. (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Os dados de utilização da paramomicina são fundamentalmente limitados ao seu uso tópico devido à falta de conhecimento sobre sua eficácia quando administrada via parenteral (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

A paramomicina está disponível em várias formulações tópicas, as quais têm mostrado resultados variáveis na LC. O tratamento tópico para LC do “Novo Mundo” consiste na pomada de paramomicina 15 % com cloreto de metil benzetônio 12 % aplicado uma vez ao dia por vinte dias (LIMA et al., 2007; HANDLER et al., 2015). Metil benzetônio é um agente facilitador da penetração cutânea (LIMA et al., 2007) e essa formulação tópica é fácil de administrar; seus efeitos colaterais incluem prurido, ardência e formação de vesículas (HANDLER et al., 2015). Também tem sido usada a combinação de paramomicina com gentamicina (LIMA et al., 2007). Em doses de 20 mg/kg/dia por 20 dias mostrou excelente taxa de cura de mais de 90 % no Brasil (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Efeitos adversos locais são prurido, erupção cutânea e ardência (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). Os efeitos adversos do uso sistêmico de paramomicina incluem ototoxicidade, instabilidade vestibular e nefrotoxicidade (LIMA et al., 2007; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

### 3.5. Miltefosina

Originalmente investigada como agente antineoplásico, a miltefosina (hexadecilfosfocolina) é derivada de alquil-lisofosfolipídeos e é comercializada com os nomes comerciais Impavido® e Miltex® (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O modo com a droga atua em *Leishmania* ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que o mecanismo de ação envolva apoptose e perturbação da via de sinalização celular dependente de lipídeos (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A miltefosina tem sido usada no tratamento de leishmaniose tegumentar do “Novo Mundo” causada por várias espécies apresentando diferentes eficácias (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Na LC do “Novo Mundo” causada por *L. mexicana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* a miltefosina é efetiva na dose de 2,5 mg/kg por 28 dias, mas não é benéfica para infecções por *L. braziliensis*. A LMC boliviana respondeu ao tratamento por miltefosina durante 4-6 semanas com taxa de cura de até 75 % (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

A droga é muito bem tolerada e os principais efeitos adversos são náuseas e vômitos. É um agente teratogênico e, portanto, contraindicado para gestantes (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Limitações da miltefosina compreendem seu custo relativamente alto, necessidade de monitoramento de efeitos colaterais gastrointestinais e ocasionalmente toxicidade hepática e nefrotoxicidade. Também é vulnerável ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

### **3.6. Derivados azóis**

Os compostos azóis são comumente conhecidos como inibidores da biossíntese de ergosterol (VENKATESWARLU; KELLY, 1996). O ergosterol é o principal esterol presente em membranas de fungos e parasitos tripanossomatídeos e é requerido para o crescimento normal desses organismos (VENKATESWARLU; KELLY, 1996; SOUZA; RODRIGUES, 2009). O modo de ação dos derivados azóis é baseado na inibição da enzima 14 $\alpha$ -demetilase do citocromo 450 (P450<sub>14dm</sub>), a qual é responsável pela demetilação do lanosterol a ergosterol (VENKATESWARLU; KELLY, 1996; SOUZA; RODRIGUES, 2009; SINGH et al., 2012). A inibição dessa enzima conduz a uma depleção nos níveis de ergosterol concomitantemente ao aumento nos níveis de substratos e outros 14 $\alpha$ -metil esteróis, levando à perturbação da estrutura e função da membrana e culminando com inibição no crescimento de fungos e parasitos (VENKATESWARLU; KELLY, 1996; SOUZA; RODRIGUES, 2009). O cetoconazol, um dos primeiros compostos azóis desenvolvidos, foi intensamente utilizado por vários anos. Mais recentemente, entretanto, novos

azóis estão comercialmente disponíveis: fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Tem sido visto que os compostos azóis apresentam atividade parasiticida *in vitro* contra uma variedade de espécies de *Leishmania* (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O cetoconazol (Nizoral®), 600 mg, diariamente, via oral por 28-30 dias e fluconazol (Diflucan®), 200 mg, diariamente, via oral por 6 semanas têm mostrado acelerada cura em infecções de LC causadas por *L. mexicana* e *L. major*, respectivamente (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Evidências mostraram que o tratamento com doses diárias de 600 mg de cetoconazol via oral por 28 dias obteve taxa de resposta entre 76 e 90 % em infecções causadas por *L. mexicana*, *L. panamensis*, mas não para *L. braziliensis* (JOLLIFFE, 1986; NAVIN et al., 1992; DVORAK; NANDA, 1995; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; HANDLER et al., 2015). Alguns estudos clínicos também foram realizados com o intuito de comparar a eficácia do cetoconazol em relação ao antimonial e concluiu-se que a eficácia do cetoconazol oral é comparável à dos antimonials (SAENZ et al., 1990; NAVIN et al., 1992; SALMANPOUR et al., 2001). Com vistas à combinação de cetoconazol e antimonial somente um estudo clínico foi realizado até então. El-Sayed e Anwar (2010) avaliaram pacientes do leishmaniose diagnosticados com LC localizada e concluíram que as combinações de antimonial intramuscular + cetoconazol oral ou antimonial intramuscular + antimonial intralesional foram mais efetivas que o antimonial intralesional sozinho para o tratamento de LC. Porém, os autores sugerem que a terapia com cetoconazol seria muito mais fácil e segura que a combinação de antimonial-antimonial.

De um modo geral, os efeitos colaterais relacionados aos compostos azóis são brandos e incluem diminuição na produção de testosterona (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). Pacientes em tratamento prolongado com compostos azóis requerem testes sanguíneos de rotina para avaliar anormalidades da função hepática (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014) e é contraindicado para gestantes (teratogênico).

**Tabela 3.** Drogas usadas no tratamento das diferentes formas clínicas da leishmaniose.

Droga	Mecanismo de ação em <i>Leishmania</i>	Via de administração e principal indicação	Efeitos adversos	Vantagens e desvantagens
Antimonial pentavalente	Inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos. Inibição dose dependente da formação de ATP e GTP	<u>LV, LC, LMC,</u> <u>LDPC:</u> IM, IV <u>CL:</u> IL	Sistêmicos: pancreatite, trombocitopenia, leucopenia, arritmia cardíaca, alteração enzimas hepáticas	Formulação barata Desenvolvimento de resistência é problemático
Isotianato de pentamidina	Inibição biossíntese de poliaminas e alteração potencial de membrana mitocondrial	<u>LC, LMC:</u> IM <u>CL:</u> IL	Dor no local da injeção, hipoglicemia, hipotensão, diabetes, disfunção renal	Desenvolvimento de resistência é problemático Efeitos adversos limitam o uso
Anfotericina B e formulações lipídicas	Inibição da síntese da membrana celular por ligação ao ergosterol. Formação de poros membrana celular.	<u>LV, CL, LMC,</u> <u>LDPC:</u> IV	Febre, calafrio, dor óssea, hipocalcemia, nefrotoxicidade	Formulação lipídica menos tóxica que a anfotericina B Dose total efetiva varia com a região geográfica Mais caro que antimonial
Paramomicina	Possível interferência com a síntese de RNA/ permeabilidade da membrana	<u>LV:</u> IM <u>LC:</u> tópica	Tópica: dor, formação de bolhas, eritema Sistêmica: hepatotoxicidade, dano reversível do nervo	Combinação com antimoniais resulta em altas taxas de cura na Índia, mas não na África.
Derivados azóis: fluconazol, cetoconazol, itraconazol	Inibição da enzima 14 $\alpha$ -lanosterol demetilase, requerida biossíntese de ergosterol	<u>LC:</u> oral	Hepatotoxicidade	Sucesso inconsistente entre espécies
Análogos de alquilfosfolina: Miltefosina	Alteração na síntese da âncora de glicofosfatidilinositol, metabolismo de lipídeo, transdução de sinais	<u>LV, CL, LDPC:</u> oral	Distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepato-renal, teratogenicidade: contraindicado para gestante	Falta de dados sobre emergência de resistência Altas taxas cura se combinada à paramomicina ou sequencialmente após anfotericina lipossomal para LV na Índia

Fonte: Tabela adaptada de PACE, 2014.

#### **4. Novas abordagens terapêuticas**

O tratamento e a profilaxia de doenças parasitárias causadas por protozoários dependem de drogas, sendo que muitas delas têm se tornado menos efetivas, o que leva à busca por drogas substitutas (ANDREWS et al., 2014). Uma análise de 68 drogas aprovadas estimou que se gasta em média 15 anos e 800 milhões de dólares para trazer um medicamento ao mercado (CHONG; SULLIVAN JR., 2007; SARTERIALE et al., 2014). A demora e o alto custo para a descoberta de novas drogas representa um obstáculo para combater doenças emergentes, patógenos resistentes a drogas e doenças que têm pequeno retorno financeiro (CHONG; SULLIVAN JR., 2007). Nesse sentido, novas abordagens terapêuticas, tais como o reposicionamento e a combinação de drogas, surgem como potenciais soluções para esses problemas.

##### **4.1. Reposicionamento de drogas**

Uma abordagem para acelerar a descoberta de drogas é encontrar novos usos para drogas ou compostos já existentes. Isso é chamado de reposicionamento, redirecionamento ou redefinição de drogas (EKINS et al., 2011; ANDREWS et al., 2014). Para a indústria farmacêutica, o reposicionamento de drogas tem um significativo valor comercial, pois amplia o seu mercado e demanda pouco risco financeiro em um curto espaço de tempo (EKINS et al., 2011).

Os benefícios do reposicionamento são inúmeros. Primeiramente, há disponibilidade de materiais e dados que podem ser usados e apresentados a autoridades regulatórias (EKINS et al., 2011). Drogas existentes possuem farmacocinética conhecida, são seguras, frequentemente já foram aprovadas por agências reguladoras para uso em humanos e um novo uso poderia ser rapidamente avaliado em triagens clínicas. Assim, os desenvolvedores de drogas, poderiam economizar no custo total de trazer uma nova droga ao mercado por eliminar avaliações farmacocinéticas e toxicológicas. A redução de custo (drogas reposicionadas custam em torno de 60 % menos que novas drogas) e segurança são razões convincentes para investir em drogas antigas



(CHONG; SULLIVAN JR., 2007; SARTERIALE et al., 2014). A redução do tempo para a droga chegar ao mercado também representa uma grande vantagem. Outro benefício é a possibilidade de estender o tempo de patente. Há ainda a chance de se descobrir uma potencial aplicação para aquelas drogas que apresentaram falhas nos testes pré-clínicos e clínicos para sua indicação primária (ANDREWS et al., 2014; SARTERIALE et al., 2014).

Entretanto, ainda há relutância das indústrias farmacêuticas em permitir testes de drogas existentes com indicações para doenças “não-comerciais”, pois toxicidades indesejadas podem ser descobertas comprometendo o valor comercial de seus produtos. Também existe dificuldade no acesso a drogas que não passaram em teste (pré)-clínicos por razões comerciais, sobretudo patentes (ANDREWS et al., 2014).

O reposicionamento de drogas tem contribuído bastante para a descoberta de drogas antiparasitárias (ANDREWS et al., 2014). Exemplos que surgiram dessa abordagem incluem: anfotericina B, paramomicina e miltefosina. O deoxicolato de anfotericina B foi primeiramente licenciado em 1959 para uso em infecções fúngicas fatais. Desde então, várias formulações visando à diminuição de reações adversas têm sido produzidas. Em 1997, a anfotericina B lipossomal tornou-se a primeira droga para leishmaniose aprovada pela “Food and Drug Administration” (FDA) órgão governamental regulatório dos Estados Unidos. A paramomicina foi isolada na década de 1950 e é um antibiótico de amplo espectro com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, cestodas e outros protozoários como *Giardia* e *Entamoeba histolytica*. A atividade leishmanicida da paramomicina foi estabelecida na década de 60. Atualmente, a paramomicina ainda é uma opção de tratamento para giardíase, amebíase e leishmaniose, mas não é mais tão usada como antibiótico. Com o surgimento de compostos mais populares como cefalosporina e quinolonas, a paramomicina saiu do mercado na década de 80. Finalmente, a miltefosina foi descoberta na década de 80 com atividades antineoplásica e anti-*Trypanosoma*. A droga foi prioritariamente desenvolvida para ser utilizada no tratamento de metástases de câncer de mama, com uma formulação tópica (MilteX<sup>®</sup>, Baxter, UK) e foi avaliada também em outros tipos de tumores. Entretanto, tal uso foi descontinuado devido a

efeitos gastrointestinais adversos e, atualmente, a miltefosina pode ser utilizada para tratar a leishmaniose por via oral (ANDREWS et al., 2014).

#### **4.2. Combinação de drogas e Isoblograma**

Desde os primórdios, combinações de drogas têm sido utilizadas para o tratamento de várias doenças (CHOU, 2006). O uso de múltiplas drogas pode atingir múltiplos alvos, múltiplas subpopulações ou múltiplas doenças simultaneamente. O uso de mais de uma droga com diferentes mecanismos de ação também pode direcionar o efeito contra um único alvo ou doença e tratá-los mais efetivamente (CHOU, 2006).

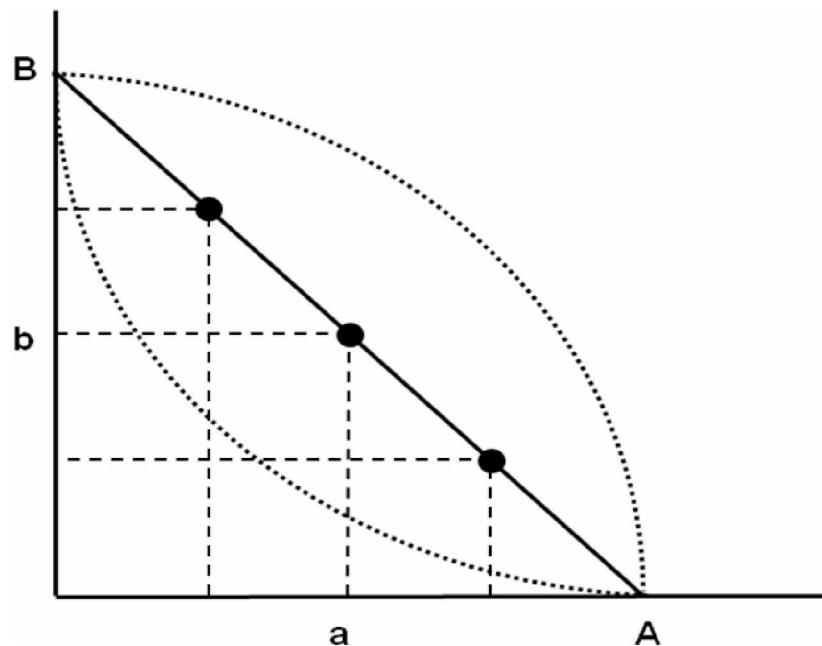
A associação de drogas apresenta as seguintes vantagens: (1) aumenta a eficácia terapêutica por usar compostos com interação sinérgica ou aditiva ou melhora a seletividade contra o alvo versus hospedeiro; (2) minimiza ou desacelera a emergência de resistência a drogas; (3) utiliza doses menores (que mantenham ou melhorem a eficácia), reduzindo custos e as chances de efeitos adversos; (4) aumenta o espectro de atividade (CHOU, 2006; HALDAR et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Em virtude desses benefícios terapêuticos, a combinação de drogas tem sido amplamente empregada e se tornou a principal escolha para o tratamento de doenças como o câncer e a AIDS (CHOU, 2006).

No século passado, vários esforços foram empreendidos na tentativa de medir quantitativamente as relações dose-efeito de drogas isoladas e suas combinações e determinar se uma dada combinação de drogas apresentaria ou não efeito sinérgico. Visto que os sistemas biológicos são extremamente complexos, existem inúmeros modelos, abordagens, hipóteses, teorias, bem como controvérsias sobre a combinação de drogas (CHOU, 2006).

Introduzido há muitos anos por Loewe (1927, 1928, 1953), o isoblograma é um método gráfico em coordenadas cartesianas, em que as doses ou concentrações das drogas testadas são colocadas uma em cada eixo. Tal abordagem é aplicável a um par de drogas que produzem efeitos mensuráveis testados em função de suas respectivas doses ou concentrações. O isoblograma é baseado inteiramente na potência relativa e não diz nada sobre mecanismo de ação, somente que as drogas em combinação agem de

acordo com suas potências individuais. O propósito é avaliar o tipo de interação que existe para a combinação de duas drogas. Esse método tem sido utilizado para analisar experimentos em animais, preparações de tecidos isolados e em nível celular (TALLARIDA, 2012).

Para construir um isoblograma e determinar o tipo de interação entre as drogas, o pré-requisito é conhecer a potência e a forma da curva dose-efeito de cada droga isoladamente (CHOU, 2006). A partir de então é possível determinar as concentrações de cada droga capazes de produzir o efeito/inibição de interesse, que usualmente é  $\frac{1}{2}$  do efeito/inibição máximo (ou  $EC/IC_{50}$ , concentração capaz de produzir 50 % de efeito) (TALLARIDA, 2012). Esse dado pode ser determinado graficamente ou com o uso de softwares que calculam os valores automaticamente (CHOU, 2006). A perfeita adição entre as drogas é basicamente representada por uma diagonal AB que traduz o lugar geométrico das combinações entre as drogas A e B que produzem o efeito medido (figura 7) (ROCHA SILVA, 1973). Com isso, gera-se a linha de aditividade ou linha teórica de aditividade ou *isobol* (ROCHA SILVA, 1973; TALLARIDA, 2012). Ao considerar as duas concentrações A e B de duas drogas que produzem o mesmo efeito, tem-se uma *isobol* isoaditiva. Assim, a linha convexa para o eixo x seria *isobol* infra-aditiva, indicando antagonismo parcial entre as substâncias; e a linha côncava para o eixo x seria *isobol* supra-aditiva, correspondente a um efeito potencializador de uma droga em relação à outra. Efetivamente, analisando a diagonal, as metades (a, b) das concentrações A e B, quando combinadas, produziram o mesmo efeito que cada uma das concentrações A ou B. Na *isobol* supra-aditiva, bastariam doses inferiores às metades de A e B para produzir o efeito esperado. Ao contrário, na *isobol* infra-aditiva, a adição de uma concentração de B requer a adição simultânea de uma concentração muito maior de A para a produção do efeito esperado (ROCHA SILVA, 1973).



**Figura 6.** Esquema representativo de um isoblograma. O gráfico apresenta a combinação de duas drogas cujas concentrações A e B são equipotentes. Em relação ao eixo x, a isobol côncava representa sinergismo e a isobol convexa representa antagonismo. Fonte: Modificada de ROCHA SILVA, 1973.

O tipo de interação entre drogas é frequentemente expresso em termos de fração da concentração inibitória (FIC). FIC é a concentração inibitória de cada droga em combinação dividida pela concentração inibitória da droga agindo sozinha. Para duas drogas A e B interagindo, a soma dos FICs ( $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$ ) expressa a extensão da interação (índice de combinação). Embora o cálculo dos índices FIC seja matematicamente preciso, os dados experimentais nos quais eles são baseados são frequentemente menos exatos. Na prática, consideráveis diferenças nos valores experimentais foram observadas principalmente com antibióticos e, por isso, faixas foram arbitrariamente definidas para a determinação do tipo de interação (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983). Atualmente, a interpretação mais conservadora e amplamente recomendada pela literatura especializada é o isoblograma. O procedimento é baseado em valores da somatória de  $FIC_{50}$  e/ou  $FIC_{90}$  e classifica a natureza da interação como sinergismo ( $\Sigma FIC \leq 0,5$ ), antagonismo ( $\Sigma FIC > 4,0$ ) e aditividade (nenhuma interação;  $\Sigma FIC > 0,5-4,0$ ) (ODDS, 2003).

Para estudos de associação de drogas *in vitro*, cada curva e suas combinações consistem usualmente de 5 a 8 pontos. Diferentemente, nos estudos *in vivo*, o número de pontos é reduzido (3-5 pontos cada). Os estudos devem ser realizados simultaneamente para garantir as mesmas condições experimentais, tais como evitar a decomposição da droga, a variabilidade das condições do ensaio, alterações pessoais e inconsistência celular ou animal. Os estudos com animais obviamente consomem mais tempo, são mais dispendiosos e uma variabilidade maior nas medidas podem ser encontradas. Consequentemente, estudos de combinação de drogas *in vivo* geralmente são realizados após estudos *in vitro*. A determinação quantitativa de interação entre drogas em triagens clínicas é muito difícil de realizar. Essa, aparentemente, é a razão para muitas combinações de drogas terem falhado ou obtido resultados inconclusivos. Assim, conclusões sobre a associação de drogas em experimentos *in vitro* e em animais, tais como dose, via de administração, esquema de tratamento, eficácia, toxicidade, tipo de interação, dependência não devem ser negligenciadas (CHOU, 2006).

No método isoblograma de proporção fixa, método modificado por Fivelman et al. (2004) e Mesquita et al., (2014), o diferencial em relação ao isoblograma convencional é a utilização de diluições em série de proporções fixas de ambas as drogas, isto é, as concentrações de droga são variadas ao mesmo tempo ao longo de um intervalo de concentração pré-determinada. Brevemente, após a determinação da IC<sub>50</sub> de cada uma das drogas, calcula-se a concentração máxima de cada droga no ensaio da combinação, garantindo que o IC<sub>50</sub> seja o ponto médio da curva. São realizadas curvas de concentração-efeito para as seguintes proporções de drogas: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5. A partir de então, calcula-se os FIC<sub>50</sub>s para cada proporção (4:1, 3:2, 2:3 e 1:4) e utiliza-se esses valores para a construção do isoblograma. A soma dos FIC<sub>50</sub>s para cada proporção é determinada ( $\Sigma FIC_{50}s = FIC_{50} \text{ droga A} + FIC_{50} \text{ droga B}$ ), e uma média geral  $\Sigma FIC_{50}s$  ( $\bar{x} \Sigma FIC_{50}$ ) é calculada. A média da  $\Sigma FIC_{50}$  é utilizada para classificar a natureza da interação.

As vantagens sobre o método convencional incluem: (1) as curvas dose-reposta de proporções fixas dependem das razões de concentração das drogas, cada qual é calculada para variar de 100 a 0 % de inibição, permitindo assim um ajuste da curva de regressão e cálculo do EC<sub>50</sub> mais precisos; (2)

variações do dia-a-dia nos EC<sub>50</sub>s não são dramaticamente afetadas pelos cálculos dos FICs; e (3) menos etapas de cálculos são requeridas (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004).

Alguns estudos de combinação de drogas anti-*Leishmania in vitro* já foram realizados utilizando a metodologia do isoblograma de proporção fixa e os critérios de classificação da interação recomendados pela literatura especializada. A associação entre diferentes tipos de bloqueadores de canais de cálcio com drogas padrões (glucantime, anfotericina B e pentamidina) foi avaliada contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi* (REIMÃO; TEMPONE, 2011). Trinconi e colaboradores (2014) avaliaram a efetividade da combinação entre tamoxifeno e anfotericina B em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis in vitro* e *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com parasitos. Outro trabalho avaliou a combinação da nitazoxanida com drogas anti-*Leishmania* (anfotericina B, glucantime, miltefosina e sitamaquina) contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* (MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014).

Em geral, nenhuma monoterapia é 100 % efetiva para a leishmaniose (HANDLER et al., 2015). Compostos antimoniais ainda permanecem como o tratamento de primeira escolha para a LC causada por *L. braziliensis*, a LMC e a LDPC (HANDLER et al., 2015). Na clínica, alguns esquemas terapêuticos têm sido utilizados como alternativas para casos refratários ou com contraindicações aos esquemas tradicionais. Dentre eles podemos citar: antimoniais pentavalentes + pentoxifilina, antimonial pentavalente + alopurinol, antimonial pentavalente + sulfato de aminosidina, antimonial pentavalente + sulfato de paramomicina, antimonial pentavalente + imunoterápicos (IFN-γ ou Leishvacin e alopurinol) (BRASIL, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tipo de interação existente na combinação do cetoconazol, um antifúngico inibidor da síntese de ergosterol, com o antimoniato de meglumina, droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose em formas amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Além disso, esforços foram empreendidos no intuito de melhor compreender o mecanismo de ação do cetoconazol sobre o parasito na forma promastigota.

## Referências Bibliográficas

ANDREWS, K.T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance*, v. 4, p. 95-111, 2014.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; COURRET, N.; LANG, T. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Advances in parasitology*, v. 58, p. 1-68, 2004.

BALANÍA-FOURCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BAÑULS, A. L; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, v. 64, p. 1-109, 2007.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 10, n. 3, p. 560-586, 1988.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 1063-1075, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde*, Secretaria de vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2 ed. atual., 3. reimpr. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 180 p.: il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da*

*leishmaniose visceral* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

CHONG, C. R.; SULLIVAN Jr, D. J. New uses for old drugs. *Nature*, v. 448, p. 645-646, 2007.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

DVORAK, R.; NANDA, A. Ketoconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Kuwait. *International Journal of Dermatology*, v. 34, n. 7, 1995.

EKINS, S.; WILLIAMS, A. J.; KRASOWSKI, M. D.; FREUNDLICH, J. S. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discovery Today*, v. 16, n. 7/8, p. 298-310, 2011.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibugluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibugluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *Journal European Academy of Dermatology and Venereology (JEADV)*, v. 24, p. 335-340, 2010.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 11, p. 4096-4102, 2004.

FURTADO, T.; ALEIXO, J; LOPES, C. F. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais. *O Hospital*, v. 70, p. 259-266, 1966.



GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-sifiliográficas*, v. 96, n. 1, p. 1-24, 2005.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 34, n. 2, Part 1, p. 257-272, 1996.

JOLLIFFE, D. S. Cutaneous leishmaniasis from Belize – treatment with ketoconazole. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 11, p. 62-68, 1986.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular Biology International*, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 11:427-433, 1983.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A.; Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, v. 44, p. 1-39, 2000.

KAYE, P., SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 9(8), p. 604-615, 2011.

LEMOES, J. C.; LIMA, S. C. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos em área de transmissão no município de Uberlândia, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p. 22-26, 2005.

LIMA, E. B.; MOTTA, J. O. C.; PORTO, C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.51, n. 5, p. 247-253, 2009.

MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M.R.F.; FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A. American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, Minas Gerais: Parasitological diagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 44, Suplemento 1, 1988.

MACHADO, M. I.; NISHIOKA, S. A.; FERREIRA, M. S.; SILVA, A. .; ROCHA, A.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. R. F. Leishmaniose tegumentar americana no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia*, v. 8, p. 17-28, 1992.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, J. R. A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 94, p. 103-110, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *International Journal of Medicine*, v. 107, p. 7-14, 2014.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A.G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime<sup>®</sup>, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Tropica*, 130:112-116, 2014.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for Old World cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs*, v. 73, p. 1889-1920, 2013.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.

NAVIN, T.R.; ARANA, B. A.; ARANA, F. E.; BERMAN, J. D.; CHAJÓN, J. F. Placebo-controlled clinical Trial of Sodium Stibugluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 165, p. 528-534, 1992.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 12 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

NISHIOKA, S. A.; FERREIRA, M. S.; MACHADO, M. I.; SILVA, A. M.; ROCHA, A.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. R. F. An outbreak of cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 21, p. 209, 1988.

NWAKA, S.; RAMIREZ, B.; BRUN, R.; MAES, L.; DOUGLAS, F.; RIDLEY, R. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases-Criteria for Lead Progression. *PLOS*, v. 3, n. 8, p. 1-13, 2009.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas. I. Organização Mundial da Saúde II. Título ISBN 978-92-75-71672-4 (Classificação NLM: WC 680) © Organização Mundial da Saúde, 2012.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 1, 2003.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of infection*, v. 69, p. 510-518, 2014.

PAULA, M. B. C.; RODRIGUES, E. A. S.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; PAULA, F. P.; PAJUABA NETO, A. A.; LIMONGI, J. E. Primeiro encontro de *Lutzomyia*

*longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com o relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 3, p. 304-305, 2008.

PAULA, M. B. C.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; LIMONGI, J. E.; PAJUABA NETO, A. A.; RODRIGUES, E. A. S. Survey of sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, 2003 – 2004. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 2, p. 85-89, 2013.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. *Lancet*, v. 1, p. 371-379, 2013.

RAMA, M.; KUMAR, N. V. A.; BALAJI, S. A comprehensive review of patented antileishmanial agents. *Pharmaceutical Patent Analyst*, v. 4, n. 1, p. 37-56, 2015.

REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 8, p. 1032-1038, 2011.

REY, L. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA SILVA, M. *Fundamentos de farmacologia e suas aplicações à terapêutica*. 3 ed. São Paulo: EDART, 1973.

RODRIGUES, E. A. S.; ANDRADE-FILHO, J. D.; LIMONGI, J. E.; PAULA, M. B. C. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in Parque do Sabiá complex, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 5, p. 255-258, 2011.

SAENZ, R. E.; PAZ, H.; BERMAN, J. D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Medicine*, v. 89, p. 147-155, 1990.

SALMANPOUR, R.; HANDJANI, F.; NOUHPISHEH, M. K. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 12, p. 159-162, 2001.

SARTERIALE, A.; BESSOFF, K.; SARKAR, I. N.; HUSTON, C. D. Drug repurposing: mining protozoan proteomes for targets of known bioactive compounds. *The Journal of American Medical Informatics Association*, v. 21, p. 238-244, 2014.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*, v. 88, p. 1013-1025, 2002.

SOUZA, V.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, p. 1-19, 2009.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the Isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 342, n. 1, p. 2-8, 2012.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOHAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEI, D. C.; ULIANA, S. R. B. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2607-2613, 2014.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, p. 211-220, 2004.

VENKATESWARLU, K.; KELLY, S. L. Biochemical characterization of ketoconazole inhibitory action on *Aspergillus fumigatus*. *Immunology and Medical Microbiology*, v. 16:, p. 11-20, 1996.

VIANNA, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v. 2, p. 426, 1912.

VIAS, S. J.; STOLK, W. A.; RUTTE, E. A.; HONTELEZ, J. A. C.; BAKKER, R.; BLOK, D. J.; CAI, R.; HOUWELING, T. A. J.; KULIK, M. C.; LENK, E. J.; LUYENDIJK, M.; MATTHIJSSE, S. M.; REDECOP, W. K.; WAGENAAR, I.; JACOBSON, J.; NAGELKERKE, N. J. D.; RICHARDUS, J. H. Concerted efforts to control or eliminate neglected tropical diseases: how much health will be gained? *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, 2016.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 13, p. 191-201, 2015.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 16, p. 99-109, 2015.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. 1.Leishmaniasis - prevention and control. 2.Leishmaniasis - parasitology. 3.Leishmaniasis - pathology.

4.Leishmaniasis - diagnosis. 5.Leishmaniasis, Cutaneous. I.WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. II.World Health Organization. III.Series. ISBN 978 92 4 120949 6 (NLM classification: WR 350). ISSN 0512-3054

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. 1 Tropical Medicine - trends. 2.Neglected Diseases. 3.Poverty Areas. 4.Universal Coverage - economics. 5.Developing Countries. 6.Annual Reports. I.World Health Organization. ISBN 978 92 4 156486 1

WHO, 2016. Link: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). Access: 06/03/2016.

# Capítulo 2

*Manuscrito 1*



***In vitro* additive interaction between ketoconazole and antimony against intramacrophage *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes**

Débora C. O. Nunes<sup>1,3</sup>, Luiz B. Bispo-da-Silva<sup>2</sup>, Danielle R. Napolitano<sup>2,3</sup>,  
Mônica S. Costa<sup>1</sup>, Márcia M. N. R. Figueira<sup>1</sup>, Renata S. Rodrigues<sup>1,3</sup>, Veridiana  
M. Rodrigues<sup>1,3</sup>, Kelly A. G. Yoneyama<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>2</sup> Área de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

\*Corresponding author: Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama

Phone.: +3432182203 Fax: +55 34 3218 2203#22 – Laboratory address: Pará avenue, 1720 CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: [kelly.tudini@ufu.br](mailto:kelly.tudini@ufu.br).

**Abstract**

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of *Leishmania* genus. The currently available treatments for this disease are expensive, present high toxicity and are associated to difficulties of healing and parasite resistance. Therefore, the development of strategies for leishmaniasis treatment is indispensable and includes reposition of existing drugs, as well as drug combination therapy. The aim of this study was to assess the nature of ketoconazole and antimony association on the cytotoxic effect against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. The calculated mean sum of fractional 50 % inhibitory concentration ( $\bar{x} \Sigma \text{FIC}_{50}$ ) was 2.54 and 1.43 for free and intracellular amastigotes, respectively, values that suggest an additive interaction between ketoconazole and antimony concerning to *Leishmania* toxicity only in the intramacrophage parasite form. Despite the clinical efficacy of ketoconazole-antimony combination has been shown in the literature, our study is the first to describe the nature of ketoconazole-antimony interaction

against *L. (L.) amazonensis* amastigotes. Moreover, our results point out the need for future *in vivo* studies to confirm the nature of ketoconazole-antimony interaction and also to determine possible effective dosage regimens related to ketoconazole administration in association with the optimal lower dose of antimony.

**Keywords:** antimony; drug combination; isobologram; ketoconazole; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

## 1. Introduction

Parasitic protozoan diseases are commonly found in the poorest countries of the world and constitute one of the most widely spread human health problem [1]. These diseases are still neglected and unfortunately have received little attention from the pharmaceutical industry and scientific funding agencies [2]. Despite several therapeutic options are available to treat different forms of leishmaniasis, the current chemotherapy of cutaneous leishmaniasis usually relies on antimony-based drugs. However, these drugs produce many side effects and their toxicity associated to the drug-resistant strains have limited therapeutic uses of antimony-based agents [3].

Nowadays, the repositioning of agents already used clinically for other purposes represents an important therapeutic strategy to treat leishmaniasis. In this way, azole compounds, known to inhibit fungal sterol biosynthesis, have been an option described in the literature [4]. Another therapeutic strategy is the combination of drugs with different mechanisms of action. This approach has many therapeutic advantages, such as: increased therapeutic efficacy; decreased toxicity due to reduction in the effective dose; reduced development of drug resistance; and selective synergism against parasite target versus host [3,5,6]. In this respect, the association of antimony-based agents with ketoconazole has been successfully used in human against old world leishmaniasis [7]; however, nothing is known about the pharmacological nature of this association, as well as of its efficacy on new world *Leishmania* species, such as *L. (L.) amazonensis*. Therefore, in the present study we aimed at

investigating the in vitro antiparasitic efficacy and the pharmacological nature of antimony associated to ketoconazole against *L. (L.) amazonensis* amastigote.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), Giemsa stain modified solution, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), ketoconazole, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), potassium antimonyl tartrate trihydrate, RPMI 1640 medium, sodium dodecyl sulphate (SDS), penicillin and streptomycin were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). Heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil), Schneider's insect medium (LGC Biotecnologia, Brazil). All other reagents were analytical grade or superior. Ketoconazole was dissolved in a 1 M stock of dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20 °C. For experiments, new dilutions were prepared in culture medium to ensure that the DMSO concentration in culture medium did not exceed 0.1%.

### 2.2. Animals

The experiments were performed using female BALB/c mice supplied by the animal facility of the Federal University of Uberlândia (CBEA/UFU). The animals were housed in a room at 25°C with 12 h light/dark cycles and were provided free access to water and standard chow *ad libitum*. All the protocols used were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU; process n° 36/2013).

### 2.3. Parasites – promastigote and free amastigote

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 strain) promastigotes were cultured in Schneider's insect medium, pH 7.0, supplemented with 10% FBS, penicillin (100 UI.mL<sup>-1</sup>) and streptomycin (100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) at  $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Promastigotes used in all experiments were isolated from the stationary growth phase.

Free amastigotes were obtained from footpad of BALB/c mice (6-8 weeks old) previously infected with promastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/footpad) for 5 to 6 weeks [8]. These parasites were cultured in complete Schneider's insect medium, at  $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , ensuring that these parasites remained as axenic amastigote forms [9], and used within two days.

#### *2.4. Murine macrophage culture*

Murine macrophage cell line RAW264.7 was obtained from Rio de Janeiro Bank Cell and cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 5% FBS, penicillin ( $100 \text{ UI.mL}^{-1}$ ), streptomycin ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) in  $75\text{-cm}^2$  flasks. All cell cultures were done at  $37^\circ\text{C}$  in humidified air with 5%  $\text{CO}_2$ .

#### *2.5. Viability – Macrophage and free amastigote assays*

Viability assays in presence of drugs (antimony and/or ketoconazole) were carried on free amastigote forms and murine macrophages cell line RAW264.7, by colorimetric method based on mitochondrial oxidation of MTT reagent ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g/well}$ ) [10]. Free amastigotes ( $5 \times 10^5$  cells/well) and macrophages ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated with its respective medium alone (control) or containing ketoconazole ( $10^{-10}$  to  $10^{-3} \text{ M}$ ) or antimony ( $10^{-12}$  to  $10^{-3} \text{ M}$ ) for 48 hours. The 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of drugs on cell viability were then determined in each individual experiment considering control values as 100% of viability. This assay was carried out in triplicate and three independent experiments were performed. Cytotoxicity in RAW macrophages and activity against free amastigotes for ketoconazole and antimony were compared using the selectivity index (SI; ratio:  $\text{IC}_{50} \text{ RAW macrophage/ IC}_{50} \text{ parasite}$ ).

## 2.6. Infectivity – Intracellular amastigote assay

Macrophages ( $4 \times 10^5$ ) were placed in 24-well plates containing 13-mm diameter glass coverslips. Then, macrophages were infected with *L. (L.) amazonensis* free amastigotes isolated immediately before their use at 2:1 ratio (free amastigotes/macrophage). After 1h30, plates were washed with PBS to remove non-internalized amastigotes and RPMI medium alone (control) or containing drugs (13.125 to 420  $\mu$ M for ketoconazole and 0.156 to 5  $\mu$ M for antimony, both double serial dilutions) were added. Experiments were conducted at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 48 h. Cells on coverslips were fixed and stained with Giemsa stain modified solution for evaluation of the infection index. Infectivity index was defined as the average number of intracellular amastigotes in infected macrophages multiplied by percentage of infected macrophage; 100 cells per coverslip were blind counted. The IC<sub>50</sub> values of drugs on the infectivity were then determined in each individual experiment considering control values as 100% of infectivity. This assay was carried out in triplicate and two independent experiments were performed.

## 2.7. Isobologram

The interaction between ketoconazole and antimony was *in vitro* evaluated by using the modified isobologram method according to [5, 11], with modification. Briefly, to construct an isobologram and determine the type of interaction between drugs, the prerequisite is to know the potency and a form of dose-effect curve of each drug alone. The IC<sub>50</sub> values obtained in the experiments described in 'Viability – macrophage and free amastigote assays' and 'Infectivity – Intracellular amastigote assay' subsections were used to determine the maximum concentration of each drug in the combination assay ensuring that IC<sub>50</sub> was in the midpoint of curves, except for the intracellular amastigote assay; in this case, the IC<sub>50</sub> falls on the third point (from the maximum concentration used), that was not the midpoint, since highest concentrations of both drugs necessary to complete the curves were toxic for macrophages. The highest concentration of the solutions were prepared in

proportions of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 of ketoconazole and antimony, which were serially diluted to the ninth or sixth well of microplate for free amastigote or intracellular amastigote assays, respectively; this assay was carried out in duplicate (infectivity assay) or triplicate (viability assay) and two independent experiments were performed. Assays of combinations in each ratio allowed getting concentration-effect curves and therefore the  $IC_{50}$  for each combination ratio in relation to ketoconazole and antimony. Then, fractional inhibitory concentrations (FICs) at the  $IC_{50}$  level ( $FIC_{50}$ ) were calculated for both drugs, as follows:  $FIC_{50} = IC_{50} \text{ drugs in combination} / IC_{50} \text{ drug alone}$ .  $FIC_{50}$ s of each drug ratio (i.e, 4:1, 3:2, 2:3 and 1:4) were used to build isobolograms. It is important to mention that isobolograms constructed using FIC values are also known as normalized isobolograms [6]. Moreover, the sum of the  $FIC_{50}$ s for each ratio, also referred as combination index [6], was determined ( $\Sigma FIC_{50}s = FIC_{50} \text{ ketoconazole} + FIC_{50} \text{ antimony}$ ), and an overall mean of  $\Sigma FIC_{50}s$  ( $\bar{x} \Sigma FIC_{50}$ ) was calculated. Finally, the average of the  $\Sigma FIC_{50}$  was used to classify the nature of interaction: 'Synergy' defined as mean  $\Sigma FIC \leq 0.5$ ; 'Indifference/Additive' as mean  $\Sigma FIC > 0.5$  and  $\leq 2$ ; and 'Antagonism' as mean  $\Sigma FIC > 2$  [12].

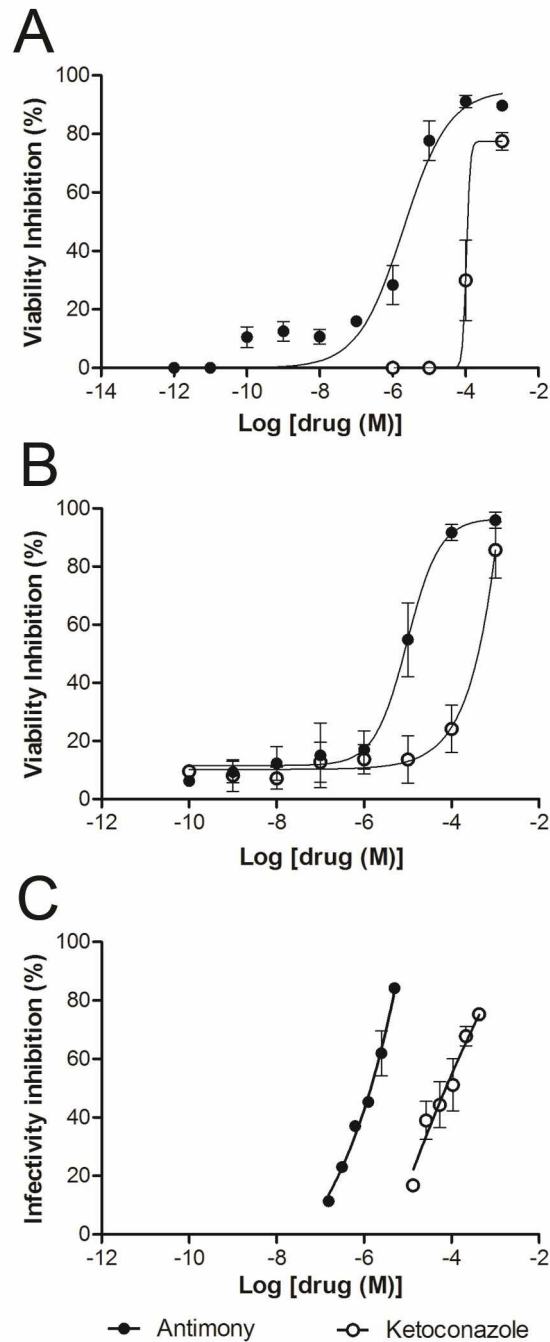
## 2.8. Statistical analysis

In the experiments, the 50% viability/infectivity inhibition values ( $IC_{50}$ ) were determined from the concentration-response curves by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), as follows:  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$  [13].  $IC_{50}$ ,  $FIC_{50}$ ,  $\Sigma FIC_{50}s$  and  $\bar{x} \Sigma FIC_{50}$  were calculated for each individual experiment and results were expressed as the mean and standard error of at least two independent experiments.

### 3. Results

#### *3.1. In vitro susceptibility of amastigotes and macrophages to individual drugs*

Both drugs caused a concentration-dependent inhibition on amastigote viability after 48 hours of incubation presenting IC<sub>50</sub> values of 105.5  $\mu$ M to ketoconazole and 2.5  $\mu$ M to antimony (Fig 1.A). Concentration-dependent inhibition on macrophages cell line RAW viability was also observed (Fig 1.B). Ketoconazole was much less toxic to macrophage than antimony (Fig 1B; IC<sub>50</sub> = 436.5 vs. 7.3  $\mu$ M; ketoconazole vs. antimony) presenting selectivity index of approximately 4.1 and 2.9 for ketoconazole and antimony, respectively. Both drugs also inhibited intracellular amastigotes in a concentration-dependent way, presenting IC<sub>50</sub> of 75 and 1.5  $\mu$ M for ketoconazole and antimony, respectively (Fig 1.C).



**Fig 1. Cytotoxic effects of isolated drugs (ketoconazole and antimony) on free amastigotes, murine macrophages cell line RAW264.7 and intracellular amastigotes.** Concentration-effect curves to ketoconazole (white points) and antimony (black points) against *L. (L.) amazonensis* free amastigotes **(A)**, murine macrophages **(B)** or intracellular amastigotes **(C)**. Data represent mean  $\pm$  SEM of two to three independent experiments performed in triplicate.



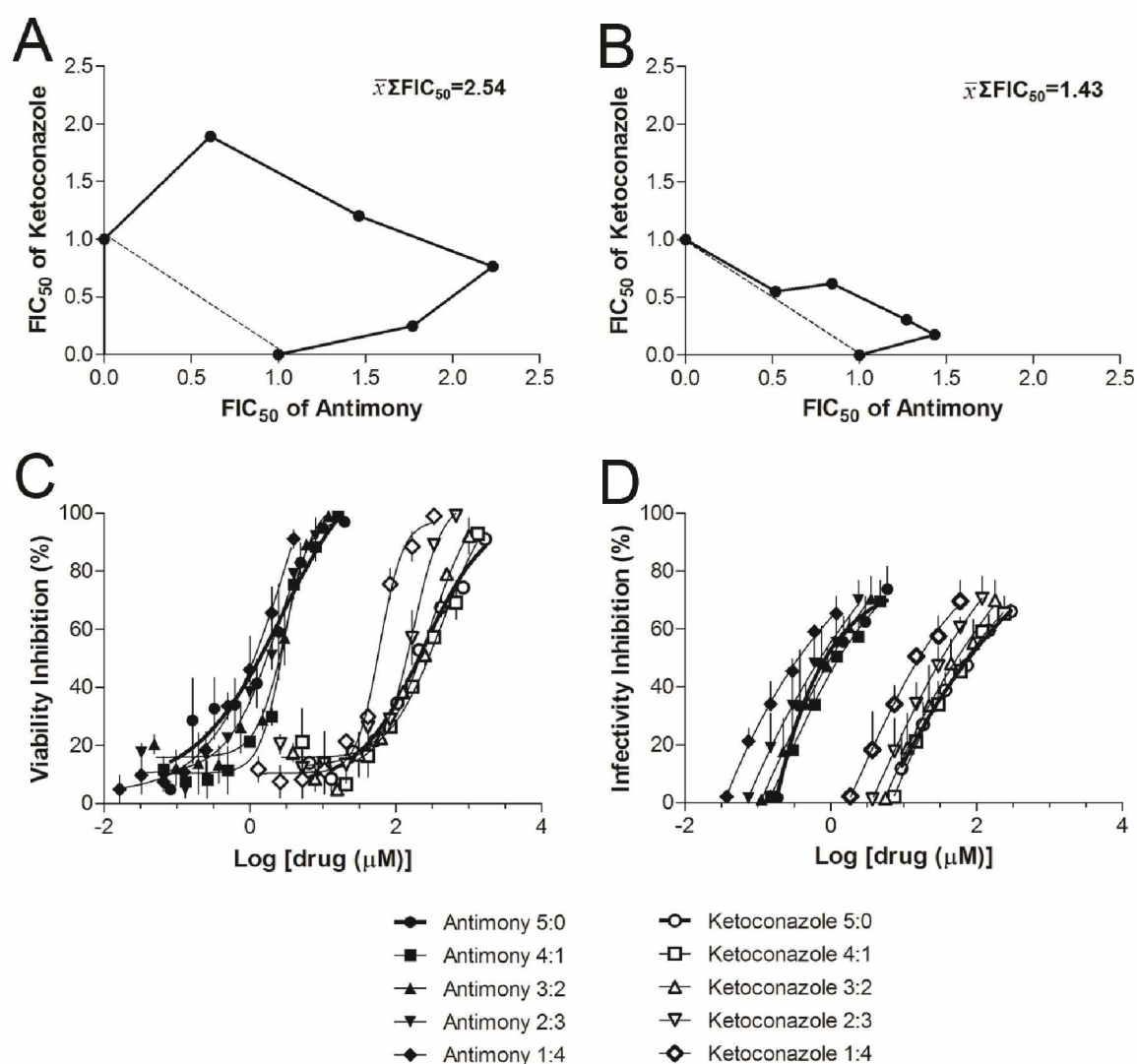
### *3.2. Effect of ketoconazole and antimony combination on amastigotes and isobologram*

This experimental approach allowed the determination of FIC<sub>50</sub> values for each combination. Overall mean of  $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> for free amastigotes assay ranged from 2.01 to 2.99 and the  $\bar{x}$   $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> was  $2.54 \pm 1.7$ . For intracellular amastigotes, the overall mean of  $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> ranged from 1.07 to 1.60 and the  $\bar{x}$   $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> was  $1.43 \pm 0.38$ . The IC<sub>50</sub>, FIC<sub>50</sub>,  $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> and  $\bar{x}$   $\Sigma$ FIC<sub>50</sub> values are given in Table 1 and the corresponding isobologram is shown in Figs 2A and 2B. The sigmoidal concentration-effect curves for each combination are present in Figs 2C and 2D.

**Table 1. IC<sub>50</sub>, FIC<sub>50</sub> and ΣFIC<sub>50</sub> of antimony-ketoconazole combination against *L. (L.) amazonensis* free and intracellular amastigotes**

Assay	Combination rate		Combined drugs					
			IC <sub>50</sub>		FIC <sub>50</sub>		Σ FIC <sub>50</sub>	ΣFIC <sub>50</sub>
	Antimony	Ketoconazole	Antimony	Ketoconazole	Antimony	Ketoconazole		
Free amastigotes	0	5	---	254.80 ± 60.20	---	---	---	
	1	4	0.97 ± 0.03	432.75 ± 94.05	0.61 ± 0.31	1.89 ± 0.81	2.50 ± 1.13	2.54
	2	3	2.29 ± 0.02	290.15 ± 2.95	1.46 ± 0.78	1.20 ± 0.27	2.66 ± 1.05	± 1.23
	3	2	3.13 ± 0.64	175.40 ± 36.00	2.23 ± 1.50	0.76 ± 0.32	2.99 ± 1.82	
	4	1	2.87 ± 0.20	60.38 ± 4.33	1.77 ± 0.87	0.24 ± 0.04	2.01 ± 0.91	
	5	0	2.22 ± 1.20	---	---	---	---	
Intracellular amastigotes	0	5	---	89.93 ± 14.77	---	---	---	
	1	4	0.37 ± 0.07	51.73 ± 21.54	0.52 ± 0.31	0.55 ± 0.14	1.07 ± 0.16	1.42
	2	3	0.88 ± 0.50	62.04 ± 47.59	0.84 ± 0.21	0.62 ± 0.42	1.46 ± 0.21	± 0.27
	3	2	0.98 ± 0.27	29.66 ± 17.64	1.27 ± 0.69	0.30 ± 0.14	1.57 ± 0.55	
	4	1	1.20 ± 0.44	17.15 ± 10.39	1.43 ± 0.67	0.17 ± 0.08	1.60 ± 0.59	
	5	0	1.27 ± 0.91	---	---	---	---	

Data expressed as mean ± SEM.



**Fig 2. Ketoconazole and antimony combination on *L. (L.) amazonensis* amastigotes.** Isobologram representing *in vitro* ketoconazole-antimony interaction against *L. (L.) amazonensis* free **(A)** or intracellular **(B)** amastigotes by a fixed-ratio method based on the IC<sub>50</sub>. Dashed line represents an ideal theoretical line for the additive effect; the  $\bar{x} \Sigma FIC_{50}$  for all interactions tested is also shown. Concentration-effect curves concerning the inhibition of *L. (L.) amazonensis* free **(C)** and intracellular **(D)** amastigotes by different combinations of antimony (black points) and ketoconazole (white points). Data represent mean  $\pm$  SEM of two independent experiments performed in triplicate.

#### 4. Discussion

Ketoconazole- and antimony-induced *Leishmania* toxicity appears to be related to the inhibitory effects of these drugs on different parasite metabolic pathways [4, 14]. Therefore, in the present study we tested the hypothesis that the combination of ketoconazole with antimony could improve the antileishmanial effect of these agents. It has been shown that  $\text{Sb}^{5+}$  should be reduced by the host cells to  $\text{Sb}^{3+}$ , the active form against parasites [15, 16]. Thus, since both intra-macrophage or free parasites were analyzed, and to avoid biases due to variability in macrophage drug conversion, antimonyl tartrate ( $\text{Sb}^{3+}$ ) was used instead meglumine antimoniate ( $\text{Sb}^{5+}$ ). Despite ketoconazole was less potent than antimony in inducing *L. (L.) amazonensis* free (ca. 40 times) and intracellular (ca. 50 times) amastigotes death *in vitro*, ketoconazole was much less toxic to macrophages than antimony. These data strongly suggest that this azole compound may be used against parasite-infected macrophages ensuring safety and efficacy.

Previous clinical trials studies showed the efficacy of ketoconazole alone in several *Leishmania* species around the world [17, 18, 19, 20], and the literature also pointed out that ketoconazole efficacy is comparable to those of antimonial based drugs [21, 22, 23]. However, to our knowledge, only one study focused on the combined therapy of ketoconazole and antimony. In that study it was observed that sodium stibogluconate (SSG) combined with ketoconazole was more effective than SSG alone to treat human cutaneous leishmaniotic lesions [7]. It is important to mention that the clinical study cited above was conducted in an Asian country where the common etiologic agents for cutaneous leishmaniasis are *L. major*, *L. tropica*, and *L. aethiopica*; however, in our study we focused on *L. (L.) amazonensis*, one of the typical species related to the disease in the America continent [1].

FIC is a widespread index used to study drug interactions and many critical values have been arbitrarily used to define the nature of drug combination [6, 24, 25, 26, 27]. The additivity range of 0.5 to 4.0 has been recommended by some expertise in the field [26] and employed in several studies concerning the interactions of antileishmanial drugs [11, 28, 29, 30]. However, based on the absence of *in vitro-in vivo* correlation studies, concerns

about the validity of this arbitrarily chosen FIC were raised, and a more symmetrical additivity range of 0.5 to 2.0 was suggested [12]. In the present study, two different experimental conditions were performed, including the amastigote-macrophage model, the gold standard assay for determining the intrinsic drug susceptibility of intracellular amastigotes [31]. Accordingly to the more symmetrical additivity range mentioned above, the  $\bar{x}$   $\Sigma$ FIC (1.42) observed in our study indicate an additive nature to ketoconazole-antimony combination against intra-macrophage amastigote. Moreover, the ketoconazole-antimony combination resulted in  $\Sigma$ FICmin and  $\Sigma$ FICmax of 1.07 and 1.60, respectively, values that are within the range observed in self-drug additive combination studies [12]. On the other hand, the  $\bar{x}$   $\Sigma$ FIC (2.54) for free amastigotes suggests an antagonistic interaction between ketoconazole and antimony. Despite we have no explanation for this discrepancy these results suggest altogether that the intracellular environment alter the nature of the interaction between ketoconazole and antimony against *L. (L.) amazonensis*. It is noteworthy that although experiments carried out with promastigotes or axenic amastigotes are easier to perform, to use intracellular amastigotes is clinically more relevant once this parasite form bear a closer similarity to the *in vivo* situation and correlate better with the treatment outcome [32, 33]. The use of lower doses of antimony associated with ketoconazole has the advantage of reducing side effects and limits the development of resistant strains, an emerging worldwide therapeutic problem. Therefore, considering the toxicity of antimony, its indifferent interaction with ketoconazole could be useful and should be confirmed *in vivo*.

Moreover, cutaneous lesion may become susceptible to colonization with a number of microorganisms, such as pathogenic or opportunistic fungi that could cause secondary infections [34]. Hence, beyond the suggestion, based on our *in vitro* data, that direct effects of the ketoconazole in combination with antimony on *Leishmania* death could occur *in vivo*, ketoconazole could also improve the leishmaniotic lesion due to its action on fungi.

It is important to mention that we analyzed the interaction just in relation to IC<sub>50</sub> level, since we obtained inhibition percentages nearby but less than 100% for some combination within the dilution range used; this fact preclude the determination of all the FIC<sub>90</sub> necessary for the data analysis. In attempt to

reach 100% of inhibition we increased the ketoconazole concentration, however, in this condition the drug precipitated. It is important to mention that analyzing data using only IC<sub>50</sub> level do not invalidate our results and interpretations, since the evaluation of FIC at IC<sub>90</sub> levels serve only as rebuttal [35, 36].

In conclusion, although the clinical efficacy of ketoconazole-antimony combination has been shown in the literature, our study is the first to describe the nature of ketoconazole-antimony interaction against *L. (L.) amazonensis* both in free and intracellular amastigotes. The additive interaction of ketoconazole-antimony combination in the intra-macrophage parasite form points out that future *in vivo* experiment should be conducted to confirm this interaction and also to determine possible effective dosage regimens related to ketoconazole administration in association with the optimal lower dose of antimony.

## **Acknowledgments**

We thank Prof. Fábio de Oliveira (Laboratório de Biologia Molecular e Celular – ICBIM/UFU) for gently gift macrophage cell line and providing laboratory facilities.

## References

1. Elmahallawy EK, Martínez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari JMN et al. Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2014; 8, 8: 961-972.
2. Chaudhary K, Ross D. Protozoan genomics for drug discovery. Nat Biotechnol. 2005; 23: 1089-1091.
3. Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. Mol Biol Int. 2011; 2011: 1-23.
4. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Curr Top Med Chem. 2011; 11: 2060-2071.
5. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48, 11: 4097-4102.
6. Chou T. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 2006; 58: 621-681.
7. El-Sayed M, Anwar AE. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010; 24: 335-340.

8. Nunes DCO, Figueira MNRF, Lopes DS, de Souza DLN, Izidoro LF, Ferro EA, et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase  $A_2$  from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Parasitol. 2013; 140, 7: 844-854
9. Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. Trends Parasitol. 2001; 17, 3: 150-153.
10. Mosmann TJ. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Immunol Methods. 1983; 65: 55-63.
11. Mesquita JT, Tempone AG, Reimão JQ. Combination therapy with Nitazoxanide and Amphotericin B, Glucantime<sup>®</sup>, Miltefosine and Sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. Acta Trop. 2014; 130: 112-116.
12. Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigates*. Antimicrob A Chemoter. 2010; 54 (2): 602-609.
13. Zhang G, Cvijic ME. Screening and characterization of G-protein-coupled receptor ligands for drug discovery. In: Seethala R, Zhang. Handbook of drug screening. New York. USA: Informa Healthcare; 2009, chapter 6, pp. 142.
14. Souza W, Rodrigues JCF. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009: 1-19.



15. Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J.* 1943; 37,198-209.
16. Hansen C, Hansen EW, Hansen HR, Gammelgaard B, Stürup S. Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS. *Biol Trace Elem Res.* 2011; 144: 234-243.
17. Urcuyo FG, Zaias N. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. *Pharmacol Ther.* 1982; 21: 414-416.
18. Jolliffe DS. Cutaneous leishmaniasis from Belize – treatment with ketoconazole. *Clin Exp Dermatol.* 1986; 11: 62-68.
19. Alsaleh QA, Dvorak R, Nanda A. Ketoconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Kuwait. *Int J Dermatol.* 1995; 34,7: 495-497.
20. Boecken G, Sunderkotter C, Bogdan C, Weitzel T, Fischer M, Muller A, et al. Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011; 9, 8: 1-51.
21. Saenz RE, Paz H, Berman JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med.* 1990; 89: 147-155.
22. Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajón JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibugluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis.* 1992; 165: 528-534.
23. Salmanpour R, Handjani F, Nouhpisheh MK. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate

- (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. J Dermatolog Treat. 2001; 12: 159-162.
24. Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. J Infect Dis. 1978; 137 (2): 122-130.
25. Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. J Antimicrob Chemother. 1983; 11:427-433.
26. Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meis JFGM, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. Antimicrob A Chemoter. 2002; 46 (2): 702-707.
27. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003; 52: 1.
28. Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine paramomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 850-854.
29. Shakya N, Sane SA, Vishwakarma P, Bajpai P, Gupta S. Improved treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combinations of ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator – Pricoliv. Acta Trop. 2011; 119: 188-193.
30. Morais-Teixeira E, Gallupo MK, Rodrigues LF, Romanha AJ, Rabello A. *In vitro* interaction between paramomycin sulphate and four drugs with

- leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. J Antimicrob Chemother. 2014; 69: 150-154.
31. Maes L, Cos P, Croft S. The relevance of susceptibility tests, breakpoints and markers. In: Ponte-Sucre, A, Diaz E, Padřon-Nieves, M, editors. Drug resistance in *Leishmania* parasites. Vienna, Austria: Springer; 2013. pp. 407-429.
  32. Callahan HI, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. Antim A Chemoter. 1997, 41 (4): 818-822.
  33. Le Bras, J, Secor, WE. Susceptibility test methods: parasites. In: Versalovic, J, Karroll, KC, Funke, G, Jorgensen, JH, Landry, ML, Warnock, DW, editors. Manual of clinical microbiology. Washington, USA: ASM Press; 2011. pp.2113-2117.
  34. Fontes CO, Carvalho MAR, Nicoli JR, Hamdan JS, Mayrink W, Genaro O, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms recovered from cutaneous lesions of human American tegumentar leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. J Med Microbiol. 2005; 54: 1071-1076.
  35. Pandharkar T, Zhu X, Mathur R, Jiang J, Schmittgen TD, Shaha C, Werbovetz KA. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the Arylimidamine DB766: azole interactions and role of CYP5122A1. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58, 8: 4682-4689.
  36. Trinconi CT, Reimăo JQ, Yokoyama-Yasunaka JKU, Miguel DC, Uliana SRB. Combination therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58, 5: 2608-2613.

# Capítulo 3

*Manuscrito 2*

*In vitro* **cytostatic action of ketoconazole on *Leishmania* (*Leishmania*)  
*amazonensis* promastigotes**

Débora C. O. Nunes<sup>a,b,c</sup>, Mônica S. Costa<sup>a</sup>, Luiz B. Bispo-da-Silva<sup>b</sup>, Eloísa A. V. Ferro<sup>d</sup>, Mariana A. P. Zóia<sup>a</sup>, Luiz Ricardo Goulart <sup>a</sup>, Renata S. Rodrigues<sup>a,c</sup>, Veridiana M. Rodrigues<sup>a,c</sup>, Kelly A. G. Yoneyama<sup>a \*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil; <sup>b</sup> Área de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil; <sup>c</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil; <sup>d</sup> Área de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil.

**\*Corresponding author:** Prof. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama

Phone: +55 34-3225-8436 r 22 Fax: +55 34-3225-8436 r 24.

Laboratory address: Para Avenue, 1720. CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brazil. E-mail: [kelly.tudini@ufu.br](mailto:kelly.tudini@ufu.br).

**Abstract.** *Leishmania* parasites cause the leishmaniasis that ranges from self-limiting cutaneous infections to more serious forms of the disease. The search for potential drug targets focusing on biochemical and metabolic pathways revealed the sterol biosynthesis inhibitors (SBIs) as a promissory approach. In this class of inhibitors is found the ketoconazole, a classical inhibitor 14 $\alpha$ -methysterol 14-demethylase. The aim of this study was better understand the biological response of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes at cellular level to ketoconazole treatment. The study demonstrated for the first time the action of the SBI ketoconazole on mitochondrion, autophagic vacuoles, cell death pathway and cell cycle of *L. (L.) amazonensis* parasites by fluorescent methodologies. Results strongly suggest that ketoconazole acts as cytostatic agent.

**Keywords:** autophagy; cell cycle; ketoconazole; *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*; mitochondrion.

## 1. Introduction

*Leishmania* spp. cause the leishmaniasis, a spectrum of diseases that ranges from self-limiting cutaneous infections to more serious disseminating diffuse cutaneous, mucocutaneous and visceral forms of the disease (Vannier-Santos et al., 1995). *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasite is an important causative agent of human cutaneous leishmaniasis and exhibits a wide spectrum of clinical disease (Barral et al., 1991). Currently available treatments for leishmaniasis present contraindications, high toxicity and cost, difficulties of healing, and they have also been related to development of parasite resistance (Oliveira et al., 2011; Rama et al., 2015; Sundar and Chakravarty, 2015). These problems could be solved, at least partially, by searching specific inhibitors of biochemical and metabolic targets that are essential for the parasite survival, with minimal or no effects on the host organisms (Singh et al., 2012).

Unlike plasma membranes of animals, which contain cholesterol as the major sterol, certain protozoa as trypanosomatids, yeast and fungi present ergosterol, which plays role in regulating membrane fluidity and permeability (Roberts et al., 2003; Arora et al., 2004; Lepesheva et al., 2011), besides serving as precursors for biologically active molecules that regulate growth and development processes (Lepesheva et al., 2011). Synthesis of sterols requires removal of the 14 $\alpha$ -methyl groups from sterol precursors; this reaction is catalyzed by a microsomal cytochrome P<sub>450</sub>, the sterol 14 $\alpha$ -methysterol 14-demethylase (CYP51) (Roberts et al., 2003; Buckner and Urbina, 2012). In this regard, the sterol biosynthetic pathway appears as a potential drug target and the sterol biosynthesis inhibitors (SBIs) certainly represent a promising approach.

The SBIs evaluated on trypanosomatids are classified into three groups: the allylamines that inhibit squalene-2,3-epoxidase; the azasterols that block the C-24 alkylation reaction; and the imidazole and triazole compounds that inhibit 14 $\alpha$ -methylsterol 14-demethylase (Roberts et al., 2003). Among SBIs, ketoconazole, commonly used as antifungal, has been shown to produce minimal side effect on vertebrate host. More interestingly, clinical trials studies have showed the efficacy of ketoconazole in leishmaniasis (Urcuyo and Zaias,

1982; Jolliffe, 1986; Saenz et al., 1990; Navin et al., 1992; Alsaleh et al., 1995; Salmanpour et al., 2001; El-Sayed and Anwar, 2010; Boecken et al., 2011;). However, despite leishmaniasis has been treated by non-*Leishmania* drugs, such as ketoconazole, the exact mechanism of action of these drugs on *Leishmania* spp. is not clearly understood (Singh et al., 2012). Therefore, the aim of the present study was to examine and better understand the biological response of *L. (L.) amazonensis* promastigotes at cellular level to the classical SBI ketoconazole and we demonstrated, for the first time, the action of the ketoconazole on mitochondrion, autophagic vacuoles, cell death pathway and cell cycle of *L. (L.) amazonensis* parasites.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Chemicals*

Ketoconazole, dimethylsulfoxide (DMSO), penicillin, streptomycin, rhodamin 123, monodansylcadaverine (MDC) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), annexin V FITC apoptosis detection kit from BD Pharmingen, heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) from Cultilab (Brazil) and Schneider's insect medium from LGC Biotechnologia (Brazil). All other reagents were analytical grade or superior. Ketoconazole was dissolved in a 1 M stock of dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. For experiments, new dilutions were prepared in culture medium to ensure that the DMSO concentration in culture medium did not exceed 0.1%.

### *2.2. Promastigote culture*

*Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 strain) promastigotes were cultured in Schneider's insect medium, pH 7.0, supplemented with 10% FBS, penicillin (100 UI.mL<sup>-1</sup>) and streptomycin (100 µg.mL<sup>-1</sup>) – complete Schneider's insect medium – at 23 ± 0.5°C in B.O.D chamber.

### 2.3. Antiproliferative assay

In order to evaluate the ketoconazole effect on cellular proliferation of *L. (L.) amazonensis* promastigotes, parasites ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>) were cultured in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks containing complete Schneider's insect medium with progressively higher concentrations of drug ( $10^{-10}$  to  $10^{-3}$   $\mu$ M). At 24, 48, 72, and 96 hours after incubation with drug, the number of promastigotes was determined by blind counting in a Neubauer chamber. Each assay was carried out in triplicate and three independent experiments were performed. The EC<sub>50</sub> values with 95% confidence limits were determined by GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). For cytotoxic versus cytostatic assay, parasites ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>) were cultured with complete Schneider's insect medium for 48 hours. Parasites were treated with 10  $\mu$ M ketoconazole and the number of promastigotes was determined by counting in a Neubauer chamber for three consecutive days using Trypan blue stain. Each assay was carried out in triplicate and three independent experiments were performed.

### 2.4. Evaluation of mitochondrial damage

The fluorescent stain Rhodamine 123 was used to assess mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of promastigotes. Initially, parasites ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>) were treated or not (control) with 10  $\mu$ M ketoconazole for 24, 48 and 72 hours. Aliquots were incubated with Rhodamine 123 (15  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) for 15 minutes at room temperature protected from light. Subsequently, the parasites were washed twice with PBS, fixed in paraformaldehyde 1% in cacodylate buffer and washed twice with PBS. The cell population analysis was performed with a flow cytometer (BD Accuri C6 – Biosciences, CA, USA) and a total of 10,000 events were acquired in the region previously established as corresponding to the parasites. Three independent experiments were performed.



## *2.5. Evaluation of autophagic vacuoles*

The monodansylcadaverine (MDC) labeling was carried out to evaluate autophagic vacuoles formation. Promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>, log phase) were incubated or not (control) with ketoconazole 10  $\mu$ M for 24, 48 and 72 hours. After treatment, parasites were added to 100  $\mu$ M MDC for 2 hours in the dark. In the next step, the parasites were washed twice with PBS, fixed in paraformaldehyde 1% in cacodylate buffer, washed twice with PBS, mounted on microscope slides and analyzed by a fluorescence microscope (Zeiss LSM510, Germany) at excitation wavelength 358 nm and emission wavelength 463 nm. Two independent experiments were performed.

## *2.6. Morphological and ultrastructural analysis*

For the purpose of evaluating ultrastructural changes, parasites were analyzed by transmission electron (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). For TEM, promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>, log phase) were incubated for 72 hours in presence or absence (control) of ketoconazole 10  $\mu$ M. After treatment, parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, for 24 hours at 4°C, washed in PBS and post-fixed for 1 hour in a solution containing 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) and 0.8% potassium ferrocyanide in PBS. The cells were washed in PBS, dehydrated in a graded acetone series and embedded in resin. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate then observed under a Zeiss EM 109 transmission electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). For SEM, promastigotes treated or not with ketoconazole 10  $\mu$ M for 72 hours were dehydrated in ethanol, critical point-dried in CO<sub>2</sub>, mounted in stubs, sputtered with thin gold layer and observed under a scanning electron microscope.

## *2.7. Cell death analysis*

Promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>) were incubated for 72 hours in the absence (negative control) or presence of ketoconazole (10  $\mu$ M); positive

control was parasites incubated with sodium hypochlorite 0.2% for 30 minutes. Subsequently, the parasites were incubated with a specific binding buffer containing annexin V-FITC and 2  $\mu\text{g/mL}$  propidium iodide (BD Bioscience, Brazil) for 15 minutes at 25°C, protected from light, according to manufacture's instructions. After incubation the parasites were washed and fixed for 10 minutes with 1% paraformaldehyde in cacodylate buffer. The cell population analysis was performed with a flow cytometer (BD Accuri C6 – Biosciences, CA, USA) and a total of 10,000 events were acquired in the region previously established as corresponding to the parasites. The percentages of apoptotic cells were determined using the FlowJo v10.0.7 software.

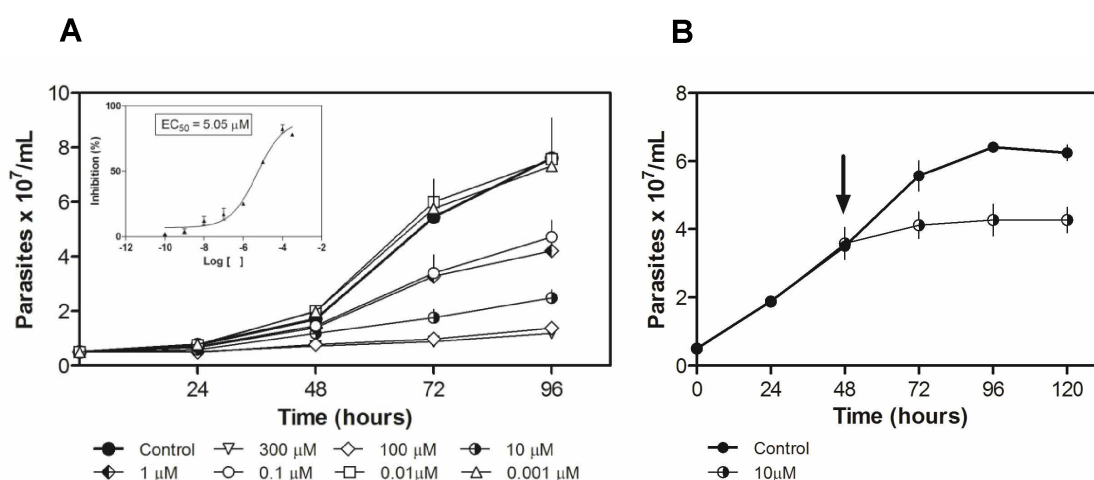
## *2.8. Cell cycle analysis*

Initially, parasites ( $5 \times 10^6$  cells. $\text{mL}^{-1}$ ) were washed three times with PBS and then incubated with medium containing 0.04% FBS overnight. Under these conditions, cells were arrested in G0/G1 as determined by flow cytometry analysis. After serum starvation (synchronization), the low serum (0.04% FBS) medium was removed and promastigotes ( $5 \times 10^6$  cells. $\text{mL}^{-1}$ , log phase) were incubated for 72 hours in the absence (control) or presence of ketoconazole (10  $\mu\text{M}$ ) in medium containing 10% FBS. After incubation, parasites were washed and resuspended in a solution of 70% ice-cold ethanol in PBS and fixed overnight at 4°C. Subsequently, the parasites were incubated with 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  propidium iodide and 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  RNase A in PBS for 45 minutes at 37°C, protected from light. The cell population analysis was performed with a flow cytometer (BD Accuri C6 – Biosciences, CA, USA) and a total of 10,000 events were acquired in the region previously established as corresponding to the parasites. FlowJo v10.0.7 software was used to analyze percentages of each phase of the cell cycle: G0-G1, S and G2-M.

### 3. Results

#### 3.1. Antiproliferative and cytostatic effects

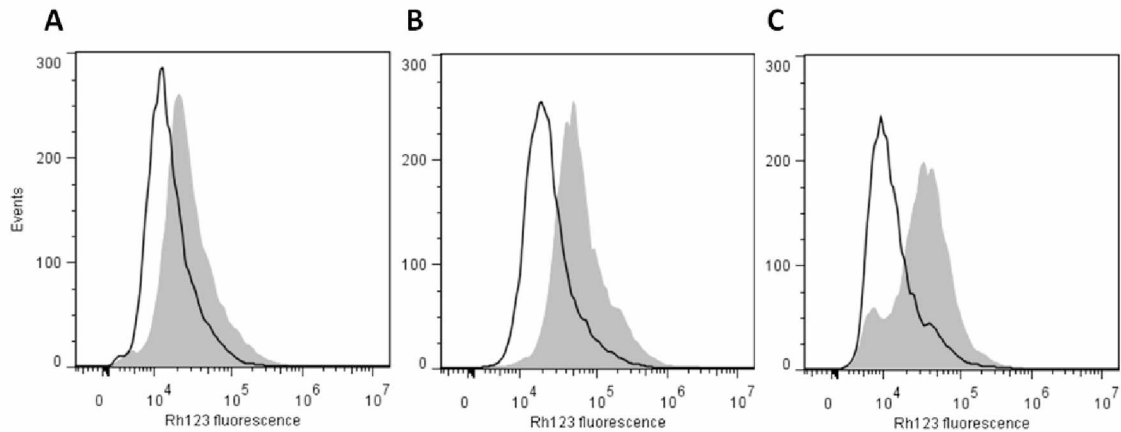
Ketoconazole induced an antiproliferative effect on the *L. (L.) amazonensis* promastigotes, causing concentration- and time-dependent parasite growth inhibition (Figure 1. A:EC<sub>50</sub> after 72hours: 5.0  $\mu$ M). When incubated with ketoconazole (2 x EC<sub>50</sub> of 72 hours = 10  $\mu$ M), 48 hours after parasites have been cultured in absence of drug, ketoconazole stopped their growth without decrease parasites viability; on the other hand, parasites controls exhibited exponential growth (Figure 1.B).



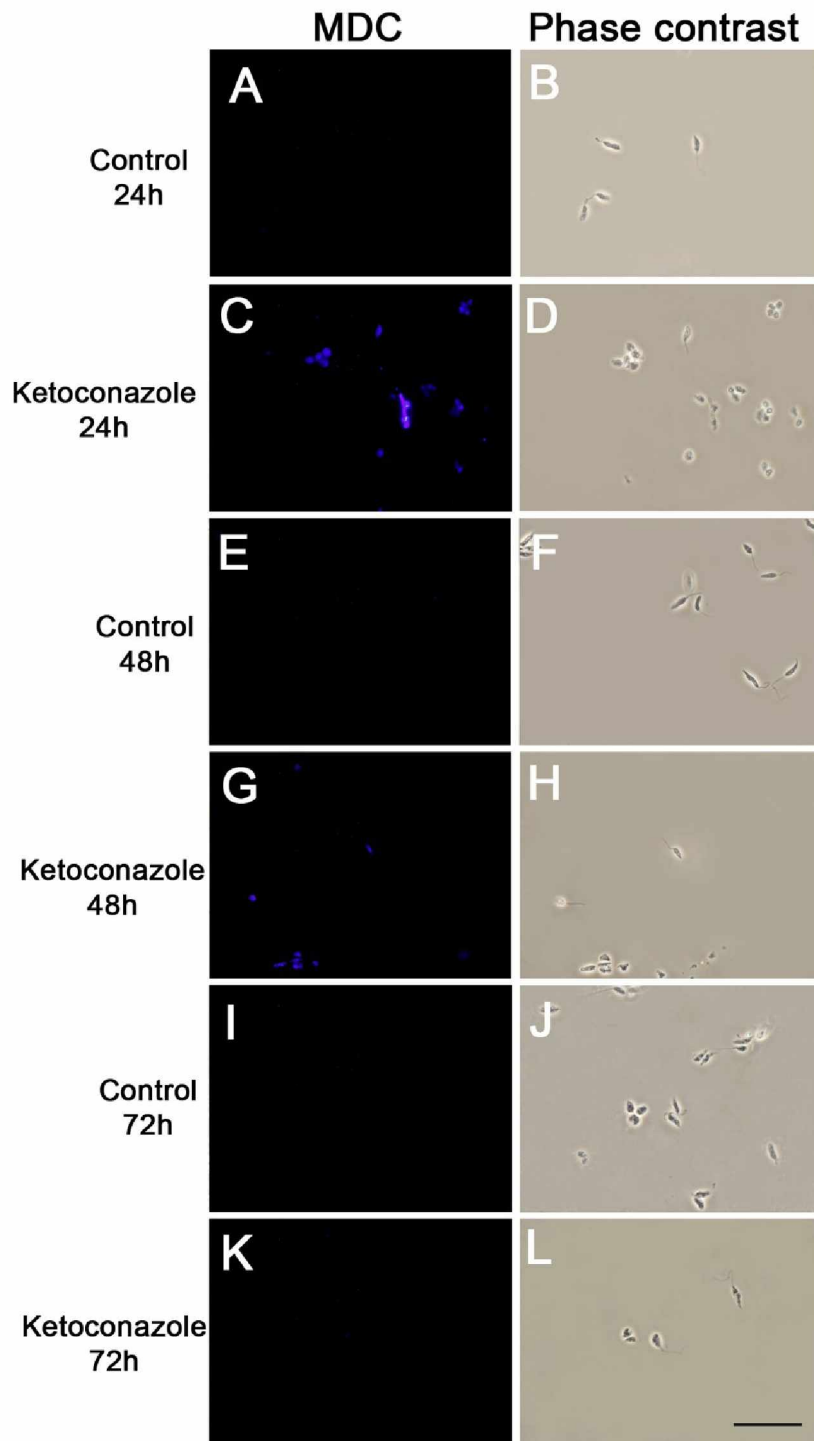
**Figure 1.** *L. (L.) amazonensis* promastigotes proliferation. **(A)** The concentration-response curves of ketoconazole on parasite proliferation after 24, 48, 72 and 96 hours of treatment. The smaller graph displays the respective EC<sub>50</sub> value for 72 hours. The cell density was obtained by direct counting in a Neubauer chamber of fixed cells. **(B)** Cytotoxic versus cytostatic assay on parasite in presence of 10  $\mu$ M ketoconazole. The arrow indicates the cultivation time in which the drug was added to the medium. The viable cell density was obtained by direct counting in a Neubauer chamber using Trypan blue stain.

#### 3.2. Evaluation of mitochondrial transmembrane potential and autophagic vacuoles formation

Ketoconazole increased mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) measured by Rhodamine 123 (Rho123) dye, as suggested by the time-dependent increase in fluorescence induced by the drug (Figure 2). Despite autophagic vacuoles were observed 24 and 48 hours after drug incubation, they were not observed 72 hours after drug administration (Figure 3).



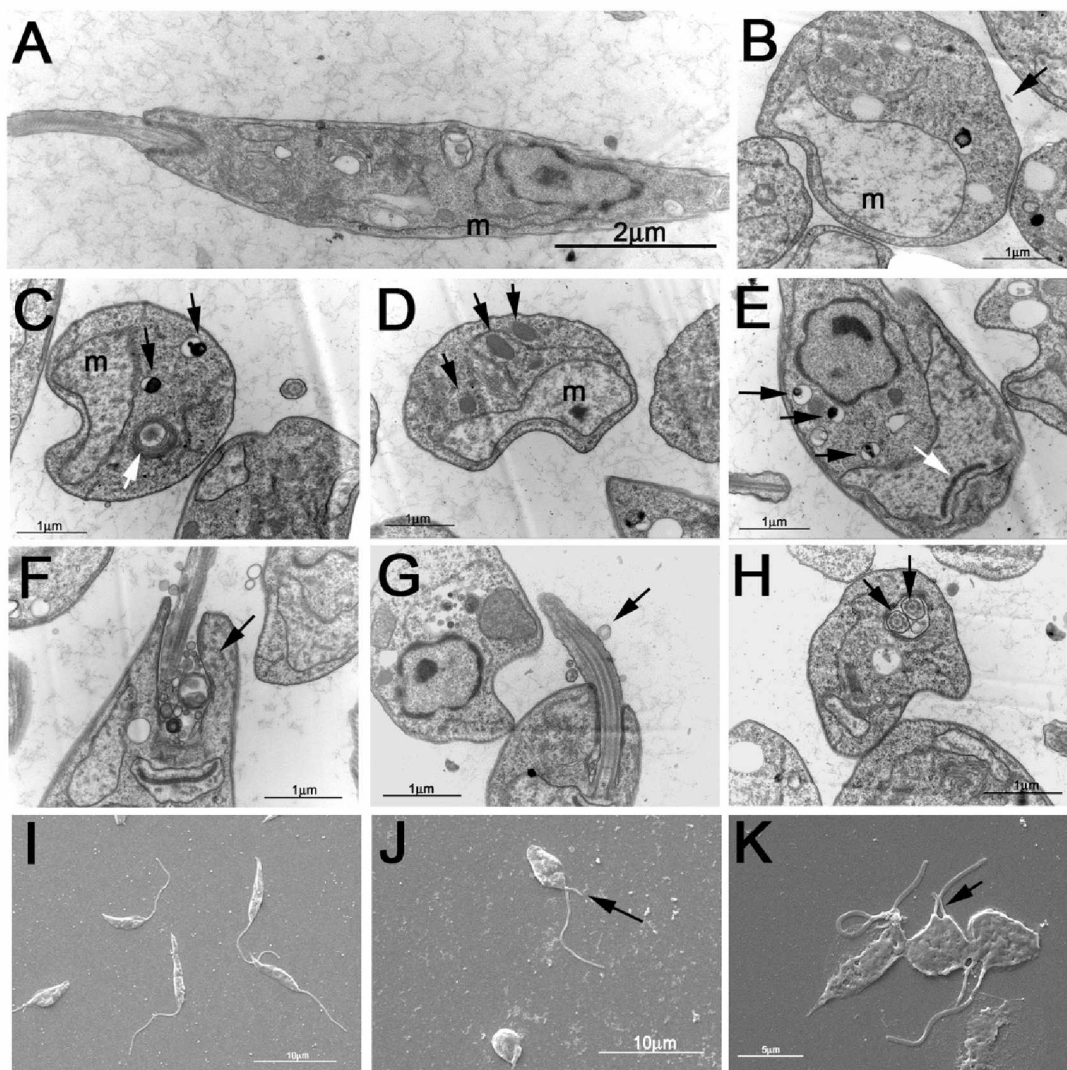
**Figure 2. Mitochondrial damage induced by ketoconazole on *L. (L.) amazonensis*.** **A-C.** Flow cytometry histograms displaying changes in mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) measured by Rhodamine 123 (Rh123) in different times of drug exposure: 24 (**A**), 48 (**B**) and 72 (**C**) hours. Control: black line; Ketoconazole-treated: grey.



**Figure 3. Ketoconazole-induced autophagic vacuoles on *L. (L.) amazonensis* promastigotes.** Panels **A-B**, **E-F** and **I-J**, parasites incubated with culture medium (control parasite) for different times: 24 (**A-B**), 48 (**E-F**) and 72 (**I-J**) hours. Panels **C-D**, **G-H** and **K-L**, parasites incubated with 10  $\mu$ M ketoconazole for different times: 24 (**C-D**), 48 (**G-H**) and 72 (**K-L**) hours. Panels **A**, **C**, **E**, **G**, **I** and **K**, MDC labeling. Panels **B**, **D**, **F**, **H**, **J** and **L**, phase contrast. Barr: 10  $\mu$ m.

### 3.3. Morphological and ultrastructural analysis

Ultrastructural analysis of control cells exhibited normal parasites with typical elongate and thin bodies, long and single flagella and mitochondrion (Figure 4.A; 4.I). Ketoconazole-treated cells presented several morphological changes, such as: rounded up shape, frequent truncated and/or double flagella, significant mitochondrial swelling, increased accumulation of lipid droplets and acidocalcisomes, presence of multivesicular bodies, intense activity of flagellar pocket (endo/exocytose) and changes in appearance of cell membrane (Figure 4.B-H; J-K).

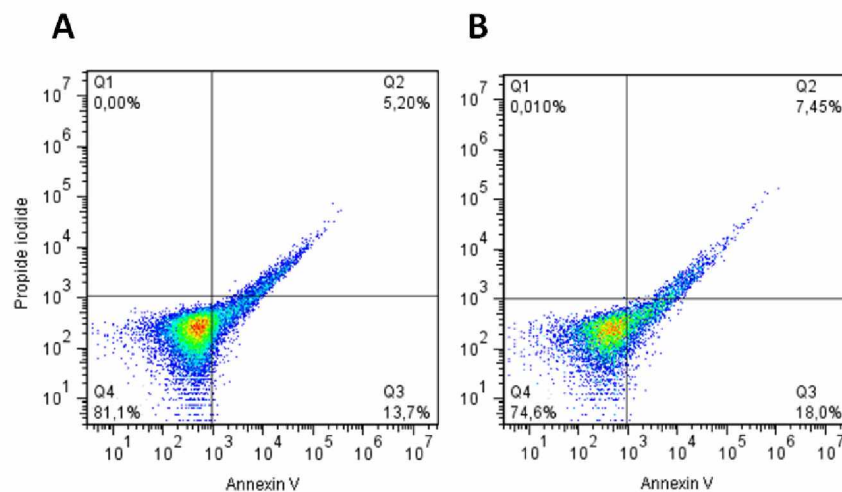


**Figure 4 – Ultrastructural and morphological alterations observed in *L. (L.) amazonensis* promastigotes treated with ketoconazole.** Transmission Electron Microscopy (TEM): **A.** Control parasite. **B – H.** Ketoconazole-treated parasites; alterations are indicated by arrows: **B.** Mitochondrial swelling and

intact cell membrane (black arrow); **C.** Vesicles associated to Golgi complex (white arrow) and acidocalcisomes (black arrows); **D.** Lipid droplets (black arrows); **E.** Acidocalcisomes (black arrows) and normal kinetoplast (white arrow); **F.** Intense activity of endo/exocytosis at flagellar pocket (black arrow); **G.** Flagellar alterations (stumpy, detached membrane) (black arrow); **H.** Double flagella at flagellar pocket (black arrows). Scanning Electron Microscopy (SEM): **I.** Control parasite. **J-K.** Ketoconazole-treated parasites – Double flagella (black arrow) and changes in appearance of cell membrane. m = mitochondrion.

### 3.4. Cell death analysis

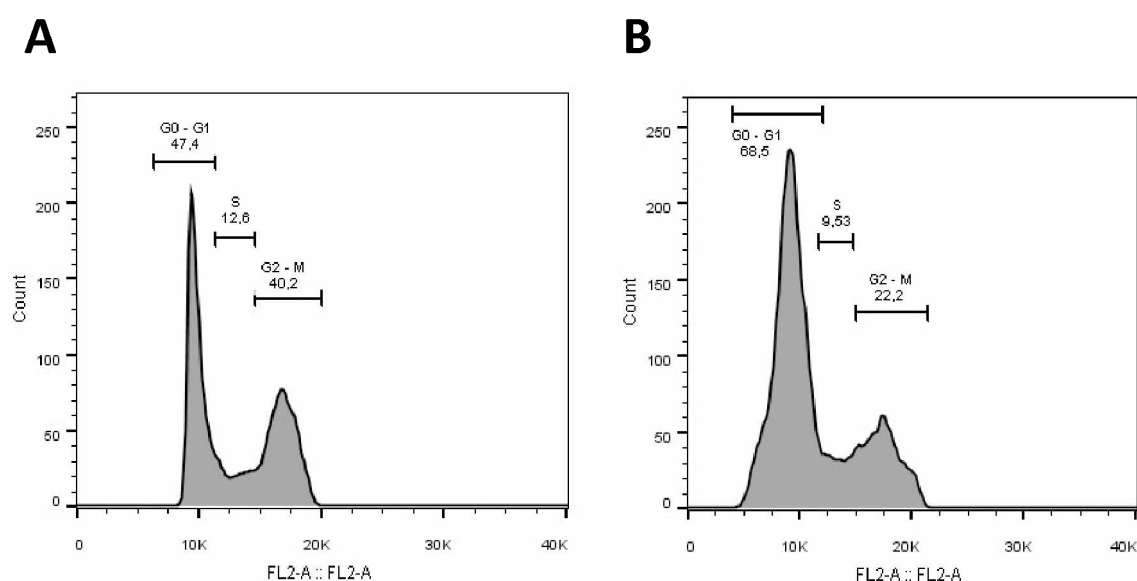
This assay revealed that ketoconazole was not capable to induce neither apoptosis nor necrosis. The dot plot analysis showed that distribution of viable, necrotic and apoptotic cells after treatment with ketoconazole for 72 hours was similar to that observed in untreated parasites (negative control) (Figure 5).



**Figure 5. Apoptosis/Necrosis assay by flow cytometry.** Representative dot plots for annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining in *L. (L.) amazonensis* promastigotes incubated with: **(A)** medium, negative control; **(B)** ketoconazole (10  $\mu$ M; 72 hours). Lower left quadrant, viable cells (negative for both Annexin V-FITC and PI); lower right quadrant, apoptotic cells (positive for Annexin V-FITC and negative for PI); upper right quadrant, necrotic cells (positive for both Annexin V-FITC and PI).

### 3.5. Cell cycle analysis

The effect of ketoconazole on cell cycle of *L. (L.) amazonensis* promastigotes determined by flow cytometry (Figure 6) revealed that treatment induced increase of the number of parasites in G0-G1 (from 47.4 to 68.5%) and decrease the percentage of cells in S (from 12.6 to 9.56%) and G2-M (from 40.2 to 22.2%). In other words, the treatment induced cells to left the synthesis/G2-mitosis phase and arrest in G0-G1.



**Figure 6. Cell cycle assay by flow cytometry.** Typical DNA content frequency histograms representing *L. (L.) amazonensis* promastigotes incubated with: **(A)** medium, negative control; **(B)** ketoconazole (10  $\mu$ M; 72 hours). The cells were stained with propidium iodide (PI) and fluorescence of the PI-stained cells was measured. Cell cycle analysis provides the estimate of percentage of cells in G0-G1, S and G2/M phases of the cycle.

## 4. Discussion

In our study, ketoconazole inhibited *L. (L.) amazonensis* promastigote growth in a concentration- and time-dependent manner. Despite we have not evaluated the exact cellular target involved in ketoconazole-induced effect, it is well known that ketoconazole is a potent inhibitor of 14 $\alpha$ -demethylase, an



enzyme committed to sterols biosynthesis (Souza and Rodrigues, 2009). Since sterols are constituents of cellular membranes essential for their normal structure and function, such as parasitic growth and viability (Roberts et al., 2003; Souza and Rodrigues, 2009), ketoconazole-induced 14 $\alpha$ -demethylase inhibition could account for its inhibitory effect on *L. (L.) amazonensis* promastigote. Our observations not only corroborate previous data from the literature showing potent *in vitro* activities of SBIs against tripanosomatids (Berman et al., 1984; Lazardi et al., 1990; Rodrigues et al., 2002; Rodrigues et al., 2005), but also suggest that the susceptibility of different *L. amazonensis* strains to ketoconazole is similar. Indeed, ketoconazole has also been shown to arrest *L. amazonensis* (MHOM/BRf75/Josefa strain) growth (Vannier-Santos et al., 1995), similarly to that described here against *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 strain). It is important to mention that SBIs effects on extracellular *L. amazonensis* parasites appear to be more gradual than that observed with the intracellular form; this SBIs effects profile allows a more detailed study of the events in the promastigote form (Vannier-Santos et al., 1995), justifying our choice to study the effects of ketoconazole on *L. amazonensis* extracellular form.

Our morphological and ultrastructural results revealed rounded up shape, alterations in cell membrane morphology (evidenced by SEM), significant mitochondrial swelling, increased accumulation of lipid droplets and acidocalcisomes, presence of multivesicular bodies, intense activity of flagellar pocket and frequent truncated and/or double flagella. Literature data have also shown that SBIs induce dramatic alterations in the ultrastructure of several tripanosomatid mainly in the mitochondrion-kinetoplast complex, the endoplasmic reticulum, the Golgi complex, nucleus, the contractile vacuole, in the plasma membrane covering the cell body and the flagellum and induce multivesicular structures and lipidic inclusions (Souza and Rodrigues, 2009). Specifically, 0.1  $\mu$ M ketoconazole (72 or 96 hours of treatment) against *L. amazonensis* (MHOM/BRf75/Josefa strain) was able to induce multivesicular bodies (MVB) at the *trans* portion of the Golgi apparatus and in close association with organelles such as mitochondrion. Other damages included the presence of altered patterns of mitochondrial cristae, collapsed endoplasmic reticulum, forming myelin-like structures, large amounts of membrane vesicles

and myelin-like figures within the flagellar pocket (Vannier-Santos et al., 1995). Since the outstanding parasite ultrastructural changes induced by ketoconazole treatment suggested mitochondrial damage and evidenced the presence of vacuoles, we also evaluated the physiological alterations that ketoconazole could induce in mitochondria function, as well as whether those vacuoles corresponded to autophagic compartments. In order to confirm the changes suggested by TEM, it was used the concentration of  $2 \times EC_{50}$  (for 72 hours of treatment) since previous studies analyzing the response of *Trypanosoma cruzi* to ketoconazole and lovastatin suggested that morphophysiological alterations leading to cell death depends on the type and intensity of the stimulus (treatment time and drug concentration) (Kessler et al., 20013). Moreover, fluorescence techniques were used since these methods present several advantages for instance intrinsic sensitivity, suitable time resolution, non-invasive nature and minimum perturbation (Arora et al., 2004).

Several functions are attributed to autophagy including: survival mechanism under starvation and stress conditions; removal of damaged, abnormal or redundant cellular constituents; remodeling of a cell's morphology and metabolic machinery during changes of nutritional conditions or developmental differentiation; alongside apoptosis and necrosis, plays a role in cell death (Brennan et al., 2011). Probably, the treatment of *L. (L.) amazonensis* promastigotes with ketoconazole causes a stress in the cell, especially early after the treatment (24 and 48h). Thus, the presence of autophagic vacuoles might represent an adaptive response of parasite to treatment. Initially, parasites would resort to autophagic vacuoles in attempt to remodel/remove abnormal cellular constituents.

Several biochemical studies have indicated that mitochondria morphology is influenced by the metabolic state of the cell, cell cycle, cellular development and differentiation (Johnson et al., 1980). Literature data have also shown that the mitochondrion is one of the first organelles to be affected after treatment of parasites as *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp, and *Toxoplasma gondii* with inhibitors of the C14 $\alpha$ -demethylase, squalene synthase, and sterolmethyltransferase, which are important enzymes of the ergosterol biosynthesis pathway (SOUZA et al., 2009). Mitochondrial membrane potential variations could be a consequence of diverse events, such as: the inhibition of

electron transport chain (decrease), block of ATP synthase (increase), stimulation of uncoupling proteins (decrease) or permeabilization of the inner membrane (decrease) (Fidalgo and Gille, 2011). Furthermore, in many cases mitochondrial depolarization is preceded by a transient hyper-polarization that has often been considered as the last attempt by the cells to avoid death; this effect can be clearly observed in the majority of the population of heat-shocked *Leishmania* promastigotes (Jiménez-Ruiz et al., 2010). In the present study, it was observed that the ketoconazole-treated parasites induced a hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential that was time-dependent up to 72h. Another study showed that *T. cruzi* treated with ketoconazole ( $EC_{50} = 32 \mu\text{M}$  for 72 hours) presented a gradual increase of Rho 123 fluorescence time-dependent and confocal microscopy of parasites confirmed an intense proliferation of the inner mitochondrial membrane. This organelle appeared to be highly branched and compact, resulting in higher levels of Rho 123 accumulation within cells (Kessler et al., 2013). Over the time, directing energy to the parasite single mitochondria may be more important than repairing cell damage. This would explain the fact that in the time of 72h the greatest mitochondrial hyperpolarization occurs and there is no labeling for autophagic vacuoles.

The fact that the mitochondrial membrane is hyperpolarized does not mean that the organelle is functioning normally for the ATP production. Mitochondrion plays a major role in generation of energy essential for the survival and proliferation of eukaryotic cells (Johnson et al., 1980). In this way, the malfunctioning mitochondria could impair the ATP synthesis and inorganic phosphate would accumulate in acidocalcisomes, explaining the increase in the amount of this organelle 72 hours after ketoconazole treatment. Acidocalcisomes are organelles featured by its acidic nature, high electron density and play role in polyphosphates, calcium, magnesium and other elements storage (Moreno and Docampo, 2009). This phenomenon was already reported for ketoconazole and *L. amazonensis* (Vannier-Santos et al., 1999).

Analyzing the parasite's death pathways, we observed that under the conditions tested ( $2 \times EC_{50} = 10 \mu\text{M}$  for 72 hours), the drug treatment did not lead to parasite death, by neither apoptosis nor necrosis. Also, ketoconazole-

treated parasites in the same conditions did not show autophagic vacuoles, suggesting that autophagy cell death did not occur. Kessler et al. (2013) reported that treatment of *T. cruzi* with ketoconazole ( $EC_{50}/72$  h) did not show necrosis or apoptosis, but treatment with  $IC_{100}$  for 24 hours resulted in rapid cell death by necrosis. However, this high concentration able to induce necrosis is possibly far from that usually present in clinical scenario. So, the ketoconazole mechanism of action will probably be related to its cytostatic effect rather than cytotoxic effect at doses commonly used in the clinic.

These data, coupled with the results of the growth curve with viable parasites, cell cycle assay and very frequent ultrastructural alterations (presence of flagellar changes such as truncated and/or double flagella), strongly suggest that the effect of ketoconazole against *L. (L.) amazonensis* is cytostatic rather than cytotoxic, in tested conditions. The cell cycle assay showed that the treatment was able to decrease parasites in S and G2-M and increase parasites in G0-G1; in other words, ketoconazole treatment lead to G0-G1 arrest in *L. (L.) amazonensis* parasites. Literature data have shown that SBIs interfere with the protozoan cell cycle and possible explanations for these effects could be the inability of cells in completing cell division due to the depletion of essential endogenous sterols (important for the control of membrane dynamics and regulation of the cell cycle) or disturbance in the cytoskeleton organization necessary for the completion of cytokinesis (Souza and Rodrigues, 2009). Other studies investigating tumour cells also observed this phenomenon after ketoconazole treatment: HT29-S-B6 cells cultured with 1-10  $\mu$ M ketoconazole accumulated in G1 in a dose-dependent way (Forgue-Lafitte et al., 1992); human colorectal (COLO 205) and hepatocellular carcinoma (HT 29) cell lines induced time-dependent G0-G1 phase arrest (Chen et al., 2000).

In conclusion, to our knowledge, the present study demonstrates for the first time the effect on mitochondrion, autophagic compartments, cell death pathway and cell cycle of the SBI ketoconazole on *L. (L.) amazonensis* promastigotes. Results indicated that ketoconazole mechanism of action on parasites appears to be cytostatic and non-cytotoxic under tested conditions.

## **Acknowledgements**

We thank to technicians Rosiane Nascimento Alves and Mariani Borges Franco and doctoral student Eliézer Lucas Pires Ramos for the help in handling the laboratory equipments.

## **Funding**

This work was supported by Brazilian Research Funding Agencies (FAPEMIG, CNPq and CAPES). We declare no potential conflict of interest.

## References

- Alsaleh, Q. A., Dvorak, R., Nanda, A., 1995. Ketoconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Kuwait. *Int J Dermatol*, 34, 7, 495-497.
- Arora, A., Raghuraman, H., Chattopadhyay, A., 2004. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 920-926.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Jr, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M., Johnson Jr., W. D., 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, 44, 536-546.
- Beach, D. H., Goad, L. J., Holz, G. G., 1988. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 31, 149-162.
- Bergh, D., Bechel, K.-H., Plempel, M., Regel, E., 1986. Antimycotic sterol biosynthesis inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 7, 233-238.
- Berman, J.D., Holz Jr, G.G., Beach, D.H., 1984. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmaniamexicana* promastigotes in culture. *Mol Biochem Parasitol*, 12, 1-13.
- Boecken, G., Sunderkotter, C., Bogdan, C., Weitzel, T., Fischer, M., Muller, A., Lobermann, M., Anders, G., von Stebut, E., Schunk, M., Burchard, G., Grobusch, M., Bialek, R., Harms-Zwingenberger, G., Fleischer, B., Pietras, M., Faulde, M., Erkens, K., 2011. Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. *J Dtsch Dermatol Ges.*, 9, 8, 1-51.

Brennand, A., Gualdrón-López, M., Coppens, I., Rigden, D. J., Ginger, M. L., Michels, P. A. M., 2011 Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol*, 177, 83-99.

Buckner, F., Urbina, J. A., 2012. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist*, 2, 236–242.

Chen, R.J., Lee, W.S., Liang, Y.C., Lin, J.K., Wang, Y.J., Lin, C.H., Hsieh, J.Y., Chaing, C.C., Ho, Y.S., 2000. Ketoconazole induces G0/G1 arrest in human colorectal and hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169, 132–141.

El-Sayed, M., Anwar, A. E., 2010. Intralesional sodium stibugluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibugluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereal*, 24, 335-340.

Fidalgo, L. M., Gille, L., 2011. Mitochondria and Trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res*, 28, 2758-2770.

Forgue-Lafitte, M.E., Coudray, A.M., Fagot, D., Mester, J., 1992. Effects of ketoconazole on the proliferation and cell cycle of human cancer cell lines. *Cancer Res*, 52:6827-6831.

Hart, D. T., Lauwers, W. J., Willemsens, G., Bossche, H. V., Opperdoes, F. R., 1989. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. *Mol Biochem Parasitol*, 33, 123-134.

Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J. F., Macleod, E. T., Lüder, C. G. K., Fasel, N., Hurd, H., 2010. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors*, 3, 104, 1-15.

Johnson, L. V., Walsh, M. L., Chen, L. B., 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 2, 990-994.

Jolliffe, D. S., 1986. Cutaneous leishmaniasis from Belize – treatment with ketoconazole. *Clin Exp Dermatol*, 11, 62-68.

Kessler, R. L., Soares, M. J., Probst, C. M., Krieger, M. A., 2013. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *Plos one*, 8, 1, 1-16.

Lazardi, K., Urbina, J. A., Souza, W., 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 11, 2097-2105.

Lepesheva, G. I., Villalta, F., Waterman, M. R., 2011. Targeting *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51). *Adv Parasitol*, 75, 65-87.

Moreno, S. N. J., Docampo, R., 2009. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol*, 56, 3, 208-213.

Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Berman, J. D., Chajón, J. F., 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis*, 165, 528-534.

Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C., Andrade, C. A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*, 118, 87–96.

Rama, M., Kumar, N. V. A., Balaji, S., 2015. A comprehensive review of patented antileishmanial agents. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 4(1), 37-56.



Roberts, C. W., Mcleod, R., Rice, D. W., Ginger, M., Chance, M. L., Goad, L. J., 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molec Biochem Parasitol*, 126, 129-142.

Rodrigues, J. C. F., Attias, M., Rodriguez, C., Urbina, J. A., Souza, W., 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2, 487-499.

Rodrigues, J. C. F., Urbina, J. A., Souza, W., 2005. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*, 111, 230-238.

Rodrigues, J. C. F., Souza, W., 2008. Ultrastructural Alterations in Organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. *Curr Pharm Des*, 14, 925-938.

Saenz, R. E., Paz, H., Berman, J. D., 1990. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med*, 89, 147-155.

Salmanpour, R., Handjani, F., Nouhpisheh, M. K., 2001. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dermatol Treat*, 12, 159-162.

Shakya, N., Sane, S. A., Vishwakarma, P., Bajpai, P., Gupta, S., 2011. Improvement treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combination of ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator – Picroliv. *Acta Trop*, 119, 188-193.

Singh, N., Kumar, M., Singh, R. K., 2012. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*, 485-497.

Souza, W., Attias, M., Rodrigues, J. C. F., 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell B*, 41, 2069-20809.

Souza, W., Rodrigues, J. C. F., 2009. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009, 1-19.

Sundar, S., Chakravarty, J., 2015. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*, 16(2), 237-252.

Urcuyo, F. G., Zaias, N., 1982. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. *Pharmacol Therapeut*, 21, 414-416.

Vannier-Santos, M. A., Urbina, J. A., Martiny, A., Neves, A., Souza, W., 1995. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J. Euk Microbiol*, 42(4), 337-346.



**Adendo**

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);

[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 189/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 036/13

Projeto Pesquisa: “Efeitos do Cetoconazol associado a outras drogas leishmanicidas sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: estudos in vitro, in vivo e ação no perfil protéico em microdomínios de membrana do parasito”.

Pesquisador Responsável: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 13 de setembro de 2013