

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIELA FERREIRA DE VASCONCELOS

**Atividade de análogos de inibidores de protease do HIV
contra *Leishmania* spp.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Farmacologia e Imunologia.

Orientador: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT/ FIOCRUZ – RJ

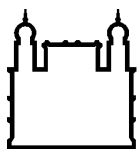
V331 Vasconcelos, Mariela Ferreira de

Atividade de hidroxietilaminas, precursores dos IP-HIV, contra *Leishmania* spp. /
Mariela Ferreira de Vasconcelos. – Rio de Janeiro, 2015.
xv, 94 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 80-94

1. Leishmanioses. 2. *Leishmania*. 3. IP-HIV. 4. Hidroxietilaminas. I. Título.
CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIELA FERREIRA DE VASCONCELOS

Atividade de análogos de inibidores de protease do HIV contra *Leishmania* spp.

Orientador:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Aprovada em: 15/12/2015

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Bartira Rossi Bergmann (IBCCF, UFRJ) - **Presidente**

Dra. Claudia Masini d'Ávila Levy (IOC, FIOCRUZ)

Profa. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (FCM, UERJ)

Dra. Tânia Zaverucha do Valle (IOC, FIOCRUZ)

Dra. Claudia Regina Brandão (Farmanguinhos, FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, com doutorado sanduíche na London School of Hygiene & Tropical Medicine - Universidade de Londres, Reino Unido, sob supervisão da Dra. Karin Seifert e Dr. Simon Croft.

AGRADECIMENTOS

Fazer parte do Instituto Oswaldo Cruz e aqui ter concluído o mestrado e o doutorado foi muito importante para o meu crescimento e aprendizado. Nesse sentido, agradeço à Coordenação da Pós – Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, por confiar em mim, por me apoiar, por me impulsionar. Sou inteiramente grata pela orientação e amizade, que ultrapassam a tese e que levo para a vida.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, principalmente Dra. Leonor Leon e Dra. Marilene Canto Cavalheiro, por serem exemplos de grandes mulheres que fazem da Ciência brasileira um campo de qualidade.

À Dra. Cláudia Brandão, do Departamento de Síntese de Fármacos, Farmanguinhos, pela síntese e fornecimento das hidroxietilaminas, e pela disponibilidade em ajudar.

À Dra. Cláudia Masini d'Ávila Levy, pelo suporte na realização dos primeiros experimentos de atividade enzimática, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

À Profa. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva, pela revisão deste trabalho, pela atenção e pelas importantes considerações realizadas.

Ao Prof. Simon Croft e Karin Seifert por terem me recebido na Escola de Higiene e Medicina Tropical de Londres (LSHTM), agradeço pela importante colaboração e enriquecimento neste trabalho.

À Dra. Grazielle Alves Ribeiro, grande amiga, companheira também de vida científica, que sempre apoiou as minhas escolhas e meus caminhos, me ajudando em momentos difíceis e me ensinando a ver o melhor quando tudo precisava de mais calma.

À Thaís Pereira, grande incentivadora, aquela que me fez acreditar que eu seria capaz de terminar essa tese. Obrigada, amiga. Se hoje estou aqui com esta conquista, saiba que você está nela comigo.

Aos amigos Luiza Gervazoni, Juliana Pacheco, Thais Carvalho, Valter Viana, Edézio Ferreira, pelas trocas no laboratório, pela ajuda constante, pela amizade e convívio tão agradável dentro e fora do trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório e da Fiocruz, obrigada pelo companheirismo, aprendizados e sorrisos.

À minha grande amiga Glaucia Azevedo, que acreditava em mim bem mais que eu mesma e repetia sempre que eu a inspirava a correr atrás dos seus sonhos. Com a Glau

aprendi a ser mais generosa, a ter fé e confiar, a amar e viver a mudança que desejo para o mundo. Obrigada por ser hoje meu anjo da guarda, amiga. Que saudade.

Agradeço às minhas queridas avós, que me tiram tantos sorrisos, pelo exemplo de vida e por me receberem sempre com muito carinho e amor. Sou muito feliz por tê-las.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, amizade e carinho, sei que estão participando desta jornada cheios de orgulho e felicidade. Ao meu pai, por me mostrar possibilidades e coragem nos caminhos mais inesperados, por me dar a confiança necessária para que eu realize todos os meus sonhos. Te admiro por tudo e preciso sempre do seu apoio.

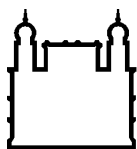
À tia Nega, pelos cuidados, carinho, incentivo e por alegrar-se junto a mim a cada pequena/grande conquista. Obrigada por compartilharmos a vida, por preencher cada vazio, por me dar força, por ser exemplo e por estar sempre lá, não importa a distância ou o problema.

Agradeço às minhas grandes amigas, por viverem comigo essa jornada e me darem todo o apoio que foi necessário. Se eu cheguei no fim desse ciclo, devo muito a vocês que não mediram palavras, cumplicidade e carinho para que eu pudesse conseguir.

Agradeço às amigas e familiares que a distância não consome. Por tudo o que foi compartilhado e por colocarem em prática a essência da palavra amizade, a saudade é constante. Vocês são muito importantes em todo o meu caminho.

E agradeço a Deus, pelas oportunidades, pela força e por me permitir conhecer todas as pessoas destes agradecimentos e outros tantos aqui não mencionados. Sou feliz por concluir esse doutorado com a certeza de que não teria conseguido sozinha. Obrigada! Todos vocês são co-autores deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” Martin Luther King



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

Os medicamentos utilizados no controle da infecção causada por espécies de *Leishmania* estão associados a alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e crescente resistência. A procura por novas alternativas de tratamento é, portanto, uma prioridade. Na busca de outros fármacos que possam ser efetivos e menos tóxicos destacam-se os inibidores de protease. As proteases de *Leishmania* estão envolvidas nos mais diversos mecanismos, tais como virulência e patogênese. Dentro deste contexto, trabalhos mostram a atividade de inibidores de aspártico protease do HIV (IPs-HIV) em patógenos oportunistas, dentre eles *Leishmania* spp. No presente estudo trabalhamos com moléculas precursoras de síntese dos IPs-HIV, as hidroxietilaminas (HEAs). O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida de HEAs e suas implicações na biologia de *Leishmania* spp. De 23 moléculas submetidas à triagem inicial em promastigotas, 15 prosseguiram nos testes e confirmaram sua atividade sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, todas com $IC_{50} < 5,0 \mu M$. A avaliação da toxidez *in vitro* sobre macrófagos peritoneais murinos e células MRC5 demonstrou que as substâncias-teste PMTB1, PMTB4, PMTB11, PLIP2, PLIP19 possuem índice de seletividade superior a 20. As substâncias mais ativas sobre amastigotas foram selecionadas para testes onde diferentes variáveis foram usadas, como: espécie do parasito, razão de infecção, tempo e metodologia de contagem. Os resultados destacaram os compostos PMTB1, PMTB8, PMTB10, PLIP1, PLIP27 e PLIP33, que foram mais ativos para *L. amazonensis* e *L. major* considerando as diversas variáveis. Além disso, ficou evidente que existe uma diferença significativa no resultado de IC_{50}/IC_{90} de acordo com a metodologia de contagem. Os testes de inibição da atividade proteolítica de aspártico protease mostraram que as HEAs tem perfis diferentes de inibição, e as com maior capacidade inibitória foram PLIP19, PLIP27, PMTB3, PMTB4, PMTB5, PMTB7, PMTB9 e PMTB10, não guardando correlação direta com a atividade leishmanicida. Ao analisarmos a relação estrutura/atividade das moléculas, percebemos que o grupamento NH_2 mantém a atividade leishmanicida. A análise do perfil dos lipídeos neutros mostrou que não houve acúmulo de esteróis metilados na posição 14, que são característicos da inibição farmacológica da CYP51. No entanto, houve uma alteração na composição dos esteróis, principalmente pela PLIP27, cujo mecanismo necessita ser explorado. A análise *in silico* demonstrou a aderência das moléculas à regra dos cinco (Ro5) de Lipinski, sugerindo que de acordo com parâmetros físico-químicos, elas são boas candidatas à administração oral. Juntos, estes resultados sugerem que as HEAs, principalmente PLIP27 e PMTB10, são moléculas promissoras com amplo espectro de atividade e podem auxiliar no estudo e desenvolvimento de protótipos semelhantes aos IPs-HIV para o tratamento das leishmanioses.

ABSTRACT

Drugs used to control infection caused by *Leishmania* species are associated with poor therapeutic responses, adverse effects, high toxicity, high costs and resistance. The search for new treatment approaches is a priority. Seeking other effective and less toxic drugs there are the protease inhibitors. *Leishmania* proteases are involved in many mechanisms, such as virulence and pathogenesis. In this context, studies show the activity of HIV aspartic protease inhibitors (HIV-PIs) in opportunistic pathogens, including *Leishmania* spp. In this study we worked with hydroxyethylamines (HEAs) used as precursor molecules in the synthesis of HIV-PIs. The objective of the study was to evaluate the leishmanicidal activity of HEAs and their implications in *Leishmania* biology. From 23 molecules in the initial screening with promastigotes, 15 continued in the tests and confirmed their activity on intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, all of them with $IC_{50} < 5,0 \mu M$. The toxicity assay on murine peritoneal macrophages and MRC5 cells showed that the molecules PMTB1, PMTB4, PMTB11, PLIP2, PLIP19 have selectivity index greater than 20. The most active substances on amastigotes were selected for testing in different methodologies, ranging parasitic species, infection rate, time and counting procedure. The results highlighted PMTB1, PMTB8, PMTB10, PLIP1, PLIP27 and PLIP33 as the most active compounds for *L. amazonensis* and *L. major*, considering several variables. Furthermore, it was evident that there are significant differences in results of IC_{50}/IC_{90} according to the counting methodology. Inhibition tests of the proteolytic activity of aspartic protease showed that HEAs have different profiles of inhibition. PLIP19, PLIP27, PMTB03, PMTB04, PMTB05, PMTB07, PMTB09 e PMTB10 were the most potent inhibiting the protease activity, without having a direct correlation with the leishmanicidal activity. Analyzing the relationship structure / activity of molecules, we realize that the group NH_2 is important for leishmanicidal activity. Analysis of neutral lipids from promastigotes of *L. amazonensis* treated with PLIP27 and PMTB10 showed that there was no accumulation of C14-methylated sterols, which are typical of pharmacological inhibition of CYP51. However, other changes in sterol composition induced mainly by PLIP27 were noted, but the mechanism remains to be explored. The *in silico* analysis demonstrated the adherence of molecules to the rule of five (Ro5) of Lipinski, suggesting that according to physicochemical parameters they are good candidates of oral treatment. Altogether, these results suggest that HEAs, mainly PLIP27 and PMTB10, are promising molecules with broad-spectrum activity, and can be useful in the study and development of prototypes similar to HIV-PI for the treatment of leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 2	Biossíntese de esteróis em <i>L. amazonensis</i>	31
Figura 3	Estrutura dos principais inibidores de protease do HIV e da hidroxietilpiperazina mais ativa da primeira geração, a PMIC4	37
Figura 4	Estrutura base das hidroetilaminas da série 1	38
Figura 5	Estrutura base das hidroetilaminas da série 2	38
Figura 6	Estrutura base das hidroetilaminas da série 3	39
Figura 7	Inibição da atividade de aspártico protease de <i>L. amazonensis</i> pelas moléculas da série PMTB.	58
Figura 8	Inibição da atividade de aspártico protease de <i>L. amazonensis</i> pelas moléculas da série PLIP	59
Figura 9	Representação gráfica da classificação das HEAS em diferentes grupos, de acordo com a sua atividade	62
Figura 10	Efeito da PMTB10 e PLIP 27 sobre o perfil de esteróis de <i>L. amazonensis</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas para o homem.	18
Tabela 2	Principais sintomas, espécies e distribuição relacionados às manifestações clínicas das leishmanioses.	23
Tabela 3	Substituintes e peso molecular das HEAs da série 1.	38
Tabela 4	Substituintes e peso molecular das HEAs da série 2.	38
Tabela 5	Substituintes e peso molecular das HEAs da série 3.	39
Tabela 6	Representação em forma de smiles das séries PLIP e PMTB.	48
Tabela 7	Atividade antipromastigota das HEAs em <i>L.amazonensis</i> .	51
Tabela 8	IC ₅₀ da atividade antiamastigota das HEAs em <i>L.amazonensis</i> .	52
Tabela 9	Índice de seletividade das HEAs em <i>L.amazonensis</i> .	53
Tabela 10	Atividade antiamastigota das HEAs em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> em µM.	55
Tabela 11	Atividade antiamastigota em diferentes razões de infecção, tempo de incubação e diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .	56
Tabela 12	Atividade antiamastigota da associação de miltefosina e PLIP27 em <i>L.major</i>	57
Tabela 13	Relação entre estrutura, atividade leishmanicida, inibição de aspártico proteases e índice de seletividade.	61
Tabela 14	Perfil de esteróis de promastigotas de <i>Leshmania amazonensis</i> tratadas com PMTB10 e PLIP27.	65
Tabela 15	Análise dos descritores moleculares de Lipinski (Ro5) da série PMTB.	67
Tabela 16	Análise dos descritores moleculares de Lipinski (Ro5) da série PLIP.	67
Tabela 17	Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos da série PMTB.	68
Tabela 18	Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos da série PLIP.	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	“Acquired Immune Deficiency Syndrome” / Síndrome da imunodeficiência adquirida
ADMET	“Absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity” / Absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade
ADP	Adenosina difosfato
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanossulfonato
CDC	“Centers for disease control and prevention” / Centros de prevenção e controle de doenças
CIF	Concentração inibitória fracionária
CTL	Controle
CYP	Citocromo P450
C-14 desmetilase	Esterol C ₁₄ α -desmetilase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	“Dithiothreitol” / Ditiotreitól
EDANS	Ácido 5-[(2-aminoetil)amino]naftaleno-1-sulfônico
EDTA	“Ethylenediamineteraaceticacid”/Ácido etilendiaminotetracético
GC/MS	“Gas chromatography–mass spectrometry” / Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas
Gp63	Glicoproteína 63
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa
HEAs	Hidroxietilaminas
HIV	“Human immunodeficiency vírus” / Vírus da imunodeficiência humana
HMG-Coa redutase	Hidroximetilglutaril coenzima A redutase
I	Inibidor
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% da atividade testada
IC ₉₀	Concentração que inibe 90% da atividade testada
IF	Índice de infecção
IFN- γ	Interferon gama
IPs-HIV	Inibidores da aspártico protease do HIV
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea-difusa
LD ₅₀	Dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
mL	Mililitro
MØ	Macrófago
MRC5	Linhagem de células humanas de pulmão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NI	Não inibidor
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PSP	Peptidase de superfície de promastigota
S	Significativo
SFB	Soro fetal bovino
SD	“Standard deviation” / Desvio padrão
Smiles	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Ro5	Regra dos 5
TARV	Terapia antirretroviral
TCLK	Tosilfenilalaninaclorometilcetona
Th2	“T helper cell 2” / Linfócitos T auxiliares do tipo 2
Tr	Tempo de retenção
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	16
1. 1 O gênero <i>Leishmania</i> e o ciclo biológico	17
1.2 As leishmanioses	22
1.3 Tratamento	25
1.4 Alvos terapêuticos	29
1.4.1 Biossíntese de esteróis	32
1.4.2 Proteases de <i>Leishmania</i>	32
1.4.3 Aspártico proteases	34
1.5 Inibidores de proteases do HIV e sua ação sobre patógenos oportunistas	35
1.6 Hidroxietilaminas (HEAs), precursores na síntese dos inibidores de proteases do HIV	36
II. OBJETIVOS	40
1. Objetivo geral	41
2. Objetivos específicos	41
III. METODOLOGIA	42
1. Hidroxietilaminas (Precursores dos inibidores de protease do HIV)	43
2. Parasitos	43
3. Atividade antipromastigota	43
4. Atividade antiamastigota	44
5. Avaliação da atividade de aspártico protease	45
6. Extração de lipídeos	46
7 Análise do perfil de esteróis por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS)	46
8. Análise <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas das HEAs	47
9. Análise estatística	49

IV. RESULTADOS	50
5.1 Atividade das hidroxietilaminas sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	51
5.2 Atividade das hidroxietilaminas sobre amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	52
5.3 Toxidez sobre células de mamíferos	52
5.4 Avaliação do espectro de atividade anti-amastigota das hidroxietilaminas, comparando diferentes protocolos experimentais	54
5.5 Estudos de combinação da PLIP27 com miltefosina	57
5.6 Efeito das hidroxietilaminas sobre a atividade enzimática de aspártico protease de <i>L. amazonensis</i>	57
5.7 Correlação entre a atividade leishmanicida e a inibição da atividade de aspártico protease em <i>L. amazonensis</i> pelas hidroxietilaminas	60
5.8 Análise do perfil de esteróis de <i>L. amazonensis</i> tratada com PMTB10 e PLIP27	62
5.9 Análise in silico das propriedades farmacocinéticas das moléculas da série PMTB e PLIP	66
V. DISCUSSÃO	70
VI. CONCLUSÕES	78
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

I. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Leishmania* e o ciclo biológico

A classe Kinetoplastea é constituída por protozoários que possuem minicírculos de DNA mitocondrial arranjados em uma estrutura muito característica, denominada de cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria única (Moreira et al., 2004). Dentre os *taxa* dessa classe, a família Trypanosomatidae se destaca por reunir parasitos que infectam uma variedade de organismos, incluindo o homem. Importantes doenças são provocadas por estes parasitos, como a doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, a doença do sono, causado por duas subespécies de *T. brucei*, e as leishmanioses, causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* (d'Ávila-Levy et al., 2015).

Os tripanossomatídeos são protozoários móveis que possuem corpo geralmente alongado contendo um único flagelo, que emerge na extremidade anterior da célula, em uma região denominada bolsa flagelar. Neles os peroxissomos são modificados para a glicólise e chamados glicossomos (Stuart et al., 2008). Podem apresentar mais de uma morfologia celular durante o ciclo de vida, que se distinguem pelo aspecto geral da célula, presença ou ausência de flagelo extracelular, presença de membrana ondulante e posição do complexo flagelo-bolsa flagelar-cinetoplasto em relação ao núcleo (Vickerman et al., 1976).

O gênero *Leishmania*, um dos mais estudados, apresenta dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que englobam as espécies causadoras das leishmanioses (Lainson, 2010). Mais de vinte espécies de *Leishmania* foram identificadas como patogênicas para humanos, causando leishmaniose dermatrópica, viscerotrópica e mucotrópica. Os parasitos do subgênero *Viannia* têm a sua distribuição geográfica limitada ao Novo Mundo. Os parasitos do subgênero *Leishmania*, abrangem todas as espécies do Velho Mundo e são também encontrados no Novo Mundo. Estes subgêneros estão agrupados da seguinte maneira (OMS, 2015) (Tabela 1):

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem (adaptado de OMS 2015)

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. infantum</i>	<i>L. major</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. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismos descritos	Viscerotropismo	Dermotropismo	Dermotropismo	Mucotropismo

No Brasil, as espécies mais importantes são *L. infantum*, *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2010).

As espécies de *Leishmania* são heteroxênicas, pois necessitam de dois tipos de hospedeiros durante o seu ciclo biológico. A transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre através da picada de um flebotomíneo, hospedeiro invertebrado da ordem *Diptera*, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*. Estima-se que entre as mais de 800 espécies de flebotomíneos existentes, apenas 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são de interesse médico com papel comprovado ou indícios de envolvimento na transmissão de leishmaniose. No Velho Mundo, *Phlebotomus* é o principal gênero encontrado, e no Novo Mundo 56 espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* estão envolvidos na transmissão de 15 espécies de *Leishmania* (Maroli et al. 2013; Sharma and Singh 2008).

Os hospedeiros vertebrados do parasito consistem em uma grande variedade de mamíferos, como humanos, roedores, cães, lobos e raposas (Neuber, 2008). Durante o ciclo, esses protozoários apresentam duas formas evolutivas, os promastigotas e os amastigotas, o primeiro nos hospedeiros invertebrados e o segundo nos vertebrados.

As formas promastigotas encontradas nos flebotomíneos são alongadas, apresentam um flagelo livre, longo, que emerge da parte anterior do corpo celular. Apresentam um núcleo arredondado ou oval que se situa na porção mediana da célula, e o cinetoplasto, em forma de bastonete, que localiza-se entre o núcleo e a extremidade anterior próximo da bolsa flagelar (Neves, 2005). Os promastigotas apresentam ainda várias formas de transição no interior do intestino do inseto vetor até se diferenciarem completamente em promastigotas metacíclicos,

formas também flageladas que possuem mobilidade intensa e são altamente infectantes para o hospedeiro mamífero.

As formas amastigotas são intracelulares, encontradas no hospedeiro mamífero. São formas esféricas ou ovais que não apresentam flagelo livre, mas apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar. São normalmente encontradas no interior dos macrófagos de mamíferos. Apresentam em seu interior um núcleo grande e arredondado e o cinetoplasto em forma de grão ou bastonete (Santos et al., 2008; Mishra et al., 2009b; Singh et al., 2009).

A infecção do inseto ocorre durante o repasto sanguíneo, quando ele suga do hospedeiro vertebrado o sangue contendo células infectadas. No trato digestivo do vetor, ocorre a lise das células e a liberação das formas amastigotas, que se diferenciam inicialmente em promastigotas procíclicas não infectivas e se multiplicam por divisão binária de forma logarítmica no intestino. Durante a metaciclogênese, ocorre o alongamento da molécula de LPG que permite o “desligamento” do parasito do epitélio e migração para o pró-ventrículo do inseto, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas infectivas. As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide e são regurgitadas para o hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo do inseto vetor. No local da infecção, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico presentes na derme. Nessas células, os parasitos ficam no vacúolo parasitóforo, sendo capazes de resistir à ação microbicida das hidrolases ácidas, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária, levando as células ao rompimento. As amastigotas liberadas podem infectar outros fagócitos adjacentes e, por via hematogênica, de acordo com o tropismo de cada espécie, podem alcançar tecidos como baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, disseminando a infecção (Fig. 1) (Stuart et al., 2008; Mishra et al., 2009a; Singh et al., 2009; Lamour et al., 2012).

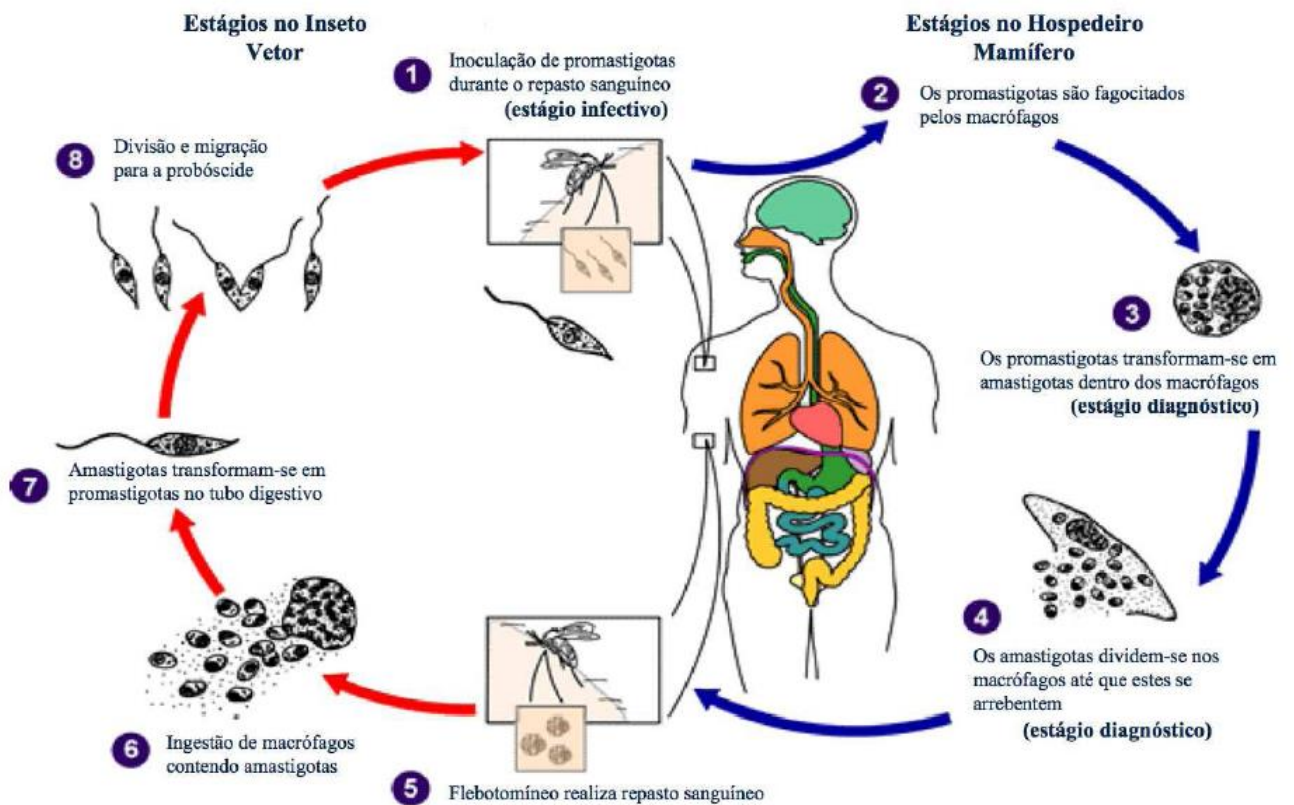


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. O inseto torna-se infectado durante o repasto sanguíneo, ao ingerir, do hospedeiro vertebrado, células infectadas com formas amastigotas. No vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas que infectam outro hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado as formas promastigotas infectam células fagocitárias, diferenciam-se em amastigotas e se multiplicam levando as células hospedeiras ao rompimento. As amastigotas liberadas infectam novas células, disseminando a infecção (adaptado de CDC, 2013).

A fagocitose constitui-se como um mecanismo importante de invasão intracelular utilizado por patógenos. Ao serem infectadas, as células fagocíticas utilizam diversos mecanismos para destruir o parasito. Para que a infecção seja bem sucedida os patógenos precisam desenvolver mecanismos eficientes de evasão à resposta imune do hospedeiro, de forma que possam sobreviver às condições hostis do ambiente intracelular.

Diversas moléculas de superfície estão relacionadas à interação entre as formas promastigotas de *Leishmania* e os macrófagos. A glicoproteína gp63 e a molécula lipofosfoglicana (LPG) são proteínas presentes na superfície do parasito que são importantes para o sucesso da invasão da *Leishmania* e seu estabelecimento no interior do vacúolo (Denkers & Butcher, 2005). Estas moléculas interagem com receptores do complemento – CR1 e CR3 – presentes na membrana dos macrófagos. A gp63 está diretamente envolvida na infectividade do parasito e na forma como este vai se ligar à membrana da célula hospedeira (Mosser & Rosenthal, 1993). No momento de diferenciação das formas promastigotas em amastigotas a expressão dessa

proteína é diminuída, evidenciando sua importância no processo de interação com a célula hospedeira. A molécula LPG também é importante para o estabelecimento das formas promastigotas no interior do macrófago e diferenciação na forma amastigota. Ela afeta diversos mecanismos desempenhados pela célula hospedeira, como a degradação do conteúdo interno do vacúolo formado, possivelmente atrasando o processo de fusão lisossomal (Gruenberg & van der Goot, 2006). Essa molécula também está relacionada a virulência do parasito, sendo mais abundante em formas promastigotas metacíclicas do que em procíclicas, permitindo que as formas metacíclicas desprendam-se do aparelho bucal do inseto e entrem em contato com o organismo vertebrado (Lodge & Descoteaux, 2005).

Após a invasão, para sobreviver no meio adverso e acidificado do vacúolo do hospedeiro, o parasito conta com a ação de uma ATPase translocadora de prótons presente em sua membrana, que mantém o pH neutro no interior do parasito (Glaser et al., 1992). Algumas espécies de *Leishmania* têm a capacidade de evitar a fusão do vacúolo com lisossomos da célula hospedeira até sua diferenciação em amastigotas, como *L. donovani*. Outras espécies, como *L. amazonensis*, são capazes de resistir ao ambiente ácido do vacúolo parasitóforo antes mesmo da diferenciação em formas amastigotas (Courret et al., 2002). As formas amastigotas de todas as espécies do gênero *Leishmania* são metabolicamente ativas em pH ácido, conseguindo sobreviver no ambiente acidificado do fagolisossomo (Leirião et al., 2004). Isso se deve à presença de um gradiente de prótons na membrana do parasito, cuja manutenção é essencial para sua sobrevivência (Burchmore & Barret, 2001). Após a completa diferenciação das formas promastigotas em amastigotas e seu estabelecimento em um pH ácido, os parasitos são capazes de se dividir no interior do vacúolo, estabelecendo a infecção no hospedeiro vertebrado.

Além de estabelecer uma entrada bem sucedida na célula hospedeira, o parasito também precisa desenvolver estratégias de escape dos mecanismos microbicidas apresentados por macrófagos. Nesse processo, a molécula gp63 também apresenta papel fundamental, protegendo as formas amastigotas da degradação. Essa molécula converte o componente C3b do sistema do complemento em uma forma inativa, C3bi, evitando a opsonização pelo complemento e a degradação mediada por esta via (Olivier et al., 2005).

No interior dos macrófagos, as formas amastigotas também conseguem inibir suas funções microbicidas, como produção de radicais livres, apresentação de antígenos e produção de citocinas, devido à interação entre o macrófago e a fosfatidilserina exposta na membrana das formas amastigotas, processo conhecido como mimetismo apoptótico (Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2005). A apresentação de antígenos pela célula hospedeira também é alterada pelo parasito, que consegue diminuir a capacidade de apresentação de antígenos a outros

componentes do sistema imune (Reiner et al., 1987). Esses e outros mecanismos de evasão são fundamentais para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida.

1.2. As leishmanioses

As leishmanioses apresentam diferentes formas de manifestação clínica, que dependem da espécie do parasito que foi transmitido pelo vetor e da resposta imune do hospedeiro vertebrado acometido (Santos et al., 2008). As manifestações clínicas variam desde úlceras cutâneas localizadas à doença sistêmica fatal (El-On, 2009). A doença se apresenta em duas grandes formas clínicas no homem: tegumentar, que acomete pele ou mucosas, e visceral, que acomete as vísceras.

As leishmanioses ocorrem em 98 países e 5 continentes apresentam transmissão endêmica. O número de casos totais é superior a 58.000 casos de leishmaniose visceral e 220.000 de leishmaniose cutânea (OMS, 2015). Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar et al., 2012). A leishmaniose cutânea apresenta uma maior distribuição e os dez países com grande número de casos registrados são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. Juntos esses países correspondem a 75% da incidência global estimada de LC (Alvar et al., 2012).

Em 2012, do total dos 50.060 de LC reportados nas Américas, 47,5% foram notificados pelo Brasil, e dos 3.214 casos notificados de LV, o Brasil representa 97% (OMS, 2015).

Dados da Secretaria de Vigilância do Ministério da Saúde apontam as regiões Norte e Nordeste com os maiores números de casos notificados para leishmaniose no Brasil (Ministério da Saúde, 2014).

Na Tabela 2 estão os principais sintomas, espécies e epidemiologia relacionados às manifestações clínicas.

Tabela 2. Principais sintomas, espécies e distribuição relacionados às manifestações clínicas das leishmanioses (adaptado de Nagle et al., 2014).

Apresentação Clínica	Sintomas	Espécies	Prevalência
Leishmaniose Visceral	Febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso	<i>L. donovani</i>	Índia, Bangladesh, Nepal, Leste da África
		<i>L. infantum</i>	Região do Mediterrâneo, Américas do Sul e Central
		<i>L. siamensis</i>	Tailândia
Leishmaniose Dérmica Pós Calazar	Dermatite grave com lesões cutâneas e placas pelo corpo contendo os parasitos	<i>L. donovani</i>	Leste da África, Índia, Bangladesh, Nepal
Leishmaniose Cutânea (Velho Mundo)	Pápulas eritematosas e úlcera no local da picada do inseto vetor	<i>L. aethiopica</i>	Sul da Europa, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e África
		<i>L. killicki</i>	
		<i>L. tropica</i>	
		<i>L. turanica</i>	
		<i>L. major</i>	
Leishmaniose Cutânea (Novo Mundo)	Pápulas eritematosas e úlcera no local da picada do inseto vetor	<i>L. amazonensis</i>	Américas Central e do Sul
		<i>L. braziliensis</i>	
		<i>L. colombiense</i>	
		<i>L. guyanensis</i>	
		<i>L. mexicana</i>	
		<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. peruviana</i>	
<i>L. venezuelensis</i>			
Leishmaniose Mucosa	Lesões destrutivas e desfigurantes em mucosas oro-nasais	<i>L. aethiopica</i>	Etiópia, Américas do Sul e Central
		<i>L. braziliensis</i>	
		<i>L. guyanensis</i>	
		<i>L. panamensis</i>	

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais prevalente da doença, causada principalmente pelas espécies de *Leishmania* dermatrópicas, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Brito et al., 2012; Fraga et al., 2012). As lesões usualmente são encontradas em partes expostas da superfície corporal como mãos, rosto ou pernas (Neuber, 2008; David et al., 2009). A LC inicia-se com uma pápula no local da picada do inseto, que aumenta de tamanho, forma uma crosta e eventualmente ulcera (Reithinger et al., 2007), mas pode evoluir para a cura espontânea. As lesões se apresentam como úlcera de superfície plana com margens aumentadas e bem delimitadas.

Nas Américas, as principais espécies envolvidas são as do complexo *L. mexicana* e do subgênero *Vianna* (Myler, 2008). Na região norte do Brasil, as lesões múltiplas são frequentemente causadas por *L. guyanensis* e parecem estar relacionadas às múltiplas picadas de

Lutzomyia umbratilis ou por disseminação linfática metastática (Lainson, 2010). Um estudo nesta região, com 180 pacientes diagnosticados com leishmaniose, mostrou uma prevalência de infecção com *L. guyanensis* de 94% e com *L. braziliensis* de 6% (Benicio et al., 2011).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) apresenta infecção e mecanismos de transmissão similares aos da leishmaniose cutânea. Sob o ponto de vista clínico, inicialmente apresenta-se como mácula, pápula ou nódulo no local da inoculação, que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas disseminadas pelo corpo, face (nariz, regiões malares, lábio superior, orelhas) e membros (braços, antebraços, pernas, pés) (Ministério da Saúde, 2010). As lesões apresentam-se como eritemas, pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e aspecto tumoral. A infiltração pode envolver extensas áreas do corpo (Costa et al., 2009).

As espécies envolvidas estão associadas ao complexo *L. mexicana* (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*) no continente americano. Na África, *L. tropica* e *L. aethiopica* são as principais espécies (OMS, 2010).

A leishmaniose mucosa (LM) provoca destruição intensa da cavidade oro-nasal e da faringe, podendo provocar lesões desfigurantes e mutilações na face. Na maioria dos casos, a LM resulta da leishmaniose cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Goto et al., 2010). A LM desenvolve na presença de uma resposta imunológica insuficiente ou induzida ao erro na fase inicial da LC. Pacientes coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Leishmania* apresentam taxas mais elevadas de desenvolvimento de LM (46,7-68%) do que pacientes infectados somente com *Leishmania* (1,5%) (Maretti-Mira et al., 2012).

No Brasil, a LM é causada principalmente por *L. braziliensis*, mas outras espécies também podem desencadeá-la, como *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (Fraga et al., 2012).

A leishmaniose visceral (LV), também chamada calazar, é a forma mais grave da doença, sendo fatal quando não tratada. O parasito é inoculado na pele e migra, via circulação linfática e sanguínea, infectando células do sistema fagocítico de diferentes órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Caracteriza-se por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia (Maltezou, 2010). A LV é causada por *L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e somente por *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) no novo mundo (Lukes et al., 2007).

Existem dois tipos de LV, que diferem em suas características de transmissão: LV zoonótica, transmitida de animal para vetor, e vetor ao ser humano e LV antroponótica, transmitida de humano para vetor, vetor para humano. No primeiro caso, os seres humanos são hospedeiros ocasionais, e principalmente cães, são o reservatório do parasito. LV zoonótica é

encontrada em áreas de transmissão de *L. infantum*, enquanto que LV antroponótica é encontrado em áreas de transmissão de *L. donovani* (Antinori et al., 2012; Chappuis et al., 2007).

Na infecção por *L. donovani*, após a recuperação, o paciente pode desenvolver uma forma de leishmaniose cutânea crônica, causada por *L. donovani*, chamada leishmaniose dérmica pós-calazar, de tratamento longo (Srivastava et al., 2011). A doença manifesta-se como múltiplas máculas hipocrômicas, pápulas eritematosas e nódulos que usualmente se espalham a partir da região oral para outras áreas do corpo (Piscopo et al., 2006). Estudos buscam conhecer se a leishmaniose dérmica pós-calazar desempenha papel importante na transmissão da LV, devido à localização dérmica dos parasitos nas lesões, especialmente as papulonodulares, ricas em parasitos, que os torna mais acessíveis para o flebotomíneo (Ganguly et al., 2010; Mukhopadhyay et al., 2014).

A leishmaniose vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, ampliando a sua distribuição geográfica, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e, mais recentemente, em centros urbanos. Esse processo de expansão geográfica das leishmanioses está associado à pressão antrópica sobre o ambiente, à ocupação desordenada do espaço físico e à capacidade de domiciliação do flebotomíneo (Ministério da Saúde, 2010).

1.3. Tratamento

Baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e crescente resistência são alguns dos problemas associados às opções terapêuticas utilizadas para o controle das leishmanioses. Apesar das diferenças de suscetibilidade a fármacos existentes entre as várias espécies de *Leishmania* e de existirem várias formas de manifestação da doença, os medicamentos usualmente empregados nos tratamentos são os mesmos (Goto et al., 2010).

Em geral, a primeira linha de medicamentos utilizada no tratamento contra a leishmaniose se baseia no uso dos antimoniais pentavalentes complexados a carboidratos, o antimoniato de metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®). No Brasil, o antimonial utilizado como primeira escolha no tratamento da leishmaniose é o antimoniato de metilglucamina (Ministério da Saúde, 2010), administrado por via intramuscular ou endovenosa.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi completamente elucidado, mas um consenso geral é de que agem sobre vários alvos importantes para a bioenergética do parasito, como a glicólise, a beta-oxidação de ácidos graxos e a inibição da fosforilação do ADP (Franco

et al., 1995). O antimônio também pode alterar o potencial tiol-redox em ambas as formas do parasito, tornando-o mais suscetível ao estresse oxidativo (Wyllie et al., 2004).

Os antimoniais são medicamentos injetáveis, frequentemente requerem hospitalização, acarretam desconforto para o paciente e alto custo. Diversos efeitos adversos estão relacionados ao seu uso. Os principais consistem em artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, insônia, nervosismo, choque pirogênico e edema (Ministério da Saúde, 2010). Efeitos adversos graves, como cardiotoxicidade e falha renal podem ocorrer, principalmente, em pacientes idosos, cardiopatas e com insuficiência renal. Além disso, o uso deste medicamento não é indicado durante a gravidez (Goto et al., 2010).

Além dos efeitos colaterais, várias limitações comprometem a utilização dos antimoniais no tratamento, como eficácia variável em relação ao tipo de leishmaniose, e surgimento de resistência (Croft et al., 2003).

A anfotericina B, fármaco de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose no Brasil, é uma lactona macrolídica poliênica com potente ação antifúngica, usada para o tratamento de micoses sistêmicas. Seu mecanismo de ação é decorrente de sua afinidade pelo ergosterol, esterol presente na membrana de *Leishmania* e fungos, e ausente nas membranas de células de mamíferos (Singh et al., 2004). Dessa forma, a anfotericina B forma poros na membrana dos parasitos, levando-os à morte por lise celular (Ramos et al., 1996). No entanto, este fármaco pode se ligar, em menores proporções, ao colesterol das membranas celulares de mamíferos, induzindo efeitos adversos sobre os pacientes. A anfotericina B é administrada por infusão venosa e pode produzir febre, calafrio, dor nas articulações, e nefrotoxicidade. A sua utilização requer hospitalização e acompanhamento (Mishra et al., 2007).

A diminuição dos efeitos tóxicos da anfotericina B foi conseguida com as formulações lipídicas. Essas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (Mishra et al., 2009b; Singh et al., 2009). Essas formulações estão entre os mais notáveis avanços na terapia da leishmaniose (Blum et al., 2009), mas apresentam alto custo, o que inviabiliza sua utilização pela maior parte da população afetada.

A pentamidina é uma poliamina utilizada contra protozoários patogênicos, como por exemplo o *T. brucei* e também para leishmaniose visceral resistente aos antimoniais (Piscopo et al., 2006), e no tratamento da leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral em algumas regiões do Novo Mundo (Goto et al., 2010). A pentamidina provoca a morte do parasito por interferir na síntese do seu DNA, induzindo modificações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação

mitocondrial (David et al., 2009; Goto e et al., 2010). Comercializada em duas formulações injetáveis, o seu uso é limitado devido à sua toxicidade (Piscopo et al., 2006). As principais reações incluem dor no local da injeção, gosto metálico, dores de cabeça, hipotensão, síncope e hipoglicemia (Goto et al., 2010). Estudos demonstram que a pentamidina atua inibindo a topoisomerase II (topoisomerase mitocondrial) e resulta em alterações características de apoptose, como externalização de fosfatidilserina, liberação de citocromo C, ativação de proteases e fragmentação de DNA (Singh e Dey, 2007).

A miltefosina é o mais recente fármaco leishmanicida disponibilizado no mercado e o principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos, uma vez que é o primeiro fármaco de administração oral utilizado no tratamento da leishmaniose. É uma fosfocolina que foi licenciada pelo governo indiano em 2002 e atualmente já está licenciada em diversos países (Berman, 2008), eficaz até mesmo no tratamento de coinfeções com o vírus HIV (Schraner et al., 2005).

Esse composto se liga à membrana plasmática, é internalizado pela célula do hospedeiro e induz alterações significativas no metabolismo do parasito. Foi demonstrado que estimula produção de óxido nítrico e expressão de iNOS em macrófagos. Além disso, a miltefosina induz um aumento na quantidade de receptores de IFN- γ , elevando a resposta de macrófagos infectados para o controle da infecção (Wadhore P. et al., 2009). Também induz a morte celular por apoptose em *L. donovani* (Paris et al., 2004) e *L. amazonensis* (Marinho et al., 2011), provocando diversas alterações no parasito, como externalização de fosfatidilserina e fragmentação de DNA.

Dentre os problemas relacionados ao uso da miltefosina está o seu potencial teratogênico, sendo contra-indicado na gravidez, ou para mulheres em idade fértil e crianças. A resistência pode ocorrer durante o tratamento devido à mutações, que levam a diminuição no acúmulo do fármaco na célula (Maltezou, 2010). Além disso, efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal foram observados. O alto custo é um fator que limita a sua utilização (Mishra et al., 2009a; Singh et al., 2009) e os indícios de teratogenicidade em animais tem sido um dos fatores limitantes para o licenciamento pela ANVISA no Brasil.

A paramomicina é um aminoglicosídeo ativo por via tópica, eficaz contra bactérias e protozoários, incluindo *Leishmania* (Neal, 1968). Ela se liga à subunidade ribossômica 30S, interferindo com a iniciação da síntese proteica (Trudel et al., 2008). Outros estudos demonstraram que a paramomicina promove disfunção no sistema respiratório do parasito, impede o seu crescimento e altera a fluidez de membrana (Maarouf et al., 1997a; Maarouf et al., 1997b).

Para aumentar a quantidade de paromomicina na pele e nos parasitos das lesões, três preparações de pomadas são utilizadas para leishmaniose cutânea: paromomicina 15% com cloreto de metilbenzetônio 12%, paromomicina 15% com 10% de uréia e paromomicina com gentamicina 0,5%. Estas formulações apresentam resultados variáveis de acordo com a espécie envolvida e a situação epidemiológica (Monge-Maillo e López-Vélez, 2013).

A paramomicina também é utilizada por via oral e via parenteral no tratamento da leishmaniose cutânea no Novo e no Velho Mundo (Goto et al., 2010). Apesar de ser um fármaco eficaz contra as leishmanioses, com baixo custo, menor tempo de administração e bom perfil de segurança, a sua utilização é limitada pelos seus efeitos colaterais, como toxicidade renal e dano a um nervo craniano (Singh et al., 2004).

Outros fármacos são utilizados como medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses. Estudos demonstram a eficácia do fluconazol, cetoconazol e itraconazol, azóis desenvolvidos para tratamento de infecções fúngicas, mas usados no tratamento da leishmaniose. A dapsona é eficaz no tratamento da leishmaniose no Velho Mundo e a rifampicina apresenta eficácia variada (Monzote, 2009). A azitromicina apresenta atividade contra *L. major*, mas relatos do Novo e Velho Mundo apresentam resultados divergentes, com taxas de cura de 85% e 27,6%, respectivamente (Goto et al., 2010).

Diversas falhas nas terapias citadas já foram relatadas. Essas falhas podem estar relacionadas à resistência do parasito durante o tratamento (Hadighi et al., 2006) ou podem ser decorrentes de deficiências de natureza imunológica (Gil et al., 2007). A associação entre leishmaniose e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) tem crescido muito. A maioria dos casos de coinfeção *Leishmania* e HIV nas Américas é notificada no Brasil, onde a incidência de leishmaniose se espalhou nos últimos anos devido à sobreposição com as principais áreas de transmissão do HIV. O tratamento da leishmaniose em pacientes HIV apresenta número reduzido de opções terapêuticas (Alvar et al., 2007).

A necessidade de mecanismos de prevenção e controle das leishmanioses é urgente e por isso é tão necessária a busca pela identificação de novos alvos específicos no parasito para o desenvolvimento de fármacos e vacinas eficazes, seletivas e de baixo custo contra todas as espécies de *Leishmania*.

1.4. Alvos terapêuticos

1.4.1. Biossíntese de esteróis

Dentre os lipídeos, principais constituintes das membranas celulares, encontram-se os esteróis, que regulam a fluidez das membranas biológicas, controlam o ciclo celular, entre outras funções. A via biossintética dos esteróis nos tripanossomatídeos diverge da via dos mamíferos. Assim, determinadas etapas são consideradas alvos para o desenvolvimento de fármacos. Os tripanossomatídeos, bem como os fungos, sintetizam esteróis de esqueleto ergostano, caracterizado pela presença de ramificações na posição 24, estruturalmente diferentes do colesterol, principal esteroide de mamíferos (Almeida-Amaral et al., 2014).

Na composição de esteróis de *Leishmania* foram identificados esqualeno, lanosterol (4,4,14 α -trimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol, **1**) e dimetilzimosterol (4 α ,14 α -dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol, **3**) (Goad et al., 1984). A descoberta dessas substâncias sugeriu que a biossíntese de esteroide ocorria de maneira similar a dos fungos, uma vantagem para a quimioterapia com alvo nesta via (Almeida-Amaral et al., 2014).

O conhecimento sobre a biossíntese de esteróis foi adquirido, em sua maior parte, através de estudos sobre o colesterol, na via biossintética dos mamíferos, que conta com 4 estágios. No estágio 1, ocorre a síntese de um intermediário com seis átomos de carbono, o ácido mevalônico. O estágio 2 envolve a conversão do ácido mevalônico em unidades de isopreno ativadas. O estágio 3 consiste na polimerização de seis unidades isoprênicas com cinco átomos de carbono para formar a estrutura linear do esqualeno, com trinta átomos de carbono. No estágio 4 ocorre a ciclização do esqualeno, formando os quatro anéis do núcleo de esteróis, e uma série de mudanças posteriores levam aos produtos finais (Nelson et al., 2014). A biossíntese dos esteróis dos tripanossomatídeos ocorre de acordo com essa linha geral, com diferenciações nas etapas finais.

Essa via biossintética parece ser essencial para *Leishmania*, já que a sua inibição leva à morte dos parasitos. A inibição das enzimas HMG-CoA redutase, esqualeno epoxidase, C-14 desmetilase e C-24 metiltransferase, por exemplo, pelas estatinas (sinvastatina, lovastatina), alilaminas (terbinafina), azóis (cetoconazol, miconazol, itraconazol e fluconazol) e azasteróis (Fig.2), é fatal tanto para *Leishmania*, quanto para o *Trypanosoma cruzi* (Berman et al., 1984; Beach et al., 1988; Haughan et al., 1992; Rodrigues et al., 2002) (Fig. 2).

Os antifúngicos imidazólicos e triazólicos possuem alta atividade de inibição da biossíntese de esteróis e do crescimento de *Leishmania* spp. (Goad, 1994) e *T. cruzi* (Liendo et al., 1999). Eles atuam na enzima citocromo P450 C-14 desmetilase (CYP51), essencial na biossíntese de esteróis do fim da via, ocasionando a diminuição de esteróis C-28 e C-29 e acúmulo de vários esteróis metilados, levando o parasito à morte (Goad, 1994). Novas isoformas de CYP51 foram encontradas em *Trypanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. Essas

isoformas possuem 74-86% de identidade entre elas e de 22-33% com C-14 desmetilase de outros reinos biológicos. Há homologia também com a CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis* (28%) e humana (27%) (Lepesheva e Waterman, 2004).

O cetoconazol, um importante derivado imidazólico, apresenta como efeito adverso a inibição de outras enzimas do complexo P450 oxidase, como a CYP3A4. Curiosamente, os inibidores da protease do HIV (IPs-HIV) também possuem como efeito adverso a inibição de enzimas desse complexo. Além disso, o tratamento com os IPs-HIV lopinavir/ritonavir, em pacientes com AIDS, pode resultar em alterações da concentração de colesterol total e triglicerídeos. Esses pacientes podem sofrer redistribuição ou acúmulo de gordura corpórea, incluindo obesidade, crescimento do seios ou aparecimento de ginecomastia, aumento da gordura dorso cervical, emagrecimento periférico e aparência cushingóide. Também podem apresentar lipoatrofia, lipoacumulação ou a combinação destas condições, referida como lipodistrofia (Anuurad et al., 2010; Reis et al., 2011).

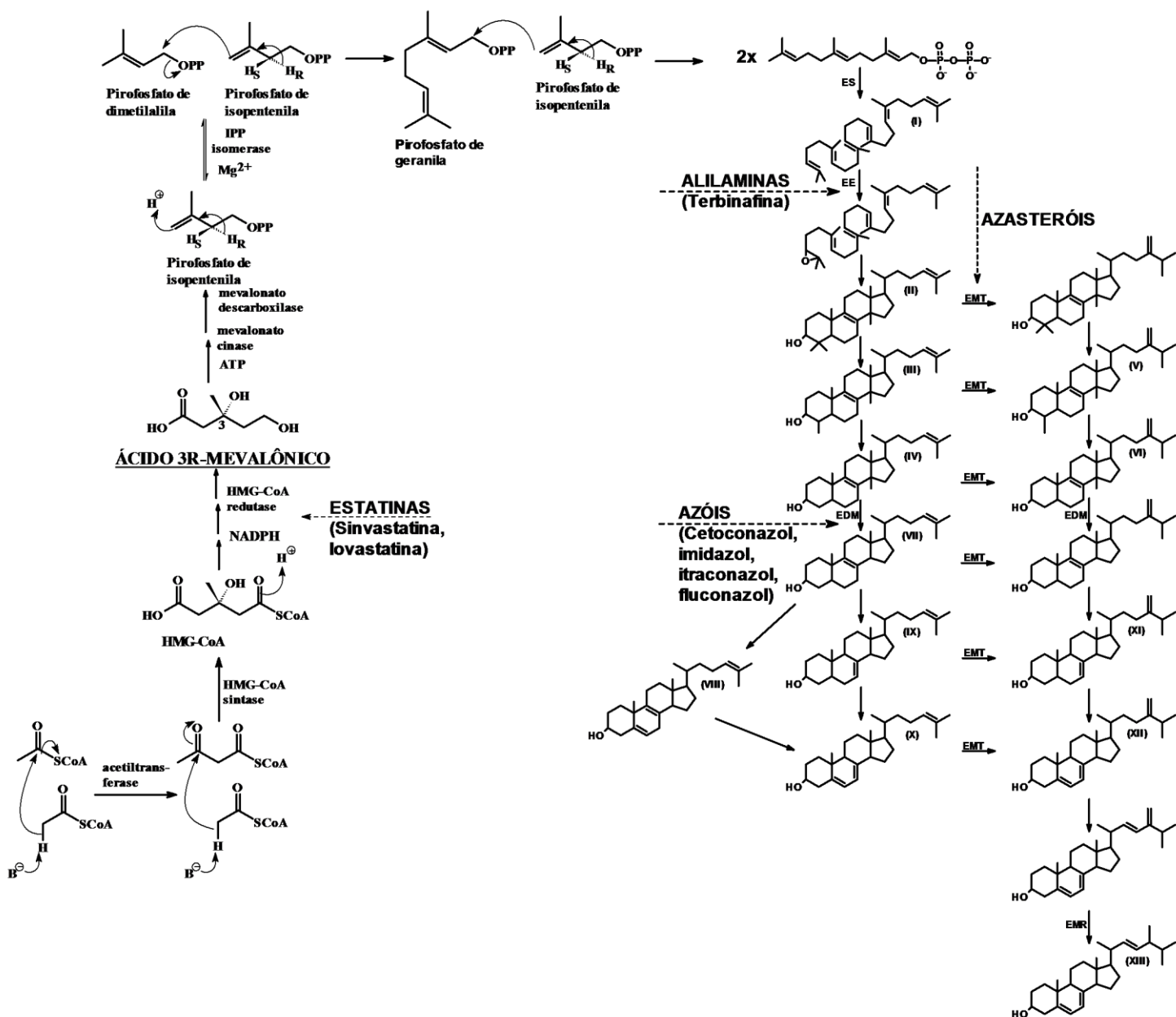


Figura 2. Biossíntese de esteróis em *L. amazonensis*. I, esqualeno; II, lanosterol; III, 4,14-dimetilzymosterol; IV, 14-metilzymosterol; V, 4,14-dimetilfecosterol; VI, 14-metilfecosterol; VII, zymosterol; VIII, colest-5,7,24-trien-3β-ol; IX, colest-7,24-dien-3β-ol; X, colest-5,7,24-trien-3β-ol; XI, ergosta-7,24(24¹)-dien-3β-ol (episterol); XII, ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3β-ol (5-desidroepisterol); XIII, ergosterol; ES, esqualeno sintase; EE, esqualeno epoxidase; EMT, esterol metiltransferase; EMR, esterol metil-redutase; EDM, esterol 14 desmetilase (adaptado de Rodrigues et al., 2002).

1.4.2. Proteases de *Leishmania*

As proteases, também conhecidas como peptidases, formam um diversificado e amplo grupo de enzimas que estão presentes em diferentes sistemas biológicos, como por exemplo: animais, plantas, helmintos e protozoários. Essas proteínas que compõem cerca de 2% da massa de todos os organismos multi e unicelulares, possuem um papel de extrema importância nos fenômenos biológicos. As proteases, também são conhecidas por sua importância médica, já tendo descrito na literatura os mecanismos de catálise, especificidade e relação estrutura e função. Sendo assim, tornam-se ótimos alvos farmacológicos (McKerrow et al., 2008).

As proteases são denominadas: A- aspártico, C-cisteína, M- metalo, G- glutâmico, T- treonina, S- serina, N- asparagina e U para mecanismo de hidrólise desconhecido. Estas denominações estão associadas ao sítio catalítico e quando referidas devem ser citadas com duas letras, sendo a primeira referente à família a qual esta protease pertence (Beynon & Bond, 2001; Barret et al., 2003; Rawlings et al., 2012; MEROPS, 2015).

Na interação dos tripanossomatídeos com a célula hospedeira, as proteases são fundamentais, uma vez que estão envolvidas com a degradação do tecido conjuntivo no momento da penetração dos tripanossomatídeos nas células ou tecidos alvos. Esta degradação ocorre em proteínas do citoesqueleto no momento da ruptura das células do hospedeiro; isso ocorre por mecanismos de evasão, bloqueio na circulação sanguínea do hospedeiro e, também, do sistema fibrinolítico dependente de cascatas catalisadas por proteases; além disso, também está envolvido a variabilidade antigênica do parasito (Mckerrow et al., 1993; Mckerrow et al., 2006).

Vale destacar que além de estarem envolvidas nos fatores de virulência dos tripanossomatídeos, as proteases estão associadas ao seu ciclo de vida, como transição do seu estágio de vida. Outra característica importante, é a participação nos processo nutricional do parasito. (Mckerrow et al., 1993; Sajid et al., 2002).

As metalo e as cisteíno proteases, são as classes mais comumente encontradas em tripanossomatídeos (Branquinho et al., 1996; Santos et al., 2005). Além dessas, as proteases da classe serino, treonina e aspártico também foram identificadas (Burleigh et al., 1997; Paugam et al., 2003; Silva-Lopez et al., 2004; Alves et al., 2005; Valdivieso et al., 2007).

As proteases que contribuem para virulência e patogênese de *Leishmania* são as mais diversos. Dentre eles, podemos destacar uma metalo protease de 60-65 kDa (MSP- “major surface peptidase”), gp63, PSP ou leishmanolisina (“promastigote surface peptidase”), que é considerada a glicoproteína mais abundante expressa na superfície celular das formas

promastigotas (Bordier e et al., 1987; Yao et al., 2003). A protease gp63 está associada a resistência a lise mediada pelo sistema complemento, invasão dos macrófagos, confere proteção dentro do fagolisossomo de macrófagos, além da inibição da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (Yao et al., 2003). A gp63 promove a morte apoptótica mediada por peptídeos antimicrobianos (Kulkani et al., 2006) e inibe a proliferação de células NK (Natural Killer) (Lieke et al., 2008).

As leishmanias pertencentes principalmente ao complexo mexicana expressam níveis elevados de cisteíno proteases. Das proteases, as que são melhor caracterizadas são as similares a catepsina L (CPA e CPB) e as similares a catepsina B (CPC), localizadas nos megassomas (organelas ditas como grandes lisossomos, ricas em cisteíno proteases, específicas das formas amastigotas) (McKerrow et al. 2006).

Estas cisteíno proteases são codificadas por genes de baixa massa molecular (*cpa*, *cpb*, *cpc*) e são encontradas na maioria das espécies de *Leishmania*. Mutantes nulos para cada um dos genes geraram resultados sugerindo que a CPB pode estar envolvida na diferenciação de promastigota em amastigota; outra possibilidade é que possa estar envolvida no mecanismo de evasão ao sistema imune (Frame et al, 2000; Mottram et al., 2004).

Outro fator relevante é que CPA não é essencial para a replicação de *L. infantum*. Entretanto, tem uma importância relevante na interação parasito-hospedeiro (Denise et al., 2006). Estratégias experimentais como *Knock-down* ou *Knock-out* dos genes ou inibição da CPA e CPB em *L. mexicana* causaram interferência na via de autofagia que ocorre durante a diferenciação para amastigotas, como também impede a metacicloênese, incrementando a hipótese de que a autofagia é requerida para a diferenciação celular (Williams et al., 2006).

As serino proteases localizam-se em estruturas semelhantes às responsáveis pelas vias exocíticas de células de mamíferos e, principalmente, na bolsa flagelar (Silva-Lopez et al., 2004; Morgado-Diaz et al., 2005). Na bolsa flagelar, já foi descrito uma serino protease destinada a exportação extracelular e associada à virulência (Duboise et al., 1994; Silva-Lopez et al., 2004). Existem alguns indícios que as serino proteases possam estar envolvidas nos mecanismos de evasão, tendo em vista que hamsters imunizados com amastigotas de *L. braziliensis* apresentaram imunidade protetora somente quando as formas infectivas do parasito foram pré-tratadas com tosilfenilalaninaclorometilcetona (TCLK), inibidor de serino protease (O'Daly et al., 1986). Também foi demonstrado que as serino proteases solúveis de antígenos das formas promastigotas do parasito podem ativar citocinas de células auxiliares do tipo 2 (Th2) *in vitro* (Matos-Guedes et al., 2010), contribuindo para a proliferação do parasito.

As aspártico proteases funcionam em condições ácidas, o que limita a função e atividade da enzima a alguns locais específicos nos diferentes organismos. Por esta razão, a ocorrência desta classe é menos abundante do que as outras (Dash et al., 2003).

Estas enzimas proteolíticas, por terem participação nos mais diversos processos biológicos e patológicos, têm recebido grande atenção como alvos para intervenção farmacológica (Dash et al., 2003). Os principais investimentos estão associados ao envolvimento da catepsina D, uma aspártico protease, na metástase do câncer de mama, da protease do HIV na AIDS e o envolvimento da renina na hipertensão (Dash et al., 2003).

Na família Trypanosomatidae, as aspártico proteases não estão bem caracterizadas, entretanto já foi descrito que ocorre uma diminuição dessa atividade enzimática durante a transformação de promastigota em amastigota de *L. amazonensis* (Burleigh et al., 1997; Paugam et al., 2003; Silva-Lopez et al., 2004; Alves et al., 2005; Valdivieso et al., 2007).

Além disso, esta atividade enzimática foi descrita em frações solúveis de promastigotas de *L. mexicana* e de *L. amazonensis*, possuindo a capacidade de degradar um substrato sintético específico para aspártico proteases do tipo catepsina D (Alves et al., 2005; Valdivieso et al., 2007).

A importância dos estudos que envolvem as proteases dos parasitos recai sobre a geração de informações sobre a bioquímica e biologia do parasito, e também do esclarecimento de diferentes prisms da interação parasito-hospedeiro (Santos et al., 2009).

1.4.3. Aspártico proteases

Caracteristicamente as aspártico proteases utilizam dois grupamentos carboxílicos de ácido aspártico do seu sítio ativo para realizar a catálise, e sua atividade hidrolítica ótima ocorre em pH baixo e, preferencialmente cliva seu substrato em uma região entre aminoácidos hidrofóbicos e considerados grandes (Santos et al., 2013). Entretanto, estes critérios são flexíveis e passíveis de diferença de acordo com os sistemas biológicos nos quais as proteases estão inseridas, tais como: função, localização e atuação de inibidores (Santos et al., 2013).

As aspártico proteases são enzimas produzidas na forma inativa, e se tornam ativas apenas com a conversão que se desencadeia em meio ácido e de forma auto-catalítica. No banco de dados MEROPS, proteases das diferentes classes são agrupadas em famílias com base nas semelhanças significativas na sequência de aminoácidos. Famílias de homólogos que surgiram a partir de uma origem evolutiva comum são agrupadas em clãs. O clã representa uma ou mais famílias, que

mostram evidências sobre a relação evolutiva por estruturas terciárias semelhantes, sobre a ordem dos resíduos no sítio catalítico na cadeia polipeptídica e seu padrão de sequências de nucleotídeos e aminoácidos. De acordo com esse banco de dados estas proteases são subdivididas em cinco clãs, sendo eles: AA, AC, AD, AE e AF. Cada um destes é subdividido em subfamílias, de acordo com as características estruturais e bioquímicas; entretanto, as que são indistinguíveis bioquimicamente são reunidas de acordo com a sua homologia (Rawlings e Barrett, 1993; Rawlings et al. 2004).

1.5. Inibidores de protease do HIV e sua ação sobre patógenos oportunistas

Os inibidores da aspártico protease do HIV (IPs-HIV), na quimioterapia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), constituem o exemplo de maior impacto e sucesso da abordagem de inibição da atividade proteolítica como forma de controlar um patógeno (Dash et al., 2003). A primeira geração de IPs-HIV desenvolvida compreende: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir e amprenavir, e a segunda geração: fosamprenavir (profármaco do amprenavir), lopinavir, atazanavir, tipranavir e darunavir (FDA, 2008).

Nos pacientes com AIDS, a incidência, morbidade e mortalidade das coinfeções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias diminuíram drasticamente após a introdução dos inibidores de protease no esquema da terapia antirretroviral (TARV). Isso ocorreu por volta de 1996, dando origem a uma nova fase do tratamento que alguns autores chamam de terapia antirretroviral de alta eficiência (HAART, sigla em inglês) (Palella et al., 1998; Pozio et al., 2005). Embora na maioria dos casos estas melhorias tenham sido atribuídas à recuperação da imunidade do hospedeiro, o controle de infecções oportunistas foram demonstradas mesmo na ausência de recuperação imunológica (Mele et al., 2003). Esse fato e deve a inibição direta de aspártico proteases dos patógenos oportunistas, como demonstrado em algumas bactérias, fungos e protozoários (Santos et al, 2009; Valdivieso et al, 2010; Tsang & Hong, 2010; Braga-Silva et al, 2010).

De acordo com a literatura, os IPs-HIV teriam um efeito direto sobre algumas infecções oportunistas, tendo sido demonstrado para *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* (Pozio et al., 2005), *Fonsecaea pedrosoi* (Palmeira et al., 2008), *Leishmania major*, *Leishmania infantum* (Savoia et al., 2005; Trudel et al., 2008) e *Leishmania amazonensis*. Para *L. amazonensis*, os inibidores

nelfinavir e lopinavir inibem acentuadamente a multiplicação do parasito *in vitro* (Santos et al., 2009).

Muitos trabalhos têm sido realizados para testar os efeitos dos IPs-HIV sobre *Leishmania*, impulsionados pela redução drástica na incidência, morbidade e mortalidade das co-infecções após a introdução do HAART (Cruz et al., 2006). Os inibidores foram capazes de promover efeitos nocivos sobre a proliferação e ultraestrutura, bem como redução da capacidade de *Leishmania* em infectar e sobreviver no interior de macrófagos de células hospedeiras (Savoia et al., 2005; Valdivieso et al., 2007; Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009; Valdivieso et al., 2010). Embora haja alguma diferença quanto à magnitude, a ação anti-proliferativa desses inibidores parece clara em *Leishmania* spp.

A eficácia dos IPs-HIV contra as infecções citadas pode ser atribuída à sua ação antiinflamatória (Tovo, 2000), sua capacidade de bloquear o proteossoma celular (Andre et al., 1998) e promover apoptose (Gaedicke et al., 2002). Além disso, percebe-se um efeito sinérgico entre os fármacos rotineiramente utilizados contra as infecções oportunistas e os IPs-HIV (Hommer et al., 2003; Casolari et al., 2004). Alternativamente, eles poderiam atuar diretamente sobre as aspártico proteases produzidas pelos protozoários. Um exemplo de aplicação prática da sinergia entre os diferentes fármacos é a diminuição das doses dos antimicóticos, que possuem muitos efeitos colaterais, no tratamento de infecções fúngicas em indivíduos HIV positivos (Casolari et al., 2004).

1.6. Hidroxietilaminas (HEAs), precursores na síntese dos inibidores de protease do HIV

Uma série de hidroxietilaminas, intermediárias da síntese dos inibidores de aspártico protease do HIV, foi sintetizada pelo grupo da Dra. Cláudia Brandão. Essas substâncias são compostos que apresentam hidroxietilaminas centrais, com capacidade de inibir aspártico proteases do HIV (Ghosh et al., 2001; Brik et al., 2003), de *Plasmodium falciparum* (Noteberg et al., 2003; Parikh et al., 2005; Andrews et al., 2006) e de *Leishmania* spp. (Savoia et al., 2005). Além disso, os amino-álcoois presentes são compostos importantes e versáteis, com aplicações em muitas áreas, como química sintética e medicinal. Diferentes compostos contendo o álcool na porção amino foram sintetizados para serem usados em várias doenças (Ferreira et al., 2009).

Em estudos anteriores, demonstramos a atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de hidroxietilpiperazinas, que são moléculas intermediárias na síntese do inibidor de protease

indinavir (Vasconcelos, 2011). A PMIC4 foi selecionada como a mais promissora da série (Fig. 3), com um IC_{50} de 1,8 μM sobre amastigotas de *L. amazonensis* e atividade *in vivo* por via oral (Vasconcelos et al., 2014). Na Figura 3 encontram-se as estruturas dos principais inibidores de protease do HIV e da PMIC4.

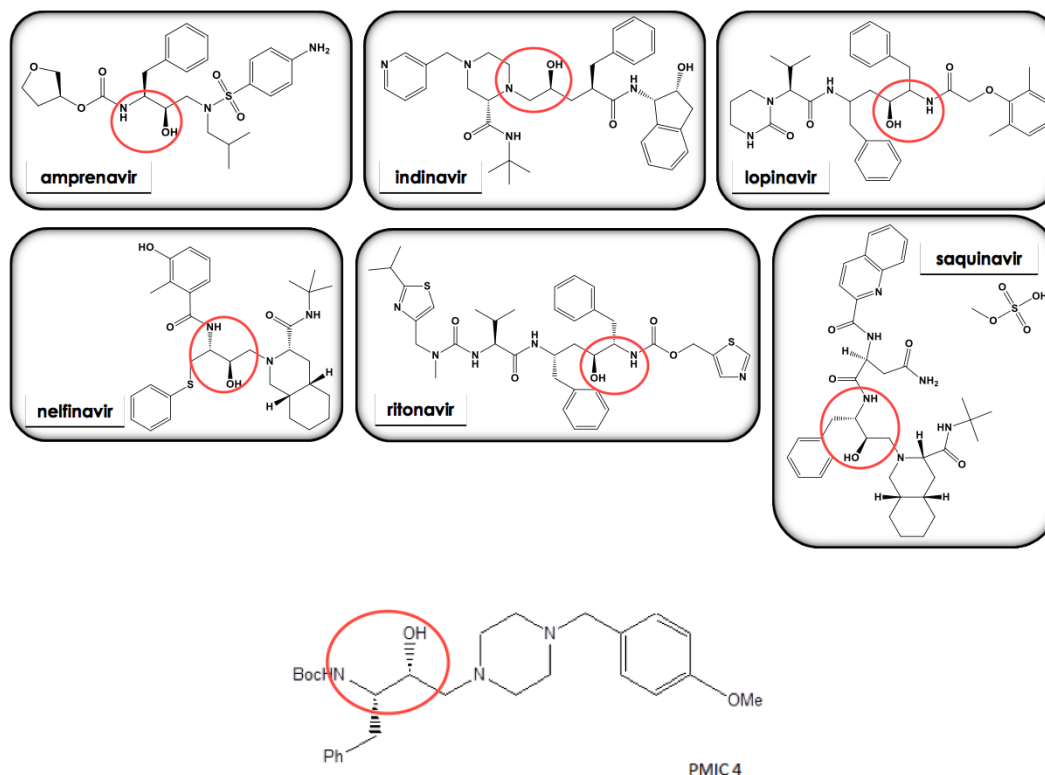


Figura 3. Estrutura dos principais inibidores de protease do HIV e da hidroxietilpiperazina mais ativa da primeira geração, a PMIC4. Esquema evidenciando o grupo farmacofórico, hidroxietilamina, responsável pela inibição de aspártico proteases (adaptado de Santos et al., 2013).

Com base no sucesso da atividade *in vitro* e *in vivo* da PMIC4, 23 novas hidroxietilaminas (HEAs) foram selecionadas para estudo. Essas moléculas são utilizadas como precursores da síntese do amprenavir e apresentam semelhança estrutural com outros IP-HIV.

As novas hidroxietilaminas podem ser classificadas em 3 séries principais: a primeira, mais simples, contém um grupo metilendioxifenil ligado à amina e substituições no carbono β -OH (Fig. 4, Tab. 3); a segunda e a terceira séries consistem na adição de um grupo fenilsulfona na amina, mantendo (Fig. 5, Tab. 4) ou não (Fig. 6, Tab. 5) o grupo metilendióxido.

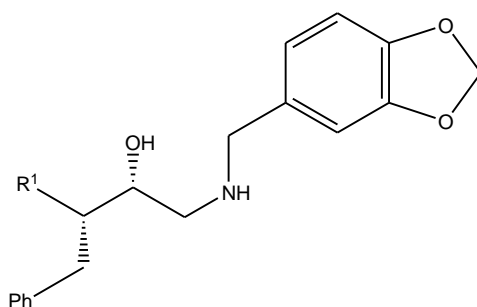


Figura 4. Estrutura base das hidroxietilaminas da série 1. As substituições estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3. Substituintes e peso molecular das HEAs da série 1

	R ¹	M.M. (g/mol)	F.M.
PLIP 01	NHBoc	414,49	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₅
PLIP 01D	NH ₂ . HCl	350,88	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₃

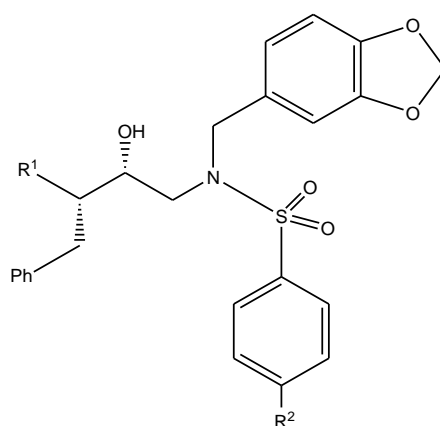


Figura 5. Estrutura base das hidroxietilaminas da série 2. As substituições estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4. Substituintes e peso molecular das HEAs da série 2

	R ¹	R ²	M.M. (g/mol)	F.M.
PLIP 02	NHBoc	Br	633,55	C ₂₉ H ₃₃ BrN ₂ O ₇ S
PLIP 03	NH ₂ . HCl	Br	569,93	C ₂₄ H ₂₅ BrN ₂ O ₅ S
PLIP 18	NHBoc	Me	568,68	C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₇ S
PLIP 19	NH ₂ . HCl	Me	505,07	C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₅ S
PLIP 26	NHBoc	NO ₂	599,65	C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₉ S
PLIP 27	NH ₂ . HCl	NO ₂	536,04	C ₂₄ H ₂₅ N ₃ O ₇ S
PLIP 33	NHBoc	NH ₂	569,67	C ₂₉ H ₃₅ N ₃ O ₇ S
PLIP 40	NHBoc	F	472,53	C ₂₉ H ₃₃ FN ₂ O ₇ S
PLIP 41	NH ₂ . HCl	F	509,03	C ₂₄ H ₂₅ FN ₂ O ₅ S

A

B

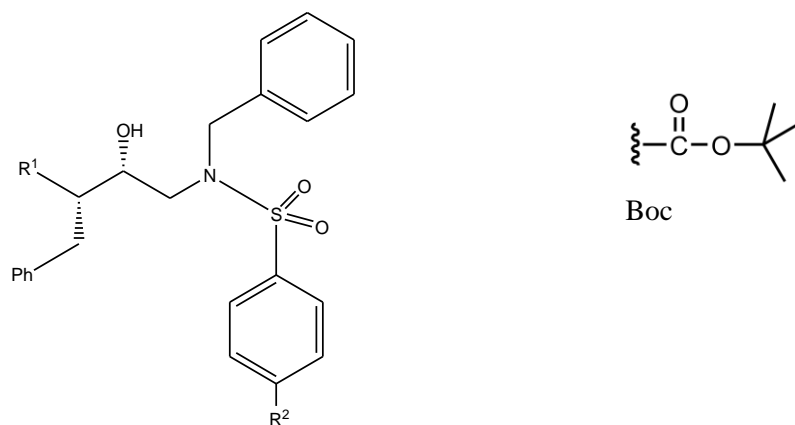


Figura 6. Estrutura base das hidroxietilaminas da série 3. As substituições estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5. Substituintes e peso molecular da série 3

	R ¹	R ²	M.M. (g/mol)	F.M.
PMTB 01	NHBoc	NO ₂	555,64	C ₂₈ H ₃₃ N ₃ O ₇ S
PMTB 03	NHBoc	Br	589,54	C ₂₈ H ₃₃ BrN ₂ O ₅ S
PMTB 04	NH ₂ . HCl	Br	525,93	C ₂₃ H ₂₅ BrN ₂ O ₃ S
PMTB 05	NHBoc	F	528,64	C ₂₈ H ₃₃ FN ₂ O ₅ S
PMTB 06	NH ₂ . HCl	F	465,02	C ₂₃ H ₂₅ FN ₂ O ₃
PMTB 07	NHBoc	Me	524,67	C ₂₉ H ₃₆ N ₂ O ₅ S
PMTB 08	NH ₂ . HCl	Me	461,06	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₃ S
PMTB 09	NHBoc	OMe	540,67	C ₂₉ H ₃₆ N ₂ O ₆ S
PMTB 10	NH ₂ . HCl	OMe	477,06	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₄ S
PMTB 11	NHBoc	NH ₂	525,66	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₅ S
PMTB 12	NH ₂ . HCl	NH ₂	462,04	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₃ S
PMTB 21	NHBoc	H	510,64	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₅ S

Algumas hidroxietilaminas apresentam como substituinte o Boc (*tert*-butiloxicarbonila, Fig. 6B), grupo protetor comum em síntese orgânica, usado para a proteção de aminas. O Boc converte a amina em carbamida, que não reage, permitindo assim reações em outras partes da molécula.

II- OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade leishmanicida de hidroxiethylaminas e suas implicações na biologia de *Leishmania* spp.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar a atividade das hidroxiethylaminas em promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*;

3.2.2. Avaliar a toxidez das HEAs sobre células de camundongo e de linhagem humana;

3.2.3. Verificar o espectro de ação das HEAs sobre diferentes espécies de *Leishmania*;

3.2.4. Estudar a influência da razão de infecção e do tempo na atividade das HEAs;

3.2.5. Analisar o efeito da associação das HEAs mais ativas com um fármaco de referência;

3.2.6. Avaliar o efeito das HEAs sobre a atividade enzimática de aspártico protease de *L. amazonensis*;

3.2.7. Analisar o efeito das HEAs na biossíntese de estéroides em *L. amazonensis*;

3.2.8. Realizar a avaliação ADMET *in silico* das HEAs.

III- METODOLOGIA

1. Hidroxietilaminas

As hidroxietilaminas, utilizadas como intermediárias na síntese do amprenavir, foram planejadas e sintetizadas no Departamento de Síntese de Fármacos, do Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, como descrito por Cunico e colaboradores (Cunico e cols, 2008).

2. Parasitos

- *Leishmania amazonensis*

As cepas utilizadas para os ensaios foram *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e (MPRO/BR/72/M1841 LV79-DSred2). Os parasitos foram isolados de lesões de camundongos infectados e mantidos como promastigotas a 26 °C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, EUA), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), até a quinta passagem.

- *Leishmania donovani*

A cepa utilizada para os ensaios foi *Leishmania donovani* (MHOM/ET/67/HU3). Os parasitos foram obtidos do baço de camundongos C-57/B6 Rag1 KO infectados até a 5ª passagem.

- *Leishmania major* e *Leishmania mexicana*

As cepas utilizadas para os ensaios foram *Leishmania major* (MHOM/SA/85/JISH118) e *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379). Os parasitos foram isolados de lesões de camundongos infectados e mantidos como promastigotas a 26 °C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, EUA), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB), até a 5ª passagem.

3. Atividade antipromastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 /mL) foram incubados por 72 horas na presença de concentrações variadas das amostras a 26 °C, em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10 % de SFB, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Estes ensaios foram realizados em triplicata em placas de 96 poços (Costar, Nova Iorque, EUA) no volume final de 200 µl/ poço. A quantidade de células por poço foi de 2×10^5 . A atividade leishmanicida foi

avaliada adicionando a cada poço 22 μ L de MTT a 5 mg/mL (Brometo de tiazolil azul tetrazólio, Sigma), em um ensaio colorimétrico baseado na redução deste composto por enzimas, formando formazana, que absorve luz em outro comprimento de onda. Após 2 horas da adição do MTT, foram adicionados 80 μ L de DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) por poço e realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, em leitor de micro placa (μ Quant Bio-Tek Instruments, Winooski, EUA). O cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica e a análise estatística pelo teste “t” de *Student*, ambos realizados no *GraphPad Prism* 5.0.

4. Atividade anti-amastigota

Para a avaliação da atividade sobre amastigotas intracelulares, macrófagos peritoneais murinos foram obtidos por lavagem peritoneal com 5 mL de meio RPMI gelado (Sigma). O lavado peritoneal foi ajustado à concentração de 2×10^6 macrófagos/mL, plaqueado em câmaras LAB-TEK (Nunc, Rochester, EUA), no volume final de 400 μ l e incubados por 24 horas a 37 °C e 5 % CO₂. Após, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) a 37°C, para remoção das células não aderentes. As células aderidas foram incubadas com promastigotas de *Leishmania* na proporção indicada em cada caso, e mantidas a 37 °C e 5 % CO₂. Após 24 horas, as câmaras foram lavadas novamente, para remover os parasitos livres. As monocamadas foram incubadas com as moléculas em teste, nas concentrações 30 μ M, 10 μ M, 3.3 μ M e 1.1 μ M, por 72 horas a 37 °C e 5 % CO₂. Após o período de incubação, a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente, corando-se as câmaras com Giemsa e contando pelo menos 200 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a seguinte fórmula: IF = % células infectadas X número de amastigotas/número total de macrófagos. O cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica, no *GraphPad Prism* 5.0.

5. Citotoxicidade contra células de mamíferos

Para determinar a citotoxicidade contra células de mamíferos foram utilizados macrófagos peritoneais murinos (4×10^5 células/poço) e células de linhagem MRC5 (1×10^4 células/poço). Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos serialmente em meio RPMI contendo 10% de SFB em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C

e 5 % CO₂ e foi determinada a viabilidade celular por alamar blue através da densidade óptica. O índice de seletividade dos compostos foi determinado por meio da expressão: LD₅₀ em células de mamífero/ IC₅₀ em amastigotas.

6. Avaliação da atividade de aspártico protease

O extrato de *L. amazonensis* foi obtido de acordo com metodologia descrita previamente (Alves e cols, 2005). Os promastigotas (1×10^8 células/mL) foram centrifugados e lavados 3 vezes com PBS pH 7,2. As células foram ressuspensas em 1 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, contendo 1 % de CHAPS e submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento. Os extratos foram mantidos por 40 minutos em freezer e então centrifugados por 30 minutos, 30.000g a 4 °C. O sobrenadante obtido foi aliqotado e mantido em freezer a -70 °C por até 4 dias. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e cols., (1951).

Para o ensaio de inibição de atividade enzimática, cerca de 10 µg do extrato bruto dos parasitos foram pré-incubados com as hidroxietilaminas ou um inibidor clássico de aspártico proteases (Pepstatina A 0,2 mg/mL), a 25 °C. Após 5 minutos, foram adicionados 2 µM de substrato fluorogênico específico para catepsina D (7-metoxicumarina-4-acetil-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-amida, Sigma-Aldrich) em um volume final de 60 µl, em tampão de ativação (acetato de sódio 0,1 M, cloreto de sódio 1 M, EDTA 1mM, DTT 1 mM, DMSO 10%, BSA 1 mg/mL, pH 4,7) (Matayoshi e cols, 1990).

A fluorescência foi monitorada durante 20 minutos continuamente em fluorímetro (SpectraMax Gemini xps, Molecular Devices, CA, USA), com um comprimento de onda de excitação de 328 nm e de emissão de 393 nm. Os ensaios foram controlados verificando a auto-liberação do conjugado fluorogênico nos mesmos intervalos de tempo. A atividade enzimática foi expressa em percentual da fluorescência gerada após 20 minutos por miligrama de proteína em relação ao controle sem inibidores.

7. Extração de Lípidos

Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados na ausência ou na presença de PMTB10 e PLIP27, nas concentrações indicadas, por 72 horas a 26° C. Os lipídeos foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (1959). Após a incubação, as células foram lavadas em PBS, contadas e centrifugadas novamente. Ao pellet, foi adicionada uma mistura de metanol, clorofórmio e água (2:1:0,5 v/v). Após agitação de 5 em 5 minutos por 1 hora, a suspensão foi centrifugada por 20 min a 1.250 g e o sobrenadante, contendo os lipídeos, foi separado do precipitado. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, tendo sido adicionado da mesma mistura de solventes descrita acima, seguindo-se agitação de 5 em 5 minutos por 1 hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram unificados e a eles adicionados água destilada e clorofórmio (1:1 v/v). Após 40 segundos de agitação, o material foi novamente centrifugado (1.250 g/30 min). A fase inferior (orgânica), contendo os lipídeos, foi então separada com o auxílio de pipeta Pasteur e transferida para tubos de 1,5 ml, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union city, CA, USA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N₂) e os lipídeos analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/EM), conforme descrito a seguir.

8. Análise do perfil de esteróis por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com as hidroxietilaminas e seus lipídeos neutros foram extraídos como descrito no item 6. Para a separação e identificação dos esteróis foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS). As amostras foram injetadas no equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão). Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50°C por 1 minuto e então aumentada a 270°C na razão de 10°C/min e finalmente a 300°C na razão de 1°C/min. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a 1,1 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 280 °C, respectivamente (Torres-Santos et al, 2009). A identificação dos esteróis foi feita por comparação do espectro de massas de cada sinal obtido no cromatograma com a biblioteca de espectros fornecida pelo fabricante do aparelho.

9. Análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das hidroxietilaminas

Visando o futuro ensaio *in vivo* das substâncias mais promissoras, verificamos a aderência das moléculas aos descritores moleculares conhecidos como “Regra dos Cinco de Lipinski” (Lipinski 2004; Lipinski et al. 2001) e realizamos a análise *in silico* das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) das séries PLIPs e PMTBs utilizando a ferramenta admetSAR (Cheng et al. 2012). Os descritores moleculares de Lipinski são: peso molecular menor ou igual a 500 g/mol; clogP menor ou igual a 5; máximo de cinco grupos doadores de ligação de hidrogênio; máximo de dez grupos aceptores de ligação de hidrogênio. Esses parâmetros foram calculados utilizando o programa MedChem Designer versão 2.5 (Simulations Plus). A análise *in silico* admetSAR é uma base de dados que inclui modelos de avaliação qualitativa e quantitativa que permite estimar estas propriedades para novos compostos químicos. Para realizar o teste desses parâmetros, geramos os “*smiles*” (*simplified molecular-input line-entry system*), uma forma de notação em linha que descreve a estrutura química da substância (Tab. 5). Foram avaliados preditivamente os seguintes parâmetros: absorção intestinal humana, permeabilidade em células Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma colo-retal humano), absorção através da barreira hematoencefálica, metabolismo por enzimas do citocromo P450, teste de AMES, carcinogenicidade e toxicidade oral aguda.

Tabela 6. Representação em forma de smiles das séries PLIP e PMTB.

Molécula	Smiles
PLIP01	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CNCc1cc2c(OCO2)cc1)Cc3ccccc3</chem>
PLIP01D	<chem>c12c(OCO1)ccc(c2)CNC[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PLIP02	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(Br)cc1)Cc2cc3c(OCO3)cc2)Cc4ccccc4</chem>
PLIP03	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(Br)cc1)(Cc2cc3c(OCO3)cc2)C[C@H]([C@H](Cc4ccccc4)N)O</chem>
PLIP18	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)C)Cc2cc3c(OCO3)cc2)Cc4ccccc4</chem>
PLIP19	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)C)(Cc2cc3c(OCO3)cc2)C[C@H]([C@H](Cc4ccccc4)N)O</chem>
PLIP26	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc([N](=O)=O)cc1)Cc2cc3c(OCO3)cc2)Cc4ccccc4</chem>
PLIP27	<chem>[N](=O)(=O)c1ccc(S(N(Cc2cc3c(OCO3)cc2)C[C@H]([C@H](Cc4ccccc4)N)O)(=O)=O)cc1</chem>
PLIP33	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)N)Cc2cc3c(OCO3)cc2)Cc4ccccc4</chem>
PLIP40	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(F)cc1)Cc2cc3c(OCO3)cc2)Cc4ccccc4</chem>
PLIP41	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(F)cc1)(Cc2cc3c(OCO3)cc2)C[C@H]([C@H](Cc4ccccc4)N)O</chem>
PMTB01	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc([N](=O)=O)cc1)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB02	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(Br)cc1)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB03	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(Br)cc1)(Cc2ccccc2)C[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PMTB04	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(F)cc1)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB05	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(F)cc1)(Cc2ccccc2)C[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PMTB06	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)C)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB07	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)C)(Cc2ccccc2)C[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PMTB08	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(OC)cc1)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB09	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(OC)cc1)(Cc2ccccc2)C[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PMTB10	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)N)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>
PMTB11	<chem>N(S(=O)(=O)c1ccc(cc1)N)(Cc2ccccc2)C[C@H]([C@H](Cc3ccccc3)N)O</chem>
PMTB12	<chem>C(=O)(OC(C)(C)C)N[C@H]([C@H](O)CN(S(=O)(=O)c1ccc(c1)Cc2ccccc2)Cc3ccccc3</chem>

10. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata e repetidos pelo menos 2 vezes. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando teste ANOVA e teste t de Student. No teste ANOVA foram utilizados pós-testes de Bonferroni ou Dunnett.

IV- RESULTADOS

4.1. Atividade das hidroxietilaminas sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As 23 hidroxietilaminas apresentadas neste trabalho, derivadas do inibidor amprenavir, foram testadas em promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas foram incubados por 72 horas com diferentes concentrações das substâncias. Os mais potentes, que apresentaram IC₅₀ mais baixos foram PLIP33, PLIP41, PLIP2, PLIP1D, PMTB12 e PMTB4, com valores de 1,9; 2,3; 3,1; 3,3; 4,6 e 7,6 µM, respectivamente (Tab. 7).

Tabela 7. Atividade antipromastigota das HEAs em *L. amazonensis*

Hidroxietilaminas	Atividade antipromastigota IC ₅₀ (µM) (DP)
PMTB1	16,0 (0,08)
PMTB3	170,0 (1,80)
PMTB4	7,6 (0,50)
PMTB5	> 200
PMTB6	15,9 (0,15)
PMTB7	> 200
PMTB8	15,1 (0,15)
PMTB9	> 200
PMTB10	15,7 (0,30)
PMTB11	12,5 (0,11)
PMTB12	4,6 (0,32)
PMTB21	196,0 (2,00)
PLIP1	23,0 (0,37)
PLIP1D	3,3 (0,30)
PLIP2	3,1 (0,60)
PLIP3	12,1 (0,46)
PLIP18	> 200
PLIP19	8,3 (0,07)
PLIP26	> 200
PLIP27	11,6 (0,72)
PLIP33	1,9 (0,12)
PLIP40	> 200
PLIP41	2,3 (0,55)
PMIC4 ²	11,6

As hidroxietilaminas com IC₅₀ menor que 10 µM foram marcadas na Tabela. ²A PMIC4 foi incluída como referência. DP: Desvio padrão da média.

4.2. Atividade das hidroxietilaminas sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Depois de demonstrar a atividade contra a forma encontrada no inseto vetor, selecionamos as 15 HEAs que tiveram IC₅₀ menor que 25µM e fomos testar na forma intracelular, de maior relevância clínica. Para este teste, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* e incubados por 72 horas com diferentes concentrações dos compostos.

As 15 hidroxietilaminas testadas apresentaram IC₅₀ menor que 3µM (Tab. 8). O IC₅₀ foi calculado a partir do índice de infecção de cada substância. Este índice correlaciona o percentual de macrófagos infectados com o número de amastigotas por macrófago.

Tabela 8. IC₅₀ da atividade anti-amastigota das HEAs em *L. amazonensis*

Hidroxietilaminas	Atividade anti-amastigota - IC ₅₀ (µM) (DP)
PMTB1	2,7 (0,30)
PMTB4	1,9 (0,95)
PMTB6	2,7 (1,00)
PMTB8	2,2 (0,80)
PMTB10	4,4 (0,60)
PMTB11	2,9 (0,20)
PMTB12	0,4 (0,10)
PLIP1	4,9 (0,10)
PLIP1D	0,5 (0,05)
PLIP2	0,4 (0,09)
PLIP3	2,0 (1,00)
PLIP19	1,2 (0,60)
PLIP27	1,4 (0,09)
PLIP33	0,3 (0,10)
PLIP41	1,0 (0,04)
PMIC4	1,8

DP: Desvio padrão da média.

4.3. Toxicidade sobre células de mamíferos

Para avaliar a toxicidade das hidroxietilaminas, inicialmente macrófagos peritoneais murinos foram incubados com as substâncias. Foi possível notar que

algumas hidroxietilaminas possuem certa toxidez para as células de mamíferos, especialmente PLIP41, PLIP33 e PMTB12, apresentando LD₅₀ de 1,8; 3,5 e 3,9 µM, respectivamente (Tab. 9).

A toxicidade também foi avaliada usando as células de linhagem de fibroblasto de adenocarcinoma de pulmão humano MRC5. Nesse caso, PLIP3 apresentou maior toxidez, com LD₅₀ de 6,5 µM.

Na Tabela 9 comparamos os índices de seletividade das moléculas, que é a razão da LD₅₀ em macrófagos murinos, que representa a citotoxicidade em macrófagos, pelo IC₅₀ em amastigotas. Quanto maior este valor, a substância é menos tóxica ao macrófago e, desta forma, é capaz de matar as amastigotas de *L. amazonensis* sem afetar a célula hospedeira. As substâncias com os melhores índices de seletividade são PMTB1, PMTB4, PMTB11, PLIP2 e PLIP19. Os que apresentaram os menores índices de seletividade, ou seja, mais tóxicos aos macrófagos, são PMTB10, PLIP1 e PLIP41.

Tabela 9. Índice de seletividade das HEAs em *L. amazonensis*

Hidroxietilaminas	Toxidez em macrófagos murinos LD ₅₀ (µM)	Toxidez em células MRC5 LD ₅₀ (µM)	Índice de seletividade (LD ₅₀ MØ/IC ₅₀ <i>L. amazonensis</i>)
PMTB1	63,5	36,8	23,5
PMTB4	61,6	ND	32,4
PMTB6	36,4	ND	13,5
PMTB8	37,6	9,4	17,4
PMTB10	25,8	22,5	5,9
PMTB11	> 200	> 150	> 69
PMTB12	3,9	ND	9,5
PLIP1	40,8	63	8,3
PLIP1D	8,3	23,6	16,3
PLIP2	8,8	14,4	20,0
PLIP3	21,3	6,5	10,7
PLIP19	24,0	ND	20,0
PLIP27	23,7	10,9	17,0
PLIP33	3,5	58,3	12,5
PLIP41	1,8	ND	1,8
PMIC4	> 100	ND	> 55,6

4.4. Avaliação do espectro de atividade anti-amastigota das hidroxietilaminas, comparando diferentes protocolos experimentais.

As dez substâncias apresentadas na Tabela 10 foram selecionadas para testes em *L. major*, *L. mexicana* e *L. donovani*, e outra cepa de *L. amazonensis*. A razão de infecção utilizada para cada espécie foi de acordo com o número de parasitos por macrófago em um patamar aceitável. Como pode ser observado na tabela, $IC_{50} > 10\mu M$ indica que a maior concentração testada, $30\mu M$, foi tóxica.

As que se destacaram foram PMTB1, PMTB8, PMTB10, PLIP1, PLIP27 e PLIP33. Notamos que as substâncias foram mais ativas contra *L. amazonensis* e *L. major*.

Nesta Tabela, os valores da primeira linha de cada substância para IC_{50} e IC_{90} (a) foram calculados considerando apenas o percentual de células infectadas. Os valores da segunda linha para IC_{50} e IC_{90} (b) foram calculados considerando o índice de infecção.

Existe uma diferença significativa entre os dois valores observados. Essa diferença se deve ao fato de considerarmos o número de amastigotas intracelulares no segundo método, além do percentual de células infectadas, e essa consideração é muito importante para a avaliação da atividade.

Tabela 10. Atividade anti-mastigota das HEAs em diferentes espécies de *Leishmania* em μM .

HEAs	<i>L.amazonensis</i> 3:1		<i>L.major</i> 3:1		<i>L.mexicana</i> 5:1		<i>L.donovani</i> 7:1	
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
PMTB1	5,5 _a	>10 _a	10,3 _a	>30 _a	>30	>30	>30	>30
	1,2 _b	5,4 _b	1,8 _b	2,7 _b				
PMTB8	0,9 _a	2,0 _a	>3,3	>10	>3,3	>10	>10	>10
	0,4 _b	1,1 _b						
PMTB10	3,5 _a	8,4 _a	6,5 _a	>10 _a	6,9	>10	>10	>10
	0,9 _b	2,2 _b	1,0 _b	9,1 _b				
PMTB11	>10 _a	>10 _a	21,1	>30	>30	>30	>30	>30
	5,2 _b	22,1 _b						
PLIP1	4,7 _a	9,3 _a	>10	>10	>10	>10	>10	>30
	2,6 _b	4,1 _b						
PLIP1D	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
PLIP2	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>30	>30
PLIP3	>1,1	>3,3	>3,3	>3,3	>3,3	>3,3	>3,3	>3,3
PLIP27	>3,3	>3,3	3,6 _a	7,4 _a	>10	>10	>10	>10
			0,7 _b	5,2 _b				
PLIP33	4,9 _a	>10 _a	>10	>10	>30	>30	>30	>30
	3,0 _b	3,9 _b						
Miltefosina	10,2 _a	17,9 _a	7,3 _a	>30 _a	19,1	>30	6,6	30,0
	16,8 _b	29,5 _b	<1,1 _b	6,1 _b				

^a Calculado considerando apenas o percentual de células infectadas. ^b Calculado considerando o índice de infecção, como descrito na metodologia.

Fomos então avaliar razões de infecção diferentes das apresentadas na Tabela 9 e diferentes tempos de incubação, como mostra a Tabela 11. Para *L. amazonensis* e *L. major* infectamos na razão 1:1 e 3:1 e para *L. mexicana* utilizamos a razão 4:1 e 5:1 (parasitos/macrófago). Para *L. amazonensis* e *L. major*, a infecção com 1:1 gerou valores maiores de IC₅₀ e IC₉₀. Para *L. mexicana* não houve diferença significativa entre as razões 4:1 e 5:1. Em relação ao tempo de incubação, observamos que tempos maiores (5 dias) geraram valores menores de IC₅₀ para *L. major* e *L. mexicana*.

Tabela 11. Atividade anti-amastigota em diferentes razões de infecção, tempo de incubação e diferentes espécies de *Leishmania*

HEAs	<i>L. amazonensis</i> IC (µM)				<i>L. major</i> IC (µM)						<i>L. mexicana</i> IC (µM)					
	1:1 3 dias		3:1 3 dias		1:1 3 dias		3:1				4:1				5:1 3 dias	
							3 dias		5 dias		3 dias		5 dias			
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
PMTB1			5,5 _a	>10 _a			10,3 _a	>30 _a	5,8	>10	>30	>30			>30	>30
			1,2 _b	5,4 _b			1,8 _b	2,7 _b								
PMTB10	8,0 _a	9,3 _a	3,5 _a	8,4 _a	8,6 _a	10,3 _a	6,5 _a	>10 _a	4,5	7,5	9,3 _a	>10 _a	7,2	9,8	6,9	>10
	5,5 _b	8,3 _b	0,9 _b	2,2 _b	5,0 _b	13,3 _b	1,0 _b	9,1 _b			5,0 _b	8,2 _b				
PLIP27	9,5 _a	10,7 _a	>3,3	>3,3	5,7 _a	10,7 _a	3,6 _a	7,4 _a	3,3	5,3	16,8 _a	>10 _a	>3,3	>10	>10	>10
	3,1 _b	12,5 _b			2,5 _b	4,8 _b	0,7 _b	5,2 _b			6,1 _b	10,7 _b				
Miltefosina	27,6 _a	>30 _a	10,2 _a	17,9 _a	26,8 _a	>30 _a	7,3 _a	>30 _a	4,2	>30	18,5 _a	>30 _a	14,0	22,1	19,1	>30
	10,8 _b	42,9 _b	16,8 _b	29,5 _b	6,1 _b	21,9 _b	<1,1 _b	6,1 _b			5,6 _b	24,1 _b				

^a Calculado considerando apenas o percentual de células infectadas. ^b Calculado considerando o índice de infecção, como descrito na metodologia.

4.5. Estudos de combinação da PLIP27 com miltefosina em *L. major*

Considerando os parâmetros de atividade e seletividade, selecionamos a PLIP27 para o estudo de associação com miltefosina, fármaco disponível para o tratamento por via oral da leishmaniose. O estudo de combinação de fármacos pode levar ao encontro de associações sinérgicas ou aditivas, que podem sugerir novas alternativas para o tratamento da doença. A metodologia mais utilizada para avaliar o efeito de associação de fármacos é o cálculo da somatória das concentrações inibitórias fracionárias (Σ CIF). Este índice relaciona os valores de IC_{50} empregados na associação com os valores de IC_{50} dos fármacos isolados (Seifert et al., 2011).

Na Tabela 12 temos os valores de IC_{50} da miltefosina, da PLIP27 e da associação de PLIP27 e miltefosina em *L. major*. Nesta Tabela também temos os valores de CIF das associações e Σ CIF. A interação foi classificada de acordo com o valor de Σ CIF.

Tabela 12. Atividade anti-mastigota da associação de miltefosina e PLIP27 em *L. major*

	IC_{50} (μ M)	CIF (IC_{50} associação/ IC_{50} individual)	Σ CIF (soma das CIF)
Miltefosina	12,3	0,45	1,12
PLIP27	5,7	0,67	
Milt. + PLIP27	5,5 + 3,8	-	

Valores de Σ CIF maior que 0,5 e menor que 4 indicam associação indiferente (Odds, 2003). Desta forma, como o valor de Σ CIF encontrado para a associação de miltefosina e PLIP27 foi 1,12, consideramos esta associação como indiferente.

4.6. Efeito das hidroxietilaminas sobre a atividade enzimática de aspártico proteases de *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito das HEAs sobre a atividade de aspártico protease de *Leishmania*, 10 μ g de extrato bruto dos parasitos foram pré-incubados com as HEAs a 5, 10 e 20 μ g/mL e, após 5 minutos, com 2 μ M de substrato fluorogênico para catepsina D. A atividade enzimática foi expressa como percentual da fluorescência do produto gerado por miligrama de proteína após 20 minutos, em relação ao controle sem inibidor. A pepstatina A foi utilizada como controle de inibição.

As HEAs tiveram perfis diferentes de inibição da atividade proteolítica. Foi calculada a concentração capaz de reduzir em 50% a atividade enzimática (K_i) para cada HEA, e aquelas com maior capacidade inibitória foram: PMTB3, PMTB7, PMTB9, com valores de K_i de 21,3; 26,8 e 26,2 μM , respectivamente (Figs. 7 e 8). PMTB21 não foi capaz de inibir a degradação do substrato mesmo na concentração mais alta utilizada (Fig. 7).

Toda a série PLIP apresentou capacidade inibitória com valores de K_i maiores que 30 μM (Fig. 8).

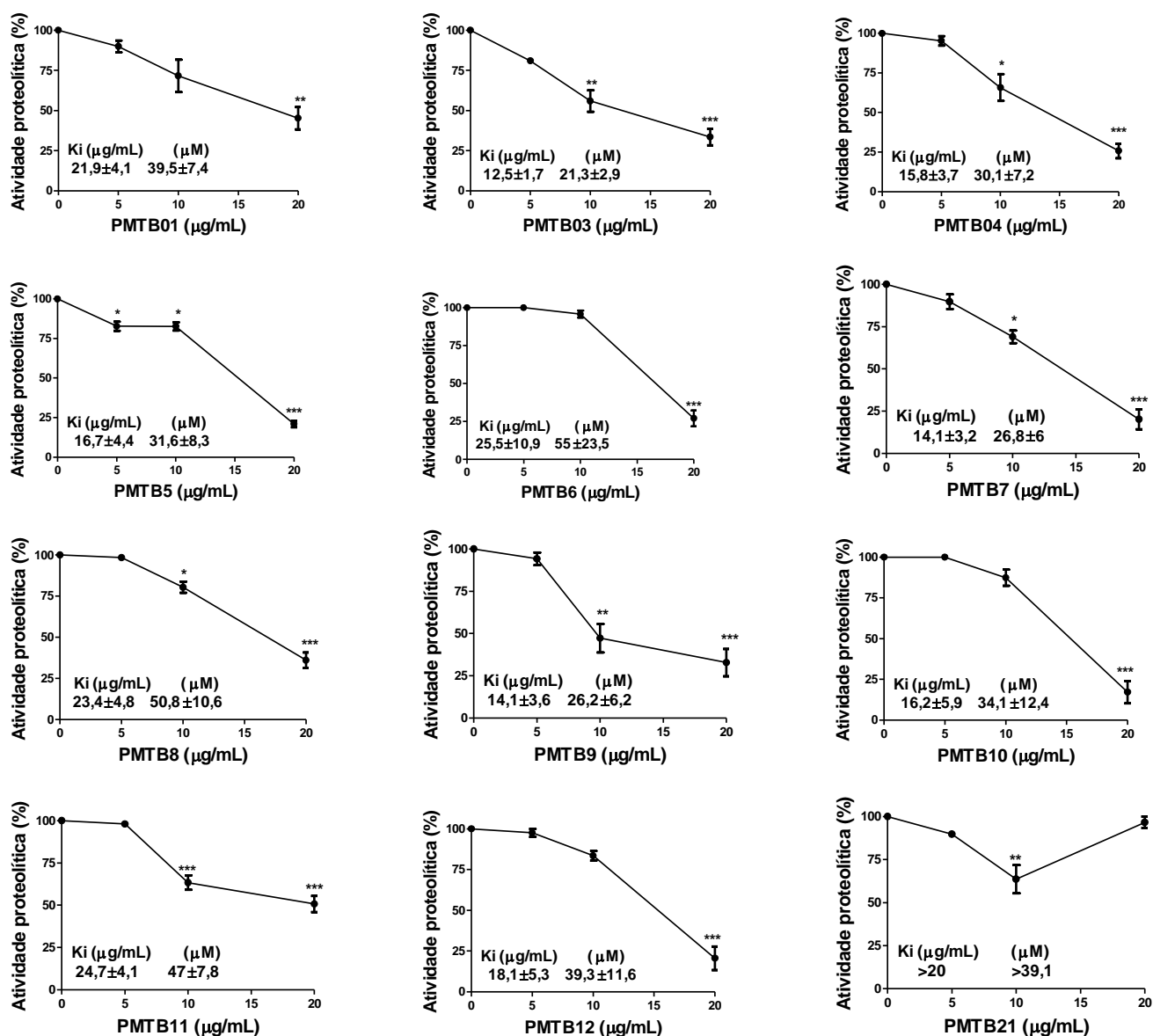


Figura 7. Inibição da atividade de aspártico protease de *L. amazonensis* pelas moléculas da série PMTB. O extrato proteico solúvel de *L. amazonensis* foi incubado na presença ou ausência (controle) de HEAs nas concentrações indicadas e a atividade proteolítica foi avaliada utilizando-se substrato fluorogênico para catepsina D. O ensaio de atividade enzimática ocorreu em pH 4,7 por 20 minutos, a leitura realizada em fluorímetro. Os gráficos, obtidos no programa Graphpad Prism 5,

baseiam-se na média \pm SD, sendo que cada um representa quatro ou cinco experimentos independentes, em triplicata. A fluorescência obtida sem inibidor foi considerada como 100% de atividade enzimática. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

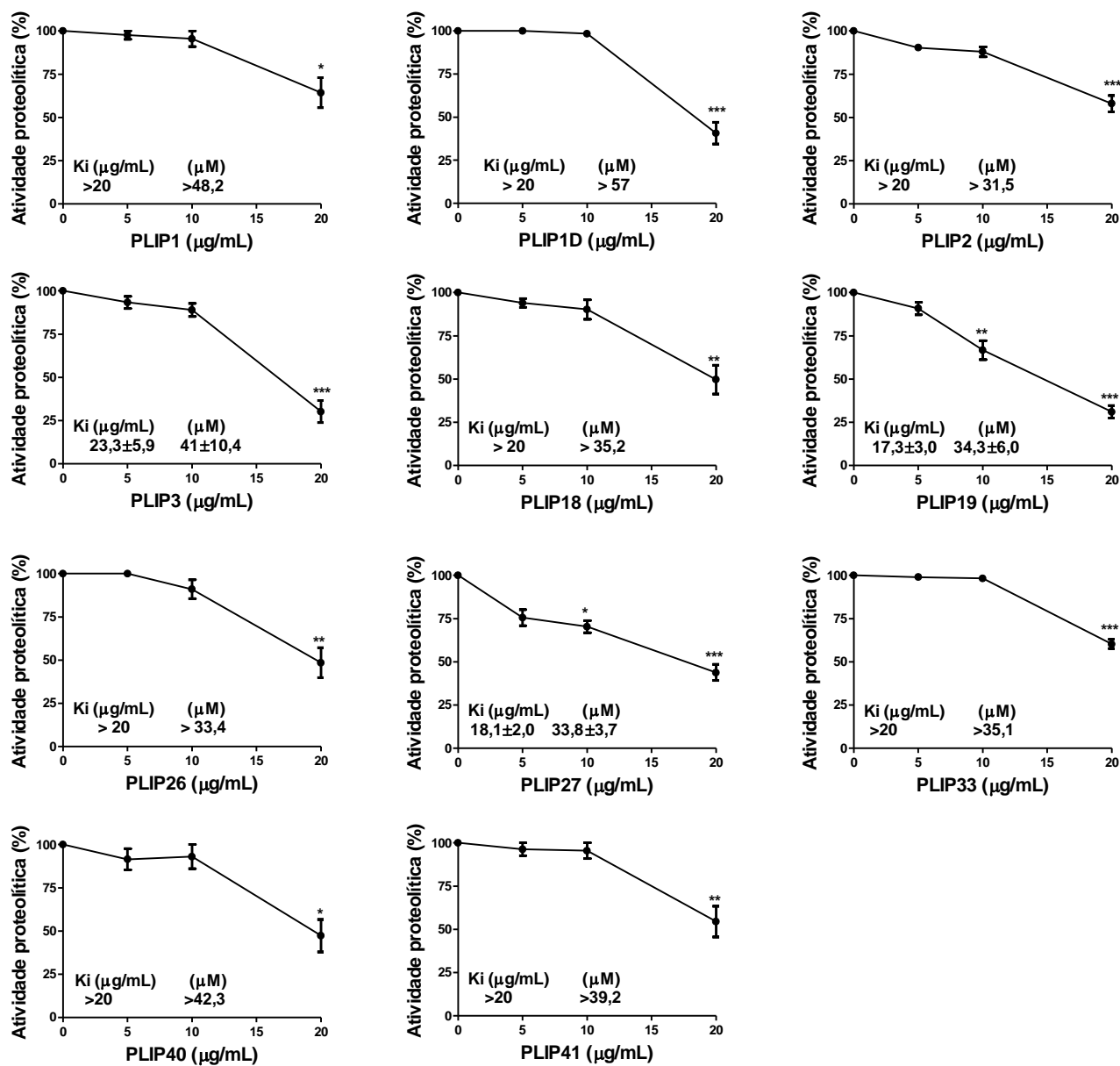


Figura 8. Inibição da atividade de aspártico proteases de *L. amazonensis* pelas moléculas da série PLIP. O extrato proteico solúvel de *L. amazonensis* foi incubado na presença ou ausência (controle) de HEAs nas concentrações indicadas e a atividade proteolítica foi avaliada utilizando-se o substrato fluorogênico para catepsina D. O ensaio de atividade enzimática ocorreu em pH 4,7 por 20 minutos no fluorímetro. Os gráficos, obtidos no programa Graphpad Prism 5, baseiam-se na média \pm SD, sendo que cada um representa quatro ou cinco experimentos independentes, em triplicata. A fluorescência obtida sem inibidor foi considerada como 100% de atividade enzimática. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

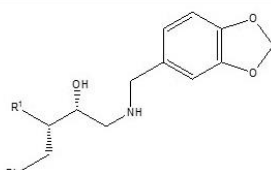
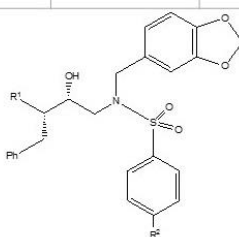
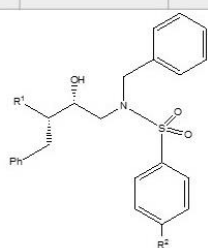
4.7. Correlação entre a atividade leishmanicida em promastigotas, a inibição da atividade de aspártico protease em *L. amazonensis* e a estrutura das hidroxietilaminas

Montamos a Tabela seguinte (Tab. 13) para correlacionar a atividade leishmanicida das hidroxietilaminas em promastigotas de *L. amazonensis*, seu efeito sobre a atividade enzimática de aspártico protease e a estrutura de cada série. Observamos que estas atividades podem ou não estar interligadas. Consideramos positivas as atividades leishmanicida e de inibição enzimática com valores de IC_{50} e K_i menores que 35 μ M para ambos os parâmetros.

Considerando esse valores de *cut-off*, foi possível dividir as HEAs em quatro grupos, da seguinte forma: G1 – Substâncias que foram positivas para ambas atividades; G2 – Substâncias que foram positivas para atividade leishmanicida e negativas para inibição de protease; G3 – Substâncias que foram negativas para atividade leishmanicida e positivas para inibição de protease; G4 – Substâncias que foram negativas para ambas atividades. Esses resultados foram sumarizados na Figura 9. Ao analisar esses resultados, podemos observar que os grupos 1 e 4 se relacionam entre si e suportam a hipótese do mecanismo de ação das HEAs ser a inibição de aspártico proteases. Quando ocorre inibição enzimática, também ocorre inibição da proliferação dos parasito (G1) e quando as mudanças estruturais levam à perda da atividade de inibição enzimática, ocorre também a perda da atividade leishmanicida (G4). Porém, a maioria das HEAs se encaixou no grupo 2 (Figura 9), quando a atividade leishmanicida está presente, mesmo sem haver inibição enzimática. Esse dado sugere um mecanismo de ação independente da atividade de aspártico protease. Um aspecto que merece destaque é a ocorrência de substâncias no grupo 3 (PMTB03, PMTB05, PMTB07 e PMTB09), quando a inibição da atividade de aspártico protease está presente, mas não ocorre inibição da proliferação da forma promastigota dos parasitos. Essa dado sugere que a inibição de aspártico proteases não necessariamente se relaciona com a perda de viabilidade dos parasitos.

Fazendo a relação da atividade com as estruturas das séries, observamos um padrão entre as hidroxietilaminas. É possível notar uma forte correlação com a presença de uma amina primária como substituinte em R1 ou R2. Quando a amina é secundária, com a presença de um grupamento Boc, na maioria dos casos ocorre perda da atividade, sugerindo interferência na associação com o alvo.

Tabela 13. Relação entre estrutura, atividade leishmanicida, inibição de aspártico proteases e índice de seletividade

						
	R1		Atividade Antipromastigota	Inibição enzimática	Atividade antimastigota	Índice de seletividade (>10)
PLIP 01	NHBoc		+	-	+	-
PLIP 01d	NH ₂ , HCL		+	-	+	+
						
	R1	R2	Atividade antipromastigota	Inibição enzimática	Atividade antiamastigota	Índice de seletividade (>10)
PLIP 02	NHBoc	Br	+	-	+	+
PLIP 03	NH ₂ , HCl	Br	+	-	+	+
PLIP 18	NHBoc	Me	-	-	NT	NT
PLIP 19	NH ₂ , HCl	Me	+	+	+	+
PLIP26	NHBoc	NO ₂	-	-	NT	NT
PLIP 27	NH ₂ , HCl	NO ₂	+	+	+	+
PLIP 33	NHBoc	NH ₂	+	-	+	+
PLIP 40	NHBoc	F	-	-	NT	NT
PLIP 41	NH ₂ , HCl	F	+	-	+	-
						
	R1	R2	Atividade antipromastigota	Inibição enzimática	Atividade antiamastigota	Índice de seletividade (>10)
PMTB 01	NHBoc	NO ₂	+	-	+	+
PMTB 03	NHBoc	Br	-	+	NT	NT
PMTB 04	NH ₂ , HCl	Br	+	+	+	+
PMTB 05	NHBoc	F	-	+	NT	NT
PMTB 06	NH ₂ , HCl	F	+	-	+	+
PMTB 07	NHBoc	Me	-	+	NT	NT
PMTB 08	NH ₂ , HCl	Me	+	-	+	+
PMTB 09	NHBoc	OMe	-	+	NT	NT
PMTB 10	NH ₂ , HCl	OMe	+	+	+	-
PMTB 11	NHBoc	NH ₂	+	-	+	+
PMTB 12	NH ₂ , HCl	NH ₂	+	-	+	-
PMTB 21	NHBoc	H	-	-	NT	NT

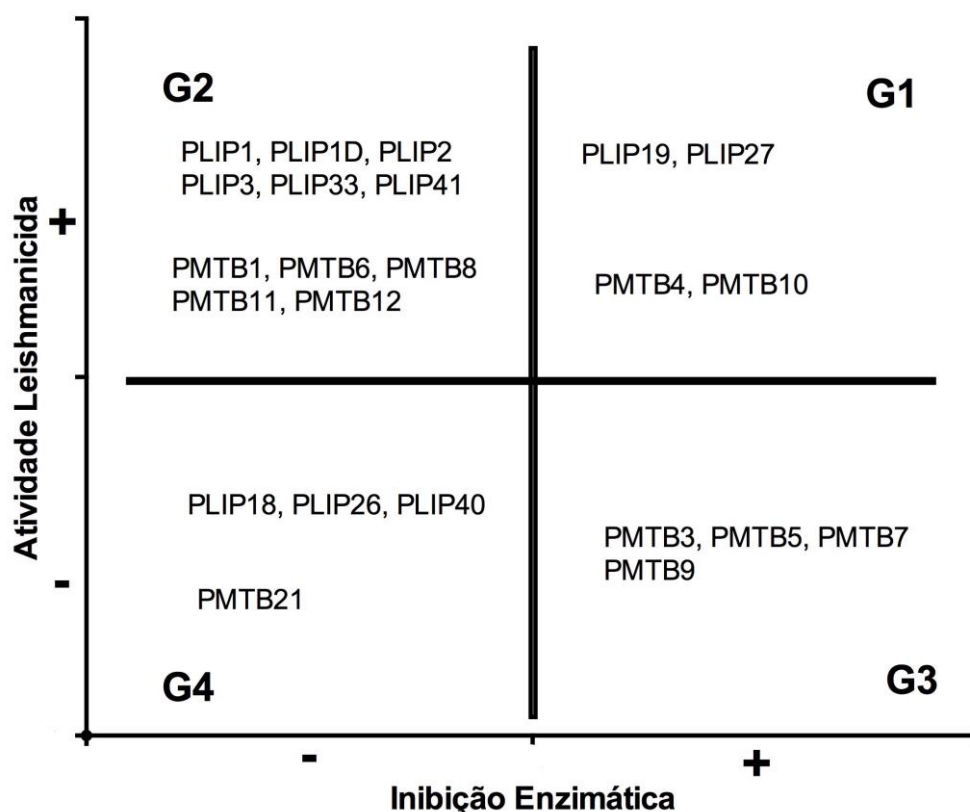


Figura 9. Representação gráfica da classificação das HEAs em diferentes grupos, de acordo com sua atividade. As hidroxiethylaminas (HEAs) foram classificadas de acordo com sua atividade leishmanicida sobre promastigotas de *L. amazonensis* e a inibição da atividade de aspártico protease, considerando o *cut-off* de 35 μ M, da seguinte forma: Considerando esse valores de *cut-off*, foi possível dividir as HEAs em quatro grupos, da seguinte forma: G1 – Substâncias que foram positivas para ambas atividades; G2 – Substâncias que foram positivas para atividade leishmanicida e negativas para inibição de protease; G3 – Substâncias que foram negativas para atividade leishmanicida e positivas para inibição de protease; G4 – Substâncias que foram negativas para ambas atividades. Os valores de IC_{50} e K_i podem ser encontrados nas Tabelas 7 e 8 e Figuras 7 e 8.

4.8. Análise do perfil de esteróis de promastigotas de *L. amazonensis* após incubação com PMTB10 e PLIP27

Considerando que alguns inibidores de aspártico protease do HIV também inibem enzimas do complexo citocromo P450 oxidase (CYP) e que a principal enzima da biossíntese de esteróis considerada como alvo farmacológico nos tripanossomatídeos pertence a essa classe (C14-desmetilase/CYP51), fomos avaliar o efeito das HEAs sobre o perfil de esteróis do parasito. Selecionamos PMTB10 e PLIP27 para os ensaios pois essas moléculas apresentaram os melhores resultados de IC_{50} e IC_{90} nas diferentes espécies de *Leishmania* (Tabela 10). Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados com PMTB10 ou PLIP27 por 72 horas e seus esteróis foram analisados por GC/MS. Na Figura 10 podemos observar o perfil cromatográfico dos esteróis dos parasitos tratados com diferentes concentrações das moléculas descritas. É importante notar que

a concentração de cada esteroide na amostra é diretamente proporcional à área do seu respectivo sinal. Dessa forma, uma análise mostrando a quantidade relativa percentual de cada esteroide foi realizada através da integração da área dos picos (Tabela 14). Observamos que não houve acúmulo de esteróides C14-metilados, 14α -metilergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol e 4α - 14α -dimetilergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol, (obtusifoliol), esteróides característicos da inibição da C-14 desmetilase (CYP51). No entanto, houve uma alteração na composição dos esteróides, como se vê na Tabela 13. Quando usamos PLIP27 a $11,6 \mu\text{M}$ ocorreu o acúmulo dos esteróides **17**, **18**, **19** (desconhecidos) e **20** (colesta 5,7-dien 3-ol), e quando usamos PLIP27 a $23,2 \mu\text{M}$ ocorreu o acúmulo dos esteróides **21** (colesta-22-ene-21-ol), **22**, **23** (desconhecidos)

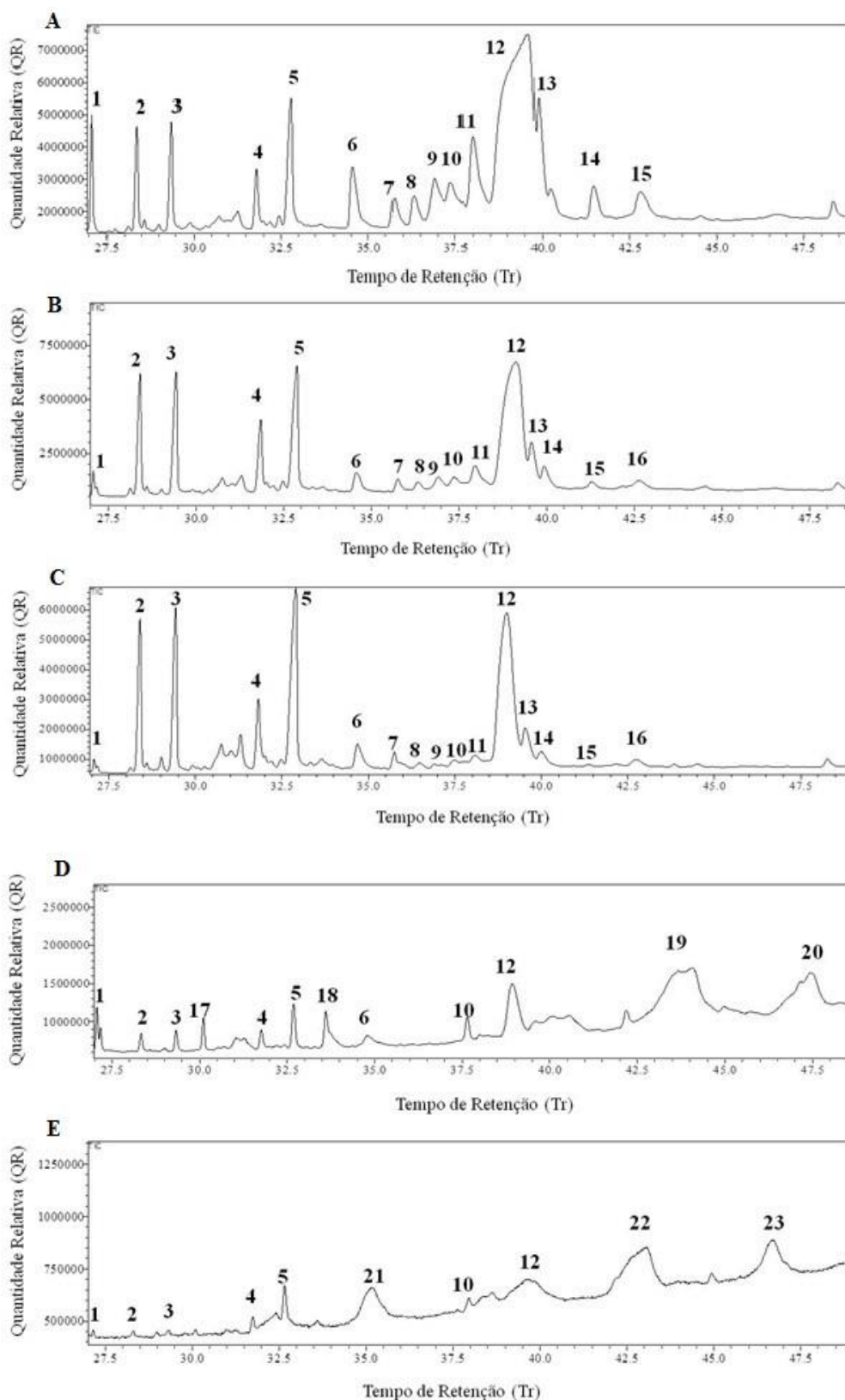


Figura 10. Efeito da PMTB10 e PLIP27 sobre o perfil de esteróis de *L. amazonensis*. Promastigotas de *L. amazonensis* foram crescidas com 15,7 e 31,4 μM de PMTB10 e 11,6 e 23,2 μM de PLIP27, ou somente meio de cultura por 72 horas. Os lipídeos neutros foram extraídos e analisados por GC-MS. Legenda: A- Controle; B- PMTB10 15,7 μM , C- PMTB10 31,4 μM ; D- PLIP27 11,6 μM e E- PLIP27 23,2 μM . (1) Esqualeno, (2) Ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol, (3) 22- Ergostatrieno, (4) Desconhecido, (5) Ergosta-4,7,22-trien-3 β -ol, (6) Colesterol, (7) Coesta-5,24-dien-3 β -ol (Desmosterol), (8) Ergosta-5,24 (28)-dien-3 β -ol, (9) Ergosta-5,7-dien-3 β -ol (24 desidroepisterol), (10) Ergosta-5,8 (14)-dien-3 β -ol, (11) 14 α -metilergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol, (12) Ergosta-5,7,24-trien-3 β -ol (desidroepisterol), (13) Ergosta-7,24-dien-3 β -ol (Episterol), (14) Desconhecido, (15) Lanosterol, (16) Estigmasta-4,7,22-trien-3 α -ol, (17) Desconhecido, (18) Desconhecido, (19) Desconhecido, (20) Coesta 5,7-dien 3-ol, (21) Coesta-22-ene-21-ol, (22) Desconhecido, (23) Desconhecido.

Tabela 14. Perfil de esteróis de *Leishmania amazonensis* tratada com PMTB10 e PLIP27

Substância	PM	CTL	PMTB10	PMTB10	PLIP27	PLIP27
			15,7 µM	31,4 µM	11,6 µM	23,2 µM
		Quantidade Relativa (%)				
(1) Esqualeno	410	3,67	0,9	0,88	2,17	0,84
(2) Ergosta-5,8,22-trien-3β-ol	396	4,21	9,4	10,57	1,46	0,43
(3) 22- Ergostatrieno	378	4,78	11,05	12,94	1,44	0,54
(4) Desconhecido	376	2,65	5,45	4,96	1,61	1,57
(5) Ergosta-4,7,22-trien-3β-ol	396	7,91	13,49	21,97	4,55	4,97
(6) Colesterol	386	5,55	2,58	2,95	1,72	-
(7) Colesta-5,24-dien-3β-ol (Desmosterol)	384	2,5	1,41	0,98	-	-
(8) Ergosta-5,24 (28)-dien-3β-ol	398	2,14	0,84	0,35	-	-
(9) Ergosta-5,7-dien-3β-ol (24 desidroepisterol)	396	2,88	1,24	0,26	-	-
(10) Ergosta-5,8 (14)-dien-3β-ol	398	1,41	0,72	0,31	2,64	0,9
(11) 14α-metilergosta-8,24(28)-dien-3β-ol	412	7,91	2,53	0,51	-	-
(12) Ergosta-5,7,24-trien-3β-ol (desidroepisterol)	396	45,04	44,51	39,46	16,36	10,03
(13) Ergosta-7,24-dien-3β-ol (Episterol)	398	2,68	2,55	1,73	-	-
(14) Desconhecido	398	0,81	1,81	1,19	-	-
(15) Lanosterol	426	3,15	0,79	0,1	-	-
(16) Estigmasta-4,7,22-trien-3-ol	410	2,71	0,73	0,84	-	-
(17) Desconhecido	-	-	-	-	2,64	-
(18) Desconhecido	-	-	-	-	4,75	-
(19) Desconhecido	426	-	-	-	38,68	-
(20) Colesta 5,7-dien 3-ol	426	-	-	-	21,98	-
(21) Colesta-22-ene-21-ol	498	-	-	-	-	15,31
(22) Desconhecido	-	-	-	-	-	46,64
(23) Desconhecido	-	-	-	-	-	18,77

4.9. Análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas das moléculas da série PMTB e PLIP

Avaliamos a aderência das características químicas das séries PLIP e PMTB à “Regra dos Cinco” (Ro5) de Lipinski e o perfil de suas propriedades farmacocinéticas *in silico* (Cheng et al. 2012; Lipinski 2004; Lipinski et al. 2001). A análise Ro5 sugeriu um perfil favorável para: PMTB3, PMTB5, PMTB9, PMTB11 e também PLIP1, PLIP1D, PLIP19, PLIP27, PLIP41, visto que elas não violam nenhum dos descritores moleculares da Ro5 (Tabela 15 e Tabela 16), parâmetros físico-químicos associados à probabilidade de um candidato a fármaco ter uma boa disponibilidade oral.

A análise na plataforma admetSAR apontou que ambas as séries PMTB e PLIP apresentam uma alta probabilidade de absorção intestinal humana, apesar do resultado contraditório da permeabilidade em modelo Caco-2 como apresentado nas Tabelas 17 e 18. Ambas as séries não mostram potencial mutagênico (teste de AMES) ou carcinogênico, e ficaram enquadradas na categoria III para a toxicidade oral aguda (compostos com valor de DL₅₀ superior a 500 mg/kg, mas inferior a 5000 mg/kg). Quanto à avaliação *in silico* de sua metabolização como substrato ou possível inibidor de enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450), observamos que a inserção do grupo Boc aumenta a probabilidade de serem metabolizadas pela CYP450 3A4. Quanto ao perfil de atuar como inibidores de CYPs, a principal CYP que tem probabilidade de ser inibida é a 3A4, e que há uma relação estrutura-atividade nessa provável inibição. Como observado na Tabela 18, a adição do Boc na PLIP1 em relação a PLIP1D alterou a probabilidade de inibidor para não inibidor, e a adição do Boc junto a um substituinte em R² como na PLIP40 em comparação com a PLIP41 há um aumento na probabilidade de inibição da CYP450 3A4 de 77,3% para 93,9%. O mesmo padrão de resultado foi encontrado para série PMTB (Tabela 17).

Tabela 15. Análise dos descritores moleculares de Lipinski (Ro5[#]) da série PMTB

PMTB	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
clogP (≤ 5)	4,1	4,3	3,2	4,0	2,8	3,9	2,6	3,7	2,5	2,8	1,504	3,613
PM (≤ 500)	555,6	589,5	489,4	528,6	428,5	524,6	424,5	540,6	440,5	525,6	425,5	510,6
NHBD (≤ 5)	2	2	3	2	3	2	3	2	3	4	5	2
NHBA (≤ 10)	10	7	5	7	5	7	5	8	6	8	6	7
Nº de Violações Ro5	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

NHBA- Número de aceptores de ligação de Hidrogênio; NHBD- Número de doadores de ligação de hidrogênio; clogP- Logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água; PM- Peso Molecular. [#]Regra dos cinco.

Tabela 16. Análise dos descritores moleculares de Lipinski (Ro5[#]) da série PLIP

PLIP	01	01D	02	03	18	19	26	27	33	40	41
clogP (≤ 5)	3,2	1,7	4,2	3,2	3,7	2,6	3,9	2,6	2,7	3,8	2,8
PM (≤ 500)	414,5	314,3	633,5	533,4	568,6	468,5	599,6	499,5	569,6	572,6	472,5
NHBD (≤ 5)	3	4	2	3	2	3	2	3	4	2	3
NHBA (≤ 10)	7	5	9	7	9	7	12	10	10	9	7
Nº de Violações Ro5	0	0	1	1	1	0	2	0	1	1	0

NHBA- Número de aceptores de ligação de Hidrogênio; NHBD- Número de doadores de ligação de hidrogênio; clogP- Logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água; PM- Peso Molecular. [#]Regra dos cinco.

Tabela 17. Análise Teórica dos parâmetros farmacocinéticos da série PMTB.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<i>Absorção</i>												
BBB	- (57,7)	+ (52,5)	+ (70,6)	+ (61,2)	+ (78,1)	- (53,3)	+ (67,9)	- (65,7)	+ (50,0)	+ (55,0)	+ (80,6)	- (53,3)
HIA	+ (99,1)	+ (96,8)	+ (99,6)	+ (97,7)	+ (100)	+ (97,4)	+ (100)	+ (95,7)	+ (98,7)	+ (95,2)	+ (99,4)	+ (97,4)
Caco-2	- (57,9)	- (59,8)	- (60,7)	- (59,9)	- (60,6)	- (60,3)	- (62,6)	- (59,8)	- (62,8)	- (55,5)	- (59,1)	- (60,3)
<i>Toxicidade</i>												
AMES	- (56,8)	- (63,9)	- (66,7)	- (64,3)	- (68,3)	- (67,4)	- (73,1)	- (65,9)	- (68,1)	- (65,3)	- (70,4)	- (67,6)
Carcinogênico	- (60,5)	- (66,1)	- (75,3)	- (65,2)	- (74,2)	- (67,1)	- (74,3)	- (69,4)	- (76,1)	- (69,5)	- (75,9)	- (67,1)
Tox. Oral Aguda	III (58,7)	III (56,6)	III (60,6)	III (56,2)	III (59,6)	III (57,8)	III (63,6)	III (58,5)	III (58,0)	III (58,7)	III (64,5)	III (57,8)
<i>Metabolismo</i>												
<i>Substrato</i>												
CYP450 2C9	NS (54,4)	NS (53,4)	NS (75,7)	NS (53,7)	NS (75,8)	S (52,8)	NS (62,9)	S (54,5)	NS (62,9)	NS (53,4)	NS (69,7)	S (52,8)
CYP450 2D6	NS (76,6)	NS (77,4)	NS (79,3)	NS (77,3)	NS (78,9)	NS (75,2)	NS (77,8)	NS (73,8)	NS (75,2)	NS (72,4)	NS (78,5)	NS (75,2)
CYP450 3A4	S (54,9)	S (53,5)	NS (60,9)	S (54,1)	NS (60,4)	S (51,8)	NS (60,8)	S (59,1)	S (51,8)	S (51,4)	NS (62,2)	S (51,8)
<i>Inibidor</i>												
CYP450 1A2	NI (74,5)	NI (73,5)	NI (61,9)	NI (77,3)	NI (67,8)	NI (84,5)	NI (81,3)	NI (82,7)	NI (79,1)	NI (79,5)	NI (72,5)	NI (84,5)
CYP450 2C9	NI (54,6)	NI (55,5)	NI (66,1)	NI (54,1)	NI (68,2)	NI (56,1)	NI (73,3)	NI (52,9)	NI (61,1)	NI (57,4)	NI (65,8)	NI (56,1)
CYP450 2D6	NI (80,7)	NI (81,5)	NI (73,3)	NI (77,4)	NI (75,8)	NI (83,6)	NI (83,9)	NI (85,1)	NI (86,3)	NI (84,8)	NI (83,1)	NI (83,6)
CYP450 2C19	I (51,9)	NI (51,2)	NI (53,9)	NI (52,6)	NI (54,0)	NI (55,3)	NI (64,7)	NI (57,8)	NI (57,2)	NI (51,2)	NI (59,3)	NI (55,3)
CYP450 3A4	I (52,8)	I (74,2)	I (60,0)	I (81,8)	I (66,3)	I (61,5)	NI (55,3)	I (56,3)	I (50,0)	I (50,0)	NI (52,2)	I (61,5)

Tabela 18. Análise Teórica dos parâmetros farmacocinéticos da série PLIP

	01	01D	02	03	18	19	26	27	33	40	41
<i>Absorção</i>											
BBB	- (81,5)	- (58,4)	- (54,8)	+ (54,8)	- (56,9)	+ (52,2)	- (57,6)	+ (62,5)	+ (50,0)	+ (53,1)	+ (62,6)
HIA	+ (94,1)	+ (93,8)	+ (96,9)	+ (96,8)	+ (97,4)	+ (98,4)	+ (99,1)	+ (99,0)	+ (95,2)	+ (97,8)	+ (97,7)
Caco-2	- (70,6)	- (64,1)	- (58,9)	- (60,1)	- (59,6)	- (62,5)	- (57,2)	- (59,4)	- (54,2)	- (58,9)	- (60,7)
<i>Toxicidade</i>											
AMES	- (68,5)	- (59,9)	- (59,0)	- (59,5)	- (59,9)	- (60,1)	- (54,3)	- (52,0)	- (58,3)	- (59,0)	- (59,8)
Carcinogênico	- (85,3)	- (89,8)	- (64,1)	- (73,5)	- (65,2)	- (73,3)	- (59,2)	- (67,2)	- (66,4)	- (63,2)	- (72,5)
Tox. Oral Aguda	III (60,0)	III (60,6)	III (56,2)	III (58,1)	III (56,2)	III (58,7)	III (53,2)	III (57,8)	III (56,5)	III (56,0)	III (57,6)
<i>Metabolismo</i>											
<i>Substrato</i>											
CYP450 2C9	NS (74,4)	NS (85,0)	NS (59,0)	NS (80,2)	NS (52,7)	NS (68,8)	NS (59,6)	NS (80,6)	NS (58,8)	NS (59,2)	NS (80,3)
CYP450 2D6	NS (73,2)	NS (71,2)	NS (75,4)	NS (77,6)	NS (71,9)	NS (74,8)	NS (75,4)	NS (77,7)	NS (69,5)	NS (75,4)	NS (77,4)
CYP450 3A4	S (63,7)	NS (69,3)	S (60,7)	NS (51,7)	S (60,9)	S (50,9)	S (61,6)	S (50,8)	S (59,7)	S (61,4)	NS (51,1)
<i>Inibidor</i>											
CYP450 1A2	NI (57,9)	NI (65,3)	NI (57,4)	I (50,1)	NI (70,4)	NI (66,9)	NI (64,5)	NI (60,9)	NI (65,9)	NI (59,7)	NI (51,5)
CYP450 2C9	NI (70,4)	NI (86,2)	I (53,6)	NI (50,7)	I (53,9)	NI (52,5)	I (50,8)	NI (51,4)	I (52,9)	I (51,7)	NI (53,5)
CYP450 2D6	NI (66,9)	NI (56,0)	NI (77,3)	NI (65,1)	NI (80,1)	NI (74,3)	NI (64,5)	NI (75,3)	NI (81,2)	NI (78,9)	NI (67,4)
CYP450 2C19	NI (62,4)	NI (68,9)	I (51,1)	NI (50,6)	NI (58,8)	NI (63,6)	NI (53,4)	NI (54,4)	NI (57,5)	NI (50,0)	NI (50,9)
CYP450 3A4	I (59,8)	NI (84,6)	I (93,1)	I (76,6)	I (90,0)	I (65,8)	I (90,6)	I (73,6)	I (86,9)	I (93,9)	I (77,3)

V- DISCUSSÃO

A toxicidade dos medicamentos atuais e o aumento da prevalência de resistência ilustram a necessidade contínua da busca de novos agentes quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses. Pacientes soropositivos para HIV tratados com HAART apresentam redução significativa na ocorrência, morbidade e mortalidade relacionadas a co-infecções causadas por bactérias, fungos e protozoários (Pozio e Morales, 2005; Valdivieso et al., 2010). Alguns estudos têm demonstrado que os IPs-HIV, componentes do HAART, atuam também como inibidores das proteases de patógenos (Pozio e Morales, 2005).

Não existem muitos estudos sobre aspártico proteases em *Leishmania*, mas alguns trabalhos têm descrito a atividade de aspártico protease em frações solúveis de extratos brutos do parasito (Alves et al., 2005; Valdivieso et al., 2007; Santos et al., 2009; Kumar et al., 2010). Embora a purificação e caracterização de aspártico proteases ainda não tenha sido totalmente realizada nesses parasitos, a atividade leishmanicida de diferentes IPs-HIV têm sido recentemente explorada (Cruz et al., 2006). Grupos independentes têm demonstrado que os IPs-HIV apresentam atividade sobre a proliferação de *Leishmania in vitro* (Savoia et al., 2005; Valdivieso et al., 2007; Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009; Valdivieso et al., 2010; Santos et al., 2013).

Neste trabalho avaliamos a atividade leishmanicida de intermediários de síntese de IPs-HIV. Esses intermediários, devido à sua semelhança estrutural com partes definidas dos IPs-HIV, além de candidatos a fármacos, podem ser ferramentas para a investigação não só de seu mecanismo leishmanicida, mas também para a investigação do mecanismo de ação dos IPs-HIV.

Os IPs-HIV são moléculas que apresentam um grupo hidroxietilamina em suas estruturas. Hidroxietilpiperazinas de primeira geração, utilizadas como precursoras na síntese do indinavir tiveram suas atividades leishmanicidas avaliadas em trabalho recente do nosso grupo (Vasconcelos et al., 2014), no qual a molécula PMIC4 destacou-se como a mais ativa contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. No presente trabalho, a atividade leishmanicida, atividade de inibição de aspártico protease e mecanismos de ação de hidroxietilaminas análogas ao amprenavir (PMTBs e PLIPs) foram avaliadas em diferentes espécies de *Leishmania*.

A atividade antipromastigota de IPs-HIV já foi demonstrada para diferentes espécies. Estudos demonstraram a atividade dos inibidores indinavir e saquinavir contra promastigotas de *L. major* (Savoia et al., 2005) e lopinavir, nelfinavir e amprenavir contra promastigotas de *L. amazonensis* (Santos et al., 2009). Nossos resultados mostraram que em ensaios realizados com promastigotas de *L. amazonensis*, seis hidroxietilaminas dentre as 23 avaliadas, apresentaram

atividade potente: PLIP33, PLIP41, PLIP2, PLIP1D, PMTB12 e PMTB4, com valores de IC₅₀ de 1,9; 2,3; 3,1; 3,3; 4,6 e 7,6 µM, respectivamente.

A capacidade dos IPs-HIV atualmente em uso clínico de reduzir a replicação de amastigotas em macrófagos também reforça o potencial dessa classe de fármacos como candidatos para o tratamento da leishmaniose (Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009). Em nosso trabalho, as hidroxietilaminas que se apresentaram ativas para promastigotas foram selecionadas para testes em amastigotas intracelulares. PLIP33, PMTB12, PLIP2, PLIP1D, PLIP41, PLIP19 e PLIP27 reduziram significativamente os níveis de infecção de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, com IC₅₀ de 0,3; 0,4; 0,4; 0,5; 1,0; 1,2 e 1,4 µM, respectivamente. Trabalhos realizados com os IPs-HIV mostraram que esses inibidores são mais eficazes contra formas amastigotas do que contra formas promastigotas dos parasitos (Trudel et al., 2008; Santos et al., 2009; Valdivieso et al., 2010). Da mesma forma, nossos valores de IC₅₀ também foram menores para as formas intracelulares de *L. amazonensis*. Esse fenômeno pode ser resultado de uma ação conjunta da atividade anti-amastigota das substâncias associada a uma modulação da capacidade microbicida dos macrófagos.

Para que uma substância seja considerada protótipo para um novo fármaco, seu índice de seletividade, além de seus valores de IC₅₀, devem ser considerados. Quanto maior o valor do índice de seletividade, mais seletivamente tóxica ao parasito é a molécula. Os melhores índices de seletividade foram obtidos com PMTB11 (>69), PMTB4 (32,4), PMTB1 (23,5), PLIP2 (20,0) e PLIP19 (20,0). As substâncias PLIP41, PMTB10 e PLIP1, mostraram-se mais tóxicas para macrófagos, com baixos índices de seletividade.

Alguns resultados encontrados na literatura relacionados à suscetibilidade de promastigotas de *Leishmania* a determinados IPs-HIV são contraditórios. Essa contradição pode ser resultado de diferenças entre os isolados do parasito ou de diferenças nas metodologias empregadas. Alguns trabalhos demonstraram que os IPs-HIV são efetivos contra promastigotas de *L. infantum* (Savoia et al., 2005; Valdivieso et al., 2010), diferente do que foi publicado por Trudel e colaboradores, que não verificaram atividade dos inibidores contra esse parasito (Trudel et al., 2008). Dessa forma, nós avaliamos a atividade das HEAs para diferentes espécies de *Leishmania* spp. sob as mesmas condições.

Com base nos valores de IC₅₀ para amastigotas de *L. amazonensis*, dez HEAs foram selecionadas para testes em outras espécies desse parasito. Nossos resultados mostraram que as espécies *L. amazonensis* e *L. major* foram as mais susceptíveis, enquanto *L. donovani* e *L. mexicana* mostraram-se mais resistentes à ação das moléculas avaliadas. Essas diferenças observadas na ação das substâncias avaliadas podem ser atribuídas às variações inerentes de cada

espécie. As leishmanioses são causadas por uma grande diversidade de espécies de *Leishmania*, que não só provocam diferentes formas de manifestações clínicas da doença como também podem diferir em relação à susceptibilidade/ resistência a diferentes medicamentos. De maneira condizente aos nossos resultados, dados publicados na literatura sobre a susceptibilidade de diferentes espécies de *Leishmania* para os IPs-HIV mostraram que as espécies associadas a manifestações cutâneas são mais suscetíveis do que as espécies associadas com manifestações viscerais (Savoia et al., 2005; Valdivieso et al., 2010).

Duas metodologias diferentes foram utilizadas para o cálculo do IC₅₀ das HEAs avaliadas para os diferentes parasitos. A primeira considera apenas o percentual de macrófagos infectados em cada ponto experimental, desconsiderando o número de amastigotas por célula. A segunda mescla os dois parâmetros, através do índice de infecção. Neste trabalho encontramos diferenças significativas nos resultados, de acordo com a metodologia utilizada. Como os valores de IC₅₀ variam de acordo com a metodologia empregada em seu cálculo, eles se tornam valores relativos. Dessa forma, a utilização de fármacos de referência como controles experimentais torna-se importante, permitindo comparações precisas dos valores do IC₅₀ de uma substância em teste em relação ao valor do IC₅₀ de um fármaco de referência.

Variações na metodologia experimental empregada podem resultar em valores de IC₅₀ diferentes para as mesmas substâncias. Essas variações podem estar relacionadas à quantidade de parasitos utilizados nos ensaios de infecção de macrófagos e ao tempo de incubação com a substância. Dessa forma, o desenho experimental para testes de atividade leishmanicida deve ser cuidadosamente elaborado, uma vez que a quantidade de parasitos utilizados em um experimento e o tempo de incubação, assim como a forma de cálculo, podem afetar o valor obtido para IC₅₀.

Os valores de CIFs tradicionalmente eram classificados por sinergismo: CIF < 1; antagonismo: CIF > 1; e interação indiferente ou aditiva: CIF = 1 (Berembaum, 1978). Essa interpretação pode levar a erros devido às variações experimentais. Diante disso, Odds (2003) propôs a interpretação dos valores de CIF da seguinte maneira: sinergismo: CIF < 0,5; antagonismo: CIF > 4; interação indiferente: CIF > 0,5 e < 4. Por esse motivo, a classificação proposta por Odds (2003) foi adotada nesta análise.

Os ensaios de associação *in vitro* nem sempre são preditivos de interações *in vivo* e não avaliam os possíveis eventos adversos causados por associações de fármacos. Assim, realizamos estudos *in vitro* para identificação de interações sinérgicas em nível celular como primeiro passo; o passo seguinte é a avaliação das interações *in vivo* (Seifert e Croft, 2006).

A associação de PLIP27 com miltefosina foi classificada como indiferente. O conceito de interação indiferente significa que cada substância presente na mistura contribuiu para a atividade

independentemente da presença da outra. Ou seja, não ocorreram interações físico-químicas e biológicas entre elas. Embora em um primeiro momento possa parecer frustrante, por não haver sinergismo, por outro lado esse resultado significa que as duas substâncias podem ser associadas sem que haja incompatibilidade da atividade entre elas. A associação de fármacos é muito utilizada no tratamento de diversas infecções e é desejada para minimizar o risco de desenvolvimento de cepas resistentes. Além disso, o uso de concentrações menores também diminui a incidência de efeitos colaterais.

A atividade de aspártico protease em *L. amazonensis* e *L. mexicana* foi demonstrada em alguns trabalhos através do uso combinado de inibidores e substratos cromogênicos e fluorogênicos específicos para essa classe de enzimas (Alves et al., 2005; Valdivieso et al., 2007; Santos et al., 2009; Santos et al., 2013). A hidroxietilpiperazina PMIC4 analisada anteriormente (Vasconcelos et al., 2014) não inibiu a atividade de aspártico protease em extratos de promastigotas de *L. amazonensis*. Testes de inibição da atividade de aspártico protease de *Leishmania amazonensis* foram então conduzidos com as HEAs estudadas. As hidroxietilaminas apresentaram perfis diferentes de inibição da atividade proteolítica. A PMTB21 foi a única hidroxietilamina incapaz de inibir a degradação do substrato na maior concentração avaliada.

Nesse trabalho correlacionamos a atividade leishmanicida das substâncias, a inibição da atividade de aspártico protease em *L. amazonensis* e as estruturas das hidroxietilaminas. Ao fazer essa correlação observamos que essas atividades não necessariamente estão interligadas. O mecanismo de ação mais óbvio esperado para os intermediários de síntese dos IPs-HIV seria a inibição de aspártico proteases. Entretanto, efeitos dessas substâncias sobre outros alvos dos parasitos também devem ser considerados ao avaliar seus mecanismos de ação. Nossas análises mostraram que a atividade leishmanicida das HEAs pode ocorrer por mecanismos diferentes, não relacionados apenas à inibição da atividade de aspártico protease. As atividades das moléculas foram associadas às suas estruturas químicas e um padrão interessante foi encontrado entre as hidroxietilaminas. A presença do substituinte NH₂ (amina primária) foi importante para a manutenção da atividade leishmanicida das substâncias. Quando a amina foi adicionada de um grupo Boc, na maioria dos casos houve perda da atividade. A inserção desse grupo pode estar levando a um impedimento estérico ou a mudança na nuvem eletrônica pode estar afetando a interação com o alvo. O conhecimento de grupos químicos capazes de responsáveis pela atividade leishmanicida de compostos pode ser importante tanto para a potencialização, quanto para a síntese de novos fármacos.

A correlação entre a atividade leishmanicida e a inibição de aspártico proteases revelou um dado interessante. Quatro substâncias ativas na inibição da atividade de aspártico protease

são desprovidas de atividade leishmanicida. Esse dado sugere a desvinculação da inibição das aspártico proteases da morte dos parasitos. Por outro lado, várias moléculas que apresentam atividade leishmanicida, não inibiram a protease.

Em estudos realizados com IPs-HIV, promastigotas de *L. amazonensis* tratados com os inibidores nelfinavir e lopinavir apresentaram alterações na membrana plasmática e estruturas celulares internas, que podem ter levado a disfunções metabólicas que resultaram na morte dos parasitos. Um aumento no número de vesículas que possivelmente correspondem a compartimentos contendo lipídeos também foi observado (Santos et al., 2009). Apesar de alguns fatores influenciarem no metabolismo de pacientes com HIV, os inibidores de protease são conhecidos por afetarem profundamente triglicerídeos, composição lipídica corporal e níveis de adiposina, tanto em humanos quanto em camundongos (Lenhard et al., 2000; Pistell et al., 2010; Gupta et al., 2012).

Para investigar um dos possíveis mecanismos de ação das HEAs, um ponto de partida interessante foi avaliar a alteração do conteúdo de esteróis do parasito. Isso porque, além dos IPs-HIV, que apresentam como efeito colateral a inibição de enzimas do complexo P450, outros fármacos leishmanicidas também têm a sua atividade relacionada à alteração da composição dos esteróis de membrana do parasito, por inibirem alguma enzima da via de metabolismo de lipídeos, como os azóis (cetoconazol, miconazol, itraconazol). O ergosterol, como já mencionado, é essencial para a sobrevivência de *Leishmania*, sendo responsável pela fluidez e manutenção da membrana plasmática, envolvimento na endocitose e participação na transdução de sinais.

Os azóis são substâncias que inibem a biossíntese de esteróis do parasito, atuando na enzima C-14 desmetilase (CYP51). Fármacos que atuam na biossíntese de esteróis do parasito possuem atividade leishmanicida e tripanossomicida, inibindo diversas enzimas da via como por exemplo a HMG-CoA redutase, a esqualeno epoxidase, a C-14 desmetilase e a C-24 metiltransferase. Essas enzimas são inibidas pelas estatinas (sinvastatina, lovastatina), alilaminas (terbinafina), azóis (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol) e azasteróis, respectivamente (Rodrigues et al. 2002, Haughan et al. 1992, Beach et al. 1988, Berman et al. 1984, Azofra et al. 2010).

Então, para estudar se as HEAs alteram a biossíntese de esteróis do parasito, foram escolhidas duas substâncias dessa classe, PMTB10 e PLIP27, selecionadas por terem apresentado excelente atividade leishmanicida contra as diferentes espécies. Podemos observar na Figura 9 e Tabela 13 que não houve acúmulo de esteróis metilados na posição 14, ou seja, não ocorreu a inibição da enzima C14-desmetilase (CYP51) como fazem os azóis (Roberts et al, 2003). Porém,

houve uma alteração na composição dos esteróis, principalmente com a PLIP27, que acumulou esteróis desconhecidos, e também colestá 5,7-dien 3-ol (**20**) e colestá-22-en-21-ol (**21**), mostrando que essa molécula pode estar inibindo outra enzima da via de biossíntese de esteróis. O acúmulo de esteróis com o esqueleto colestano é observado com a inibição da enzima 24-C-metiltransferase (atua na metilação do carbono 24 durante a biossíntese de esterol), pelos azasteróis (Lorente et al, 2004). Os esteróis acumulados com o tratamento com os azasteróis são Colestá-5,7,24-trien-3 β -ol e Colestá-7,24-dien-3 β -ol (Magaraci et al, 2003). Então, o acúmulo dos esteróis (**20**) e (**21**) no tratamento com o PLIP27 sugere uma possível atuação dessa molécula na enzima 24-C-metiltransferase.

Em nosso trabalho anterior (Vasconcelos et al., 2014) mostramos que a PMIC4, uma hidroxietilpiperazina, também possui capacidade de interferir no metabolismo lipídico de *L. amazonensis*. Assim, podemos sugerir que as diferenças na estrutura das HEAs que não mostraram inibição significativa de protease, em relação aos IP-HIV, podem ter levado à perda da capacidade de inibição de aspártico proteases de *Leishmania*. Entretanto, essa diferença estrutural pode levar à outras potencialidades, como à interferência no metabolismo lipídico.

Para avaliar o potencial das HEAs como candidatas a fármacos, a sua aderência à regra dos cinco de Lipinski (Ro5) e seu perfil de ADMET *in silico* foram avaliados.

A análise de Ro5 sugeriu um perfil favorável para várias PMTBs e PLIPs, incluindo PLIP27, que não viola nenhum dos parâmetros físico-químicos associados à probabilidade de um candidato a fármaco ter uma boa disponibilidade oral. A análise na plataforma admetSAR apontou que ambas as séries apresentam uma alta probabilidade de absorção intestinal humana.

O DNDi (Drug for Neglected Disease initiative) preconiza que dentro do perfil de um produto alvo para leishmaniose visceral, não ocorra interação com medicamentos para o tratamento da malária, tuberculose ou HIV. Porém, quanto à avaliação *in silico*, uma das interações farmacológicas que podem ocorrer é através da inibição ou indução da atividade de enzimas do complexo citocromo P450, enzimas responsáveis pela metabolização de diversos fármacos. PLIP27 e PMTB10 indicaram probabilidade de atuarem como inibidor da enzima CYP3A4 do complexo CYP450, podendo aumentar a concentração de substâncias metabolizadas por estas, o que pode significar concentrações tóxicas. Contudo, isso não ocorreu para as outras enzimas do complexo avaliadas. Um exemplo seria a possível interação com a rifampicina, medicamento de primeira linha para o tratamento da tuberculose, pois 85% deste fármaco é metabolizado no fígado por enzimas do complexo CYP450 (Arbex et al. 2010).

VI- CONCLUSÕES

- As hidroxietilaminas PMTB1, PMTB10 e PLIP27 foram as substâncias que apresentaram a melhor atividade leishmanicida contra diferentes espécies de *Leishmania*;
- A toxidez avaliada mostrou que PMTB1, PMTB4, PMTB11, PLIP2 e PLIP19 apresentarão o melhor índice de seletividade em *L. amazonensis*;
- Para *L. amazonensis* e *L. major* a razão de infecção 1:1 gerou valores maiores de IC₅₀ e IC₉₀ que 3:1. Em relação ao tempo de incubação, tempos maiores (5 dias) geraram valores menores de IC₅₀ para *L. major* e *L. mexicana*;
- A associação *in vitro* entre PLIP27 e miltefosina gerou um o valor de Σ CIF de 1,12 para a associação, considerado como associação indiferente;
- As HEAs tiveram perfis diferentes de inibição da atividade proteolítica e PMTB3, PMTB7 e PMTB9 tiveram maior capacidade inibitória. Sendo assim, a atividade leishmanicida das HEAs parece estar desvinculada da atividade de inibição de aspártico protease, sugerindo um mecanismo de ação alternativo;
- A análise dos lipídeos neutros revelou uma mudança no perfil de esteróis de *L. amazonensis* após tratamento com PLIP27, sugerindo uma inibição na via de biossíntese de esteróis em um ponto diferente dos azóis;
- A análise Ro5 sugeriu um perfil favorável para diversas HEAs, já que elas não violaram as quatro regras de Lipinski;
- As HEAs podem servir como ferramentas úteis para a investigação do mecanismo de ação leishmanicida dos inibidores de proteases do HIV. Estes resultados contribuem para o estudo de novos candidatos a quimioterápicos contra a leishmaniose cutânea, doença importante sob o ponto de vista clínico e de saúde pública, para a qual ainda não há vacina licenciada e o tratamento atual é insatisfatório.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-AMARAL, E.E., ANDRADE-NETO, V.V., CANTO-CAVALHEIRO, M.M., TORRES-SANTOS, E.C. Lipídeos. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F AND ALVES, CR (Org). *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2014. 83 – 98.
- ALVAR, J., APARICIO, P., ASEFFA, A., DEN-BOER, M., CAÑAVATE, C., DEDET, J.P. (2007). The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev.*, **21** (2): 334-359.
- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN BOER, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.*, **7** (5): e35671.
- ALVES, C.R., CORTE-REAL, S., BOURGUIGNON, S.C., CHAVES, C.S., SARAIVA, E.M. (2005). *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp Parasitol.*, **109** (1): 38-48.
- ANDRE, P., GROETTRUP, M., KLENERMAN, P., DE GIULI, R., BOOTH, B.L. JR., CERUNDOLO, V., BONNEVILLE, M., JOTEREAU, F., ZINKERNAGEL, R.M., LOTTEAU, V. (1998). An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci.*, **95** (22): 13120-13124.
- ANDREWS, K.T., FAIRLIE, D.P., MADALA, P.K., RAY, J., WYATT, D.M., HILTON, P.M., MELVILLE, L.A., BEATTIE, L., GARDINER, D.L., REID, R.C., STOERMER, M.J., SKINNER-ADAMS, T., BERRY, C., MCCARTHY, J.S. (2006). Potencies of human immunodeficiency virus protease inhibitors *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* against murine malaria. *Antimicrob Agents Chemother.*, **50** (2): 639-648.
- ANUURAD, E., BREMER, A., BERGLUND, L. (2010). HIV protease inhibitors and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, **17** (5): 478-485.
- AZOFRA, M., SOMOVILLA, J.L.P., PORRAS, M.C., CARRILLO, L.H., PEREZ, R.D. (2010). Use of Intralesional Voriconazole for the Treatment of Cutaneous *Scedosporium apiospermum* Infection. *Clinical Infectious Diseases.*, **51**: 255-257.
- ANTINORI, S., SCHIFANELLA, L., CORBELLINO, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31** (2):109–18.
- BARRET, A.J., TOLLE, D.P., RWALINGS, N.D. (1988). Managing peptidases in the genomic era. *Biol Chem.*, **384**: 873-882.

- BEACH, D.H., GOAD, L.J., HOLZ, G.G. JR. (1988). Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.*, **31** (2): 149-162.
- BENICIO, E.D.E. A., GADELHA, E.P., TALHARI, A., SILVA, R.M. JR, FERREIRA, L.C., SANTOS, M.C., MIRA, M.T., OLIVEIRA, C.M., TALHARI, C., TALHARI, S., MACHADO, P.R., SCHRIEFER, A. (2011). Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol.*, **86** (6):1141-1144.
- BERMAN, J.D., HOLZ, G. G., BEACH, D.H. (1984). Effects of Ketoconazole on Growth and Sterol Biosynthesis of *Leishmania-Mexicana* Promastigotes in Culture. *Mol Biochem Parasitol.*, **12**: 1-13.
- BEYNON, R.J., BOND, J.S. (2001). *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. 2^a Edição. Oxford University Press (Ed.), London.
- BERMAN, J.D., HOLZ, G.G JR., BEACH, D.H. (1984). Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol Biochem Parasitol.*, **12** (1): 1-13.
- BERMAN, J.J. (2008). Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, **4** (9): 1209-1216.
- BLIGH, E.G. & DRYER, M.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* **37** (8): 911-913.
- BLUM, J.A. & HATZ, C.F. (2009). Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. *J Travel Med.*, **16** (2): 123-131.
- BORDIER, C. (1987). The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitol Today.*, **3** (5): 151-3.
- BRAGA-SILVA, L.A., MOGAMI, S.S., VALLE, R.S., SILVA-NETO, I.D., SANTOS, A.L.S. (2010). Multiple effects of amprenavir against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.*, **10**: 221-224.
- BRANQUINHA, M.H., VERMELHO, A.B., GOLDENBERG, S., BONALDO, M.C. (1996). Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol* **43** (2):131-135.
- BRIK, A., WONG, C.H. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Biomol Chem.*, **1** (1): 5-14.

- BRITO, M.E., ANDRADE, M.S., DANTAS-TORRES, F., RODRIGUES, E.H., CAVALCANTI, M.D.E.P., DE ALMEIDA, A.M., BRANDÃO-FILHO, S.P.C (2012). Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.*, **45** (4):425-429.
- BURLEIGH, B.A., CALER, E.V., WEBSTER, P., ANDREWS, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol.*, **136** (3):609-620.
- CASOLARI, C., ROSSI, T., BAGGIO, G., COPPI, A., ZANDOMENEGHI, G., RUBERTO, A.I., FARINA, C., FABIO, G., ZANCA, A., CASTELLI, M. (2004). Interaction between saquinavir and antimycotic drugs on *C. albicans* and *C. neoformans* strains. *Pharmacol Res.*, **50** (6): 605-610.
- COSTA, P.R.R. (2009). Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Rev. Virtual Química.*, **1**(1): 58–66.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasito –Leishmania – Biologia. Disponível em < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> > Acessado em 15 de julho de 2011.
- CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R.W., ALVAL, J., BOELAERT, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, **5** (11): 873–882.
- CHENG, F., LI, W., ZHOU, Y., SHEN, J., WU, Z., LIU, G., LEE, P.W., TANG, Y. (2012). AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, **52** (11): 3099–3105.
- CROFT, S.L. & COOMBS, G.H. (2003). Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.*, **19** (11): 502-508.
- CRUZ, I., NIETO, J., MORENO, J., CANAVATE, C., DESJEUX, P., ALVAR, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.*, **123** (3): 357-388.
- CUNICO, W., GOMES, C.R., MORETH, M., MANHANINI, D.P., FIGUEIREDO, I.H., PENIDO, C., HENRIQUES, M.G., VAROTTI, F.P., KRETTLI, A.U. (2008). Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. *Eur J Med Chem.*, **44** (3): 1363-1368.

- DASH, C., KULKARNI, A., DUNN, B., RAO, M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38** (2): 89-119.
- DAVID, C.V. & CRAFT, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther.* **22** (6): 491-502.
- D'AVILA-LEVY, C.M., BOUCINHA, C., KOSTYGOV, A., SANTOS, H.L., MORELLI, K.A., GRYBCHUK-IEREMENKO, A., DUVAL, L., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V., GRELLIER, P., LUKEŠ, J. (2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Ahead of print. Epub Nov 24. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150253>.
- DENISE, H., POOT, J., JIMENEZ, M., AMBIT, A., HERRMANN, D.C., VERMEULEN, A.N., COOMBS, G.H., MOTTRAM, J. (2006). Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol.* **7**: 42-55.
- DUBOISE, S.M., VANNIER-SANTOS, M.A., COSTA-PINTO, D., RIVAS, L., PAN, A.A., TRAUB-CSEKO, Y., DE SOUZA, W., MCMAHON-PRATT, D. (1994). The biosynthesis, processing and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**:119–132.
- EL-ON J. (2009). Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Isr Med Assoc J.*, **11** (10): 623-628.
- FERREIRA, M.L., VASCONCELOS, T.R., DE CARVALHO, E.M., LOURENCO, M.C., WARDELL, S.M., WARDELL, J.L., FERREIRA, V.F., DE SOUZA, M.V. (2009). Synthesis and antitubercular activity of novel Schiff bases derived from d-mannitol. *Carbohydr Res.*, **344** (15): 2042-2047.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Drugs used in the treatment of HIV. Disponível em: < <http://www.fda.gov/> > Acesso em 17 de novembro de 2015.
- FRAME, M.J., MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H. (2000). Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitol.*, **121**(4): 367-377.
- FRANCO, M.A., BARBOSA, A.C., RATH, S., DOREA, J.G. (1995). Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **52**:435–437.
- FRAGA, J., VELAND, N., MONTALVO, A.M., PRAET, N., BOGGILD, A.K., VALENCIA, B.M., ARÉVALO, J., LLANOS-CUENTAS, A., DUJARDIN, J.C., VAN, D. A.G. (2012). Accurate and rapid species typing from cutaneous and

mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **74** (2):142-150.

GAEDICKE, S., FIRAT-GEIER, E., CONSTANTINIU, O., LUCCHIARI-HARTZ, M., FREUDENBERG, M., GALANOS, C., NIEDERMANN, G. (2002). Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis. *Cancer Res.*, **62** (23):6901-6908.

GANGULY, S., DAS, N.K., BARBHUIYA, J.N., CHATTERJEE, M. (2010). Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview. *Int. J. Dermatol.*, **49** (8):921-931.

GIL, E.S., CUNHA, L.C., PAULA, J.R., BEZERRA, J.C.B., AGUIAR, F.A. (2007). Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas* **1** (1): 90-115.

GOAD, L.J., HOLZ, G.G. JR., BEACH, D.H. (1984). Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol* **10** (2):161-170.

GOAD, L.J. (1994). The effects of antifungal compounds on growth and sterol metabolism in plants and protozoa. *Biochem Soc Trans* **22** (3):629-635.

GOTO, H. & LINDOSO, J.A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8** (4): 419-433.

GUPTA, S., KNIGHT, A.G., LOSSO, B.Y., INGRAM, D.K., KELLER, J.N., BRUCE-KELLER, A.J. (2012). Brain injury caused by HIV protease inhibitors: role of lipodystrophy and insulin resistance. *Antiviral Res.*, **95**(1): 19-29.

HADIGHI, R., MOHEBALI, M., BOUCHER, P., HAJJARAN, H., KHAMESIPOUR, A., OUELLETTE, M. (2006). Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *Plos Medic.*, **3** (5): 659-667.

HAUGHAN, P.A., CHANCE, M.L., GOAD, L.J. (1992). Synergism *in vitro* of Lovastatin and Miconazole As Antileishmanial Agents. *Biochem Pharmacol.*, **44** (11): 2199-2206.

HOMMER, V., EICHHOLZ, J., PETRY, F. (2003). Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *J Antimicrob Chemother* **52** (3): 359-364.

- KULKARNI, M.M., MCMASTER, W.R., KAMYSZ, E., KAMYSZ, W., ENGMAN, D.M., MCGWIRE, B.S. (2006). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol.*, **62**(5): 1484-1497.
- KUMAR, P., LODGE, R., TRUDEL, N., OUELLET, M., OUELLETTE, M., TREMBLAY, M.J. (2010). Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis* **4** (3):e642.
- LAINSON, R. (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amazon Sau.*, **1** (2):13–32.
- LAMOUR, S.D., CHOI, B.S., KEUN, H.C., MÜLLER, I., SARIC, J. (2012). Metabolic characterization of *Leishmania* major infection in activated and nonactivated macrophages. *J Proteome Res.*, **11** (8):4211-4222.
- LENHARD, J.M., CROOM, D.K., WEIEL, J.E., SPALTENSTEIN, A., REYNOLDS, D.J., FURFINE, E.S. (2000). Dietary fat alters HIV protease inhibitor-induced metabolic changes in mice. *J Nutr.*, **130**: 2361-2366.
- LEPESHEVA, G.I. & WATERMAN, M.R. (2004). CYP51 - the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol.*, **215**: 165-170.
- LIEKE, T., NYLÉN, S., EIDSMO, L., MCMASTER, W.R., MOHAMMADI, A.M., KHAMESIPOUR, A., BERG, L., AKUFFO, H. (2008). *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol.*, **153**(2): 221-230.
- LIENDO, A., VISBAL, G., PIRAS, M.M., PIRAS, R., URBINA, J.A. (1999). Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Molecular and Biochem Parasitol.*, **104** (1): 81-91.
- LIPINSKI, C.A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug. Disco. Today. Technol.*, **1** (4):337–341.
- LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W., FEENEY, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46** (1-3):3–26.
- LUKES, J., MAURICIO, I.L., SCHÖNIAN, G., DUJARDIN, J.C., SOTERIADOU, K., DEDET, J.P., KUHL, K., TINTAYA, K.W., JIRKU, M., CHOCHOLOVÁ, E., HARALAMBOUS, C., PRATLONG, F., OBORNÍK, M., HORÁK, A., AYALA, F.J., MILES, M.A. (2007). Evolutionary and geographical history of

the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104** (22): 9375-9380.

- LORENTE, S.O., RODRIGUES, J.C., JIMÉNEZ J.C., JOYCE-MENEKSE, M., RODRIGUES, C., CROFT, S.L., YARDLEY, V., DE LUCA-FRADLEY, K., RUIZ-PÉREZ, L.M., URBINA, J., DE SOUZA, W., GONZÁLEZ, P.D, GILBERT, I.H. (2004). Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48** (8):2937-2950.
- MAAROUF, M., KOUCHKOVSKY, Y., BROWN, S., PETIT, P.X., ROBERT-GERO, M. (1997). *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell. Res.*, **232** (2):339-348.
- MALTEZOU, H.C. (2010). Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**: 1-8.
- MAGARACI, F., JIMENEZ, C.J., RODRIGUES, C., RODRIGUES, J.C., BRAGA, M.V., YARDLEY, V., DE LUCA-FRADLEY, K., CROFT, S.L., DE SOUZA, W., RUIZ-PEREZ, L.M., URBINA, J., GONZALEZ, P. D., GILBERT, I.H. (2003). Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.*, **46** (22):4714-4727.
- MARETTI-MIRA, A.C., BITTNER, J., OLIVEIRA-NETO, M.P., LIU, M., KANG, D., LI, H., PIRMEZ, C., CRAFT, N. (2012). Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6** (9):e1816.
- MARINHO, F.A., GONÇALVES, K.C.S., OLIVEIRA, S.S.C., OLIVEIRA, A.C., BELLIO, M., D'AVILA-LEVY, C.M., SANTOS, A.L.S., BRANQUINHA, M.H. (2011). Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Memo. Inst. Oswaldo Cruz* ., **106**:507-509.
- MATAYOSHI, E.D., WANG, G.T., KRAFFT, G.A., ERICKSON, J. (1990). Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science*, **247** (4945):954-958.
- MATOS GUEDES, H.L., PINHEIRO, R.O., CHAVES, S.P., DE-SIMONE, S.G., ROSSI-BERGMANN, B. (2010). Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease-aggravating components of the crude LaAg vaccine. *Vaccine*, **28**:5491-5496.
- MCKERROW, J.H., CAFFREY, C., KELLY, B., LOKE, P., SAJID, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.*, **1**:497-536.

- MCKERROW, J.H., ROSENTHAL, P.J., SWENERTON, R., DOYLE, P. (2008). Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **21** (6):668-672.
- MCKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P.J., BOUVIER, J. (1993). The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**:821-853.
- MELE, R., MORALES, M.A., TOSINI, F., POZIO, E. (2003). Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. *Int. J. Parasitol.*, **33** (7):757-764.
- MEROPS. The peptidase database. Disponível em: < <http://merops.sanger.ac.uk/>> Acesso em 13 nov 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ª Edição. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília –DF, 144p.
- MISHRA, B.B., KALE, R.R., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. (2009b). Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, **80** (2):81-90.
- MISHRA, B.B., SINGH, R.K., SRIVASTAVA, A., TRIPATHI, V.J., TIWARI, V.K. (2009a). Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. *Mini. Rev. Med. Chem.*, **9** (1):107-123.
- MISHRA, J., SAXENA, A., SINGH, S. (2007). Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr. Med. Chem.*, **14** (10):1153-1169.
- MONZOTE, L. (2009). Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Open Antim. Agent. J.*, **1**: 9-19.
- MONGE-MAILLO, B. & LÓPEZ-VÉLEZ, R. (2013). Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*, **73** (17):1889-1920.
- MOREIRA, D., LÓPEZ-GARCÍA, P., VICKERMAN, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1861-1875.
- MORGADO-DIAZ, J.A., SILVA-LOPEZ, R.E., ALVES, C.R., SOARES, M.J., CORTE-REAL, S., DE SIMONE, S.G. (2005). Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kda in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **100** (4): 377-383.

- MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H., ALEXANDER, J. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7** (4): 375-381.
- MUKHOPADHYAY, D., DALTON, J.E., KAYE, P.M., CHATTERJEE, M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends Parasitol.*, **30** (2): 65–74.
- MYLER, P.J. & FASEL, N. *Leishmania - After the genome*. Seattle, USA. Editora: Seattle Biomedical Research Institute. 2008. 1-14.
- NAGLE, A.S., KHARE, S., KUMAR, A.B., SUPEK, F., BUCHYNSKY, A., MATHISON, C.J.N., CHENNAMANEMI, N.K., PENDEM, N., BUCKNER, F., GELB, M., MOLTENI, V. (2014). Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.*, **114** (22): 11305–11347.
- NEAL, R.A. (1968). The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **62** (1): 54-62.
- NELSON, D.L. & COX, M. (2014). *Princípios de Bioquímica 6ª Edição*. Artmed (Ed), Porto Alegre, 1298p.
- NEUBER, H. (2008). Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, **6** (9):754-765.
- NEVES DP. (2005) *Parasitologia Humana*. 11ª Edição. Atheneu (Ed) São Paulo: Atheneu. 264p.
- NOTEBERG, D., HAMELINK, E., HULTEN, J., WAHLGREN, M., VRANG, L., SAMUELSSON, B., HALLBERG, A. (2003). Design and synthesis of plasmepsin I and plasmepsin II inhibitors with activity in *Plasmodium falciparum*-infected cultured human erythrocytes. *J. Med. Chem.*, **46** (5): 734-746.
- O'DALY, J.A. & CABRERA, Z. (1986). Immunization of hamsters with TLCK-killed parasites induces protection against *Leishmania* infection. *Acta. Trop.*, **43**: 225–236.
- ODDS, F.C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**: 1.
- OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization. 2010.
- PALELLA, F.J.J., DELANEY, K.M., MOORMAN, A.C., LOVELESS, M.O., FUHRER, J., SATTEN, G.A. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with

- advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigation. *N. Engl. J. Med.*, **338** (13): 853-860.
- PALMEIRA, V.F., KNEIPP, L.F., ROZENTAL, S., ALVIANO, C.S., SANTOS, A.L. (2008). Beneficial effects of HIV peptidase inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: promising compounds to arrest key fungal biological processes and virulence. *PLoS One*, **3** (10): e3382.
- PARIKH, S., GUT, J., ISTVAN, E., GOLDBERG, D.E., HAVLIR, D.V., ROSENTHAL, P.J. (2005). Antimalarial activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **49** (7): 2983-2985.
- PARIS, C., LOISEAU, P.M., BORIES, C., BREARD, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48** (3): 852-859.
- PAUGAM, A., BULTEAU, A.L., DUPOUY-CAMET, J., CREUZET, C., FRIGUET, B. (2003). Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol* **19** (2): 55-59.
- PISCOPO, T.V. & MALLIA, A.C. (2006). Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.* **82** (972): 649-657.
- PISTELL, P.J., GUPTA, S., KNIGHT, A.G., DOMINGUE, M., URANGA, R.M., INGRAM, D.K., KHETERPAL, I., RUIZ, C., KELLER, J.N., BRUCE-KELLER, A.J. (2010). Metabolic and neurologic consequences of chronic lopinavir/ritonavir administration to C57BL/6 mice. *Antiviral. Res.* **88**: 334-342.
- POZIO, E. & MORALES, M.A. (2005). The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. Review. *Trends. Parasitol.* **21** (2): 58-63.
- RAMOS, H., VALDIVIESO, E., GAMARGO, M., DAGGER, F., COHEN, B.E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J. Membr. Biol.*, **152** (1):65-75.
- RAWLINGS, N.D., BARRET, A.J., BATERMAN, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, **40**: 343-350.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P., BARRETT, A.J. (2004). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **32**: D160-D164.
- REIS, L.C., RONDO, P.H.C., MARQUES, H.H.S., ANDRADE, S.B. (2011). Dyslipidaemia and insulin resistance in vertically HIV-infected children and adolescents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **105**: 197-203.

- REITHINGER, R., DUJARDIN, J.C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet. Infect. Dis.* **7** (9): 581-596.
- 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. *Mol. Biochem Parasitol.*, **126**: 129-142.
- RODRIGUES, J.C., 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.
- SAJID, M. & MCKERROW, J.H. (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.*, **120** (1): 1-21.
- SANTOS, A.L.S., ABREU, C.M., ALVIANO, C.S., SOARES, R.M.A. (2005). Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, **130** (1): 79-88.
- SANTOS, D.O., COUTINHO, C.E., MADEIRA, M.F., BOTTINO, C.G., VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S.B., BERNARDINO, A., BOURGUIGNON, S.C., CORTE-REAL, S., PINHO, R.T., RODRIGUES, C.R., CASTRO, H.C. (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* **103** (1): 1-10.
- SANTOS, L.O., MARINHO, F.A., ALTOE, E.F., VITORIO, B.S., ALVES, C.R., BRITTO, C., MOTTA, M.C., BRANQUINHA, M.H., SANTOS, A.L., D'AVILA-LEVY, C.M. (2009). HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*, **4** (3):e4918.
- SANTOS, L.O., VITÓRIO, B.S., BRANQUINHA, M.H., PEDROSO E SILVA, C.M., SANTOS, A.L., D'AVILA-LEVY, C.M. (2013). Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob. Chemother.*, **68** (2):348-353.
- SAVOIA, D., ALLICE, T., TOVO, PA. (2005). Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* **26** (1): 92-94.
- SCHRANER, C., HASSE, B., HASSE, U., BAUMANN, D., FAEH, A., BURG, G., GRIMM, F., MATHIS, A., WEBER, R., GUNTARD, H.F. (2005). Successful

- treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* **40** (12): e120-124.
- SEIFERT, K., ESCOBAR, P., CROFT, S.L. (2010). In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob. Chemother.*, **65** (3):508-511.
- SEIFERT, K., MUNDAY, J., SYEDA, T., CROFT SL. (2011) In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **66** (4):850-854.
- SILVA-LOPEZ, R.E. & GIOVANNI-DE-SIMONE, S. (2004). *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Exp. Parasitol.*, **107** (3-4), 173-182.
- SINGH, G. & DEY, C.S. (2007) Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. *Acta Trop.*, **103** (3):172-185.
- SINGH, N., KAUR, J., KUMAR, P., GUPTA, S., SINGH, N., GHOSAL, A., DUTTA, A., KUMAR, A., TRIPATHI, R., SIDDIQI, M.I., MANDAL, C., DUBE, A. (2009). An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. *Parasitol Res.*, **105** (5): 1317-1325.
- SINGH, S. & SIVAKUMAR, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.*, **10** (6):307-315.
- SRIVASTAVA, P., DAYAMA, A., MEHROTRA, S., SUNDAR, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **105** (1):1-6.
- STUART, K., BRUN, R., CROFT, S., FAIRLAMB, A., GURTNER, R.E., MCKERROW, J., REED, S., TARLETON, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.*, **118** (4): 1301-1310.
- TORRES-SANTOS, E.C., SAMPAIO-SANTOS, M.I., BUCKNER, F.S., YOKOYAMA, K., GELB, M., URBINA, J.A. (2009). Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63** (3): 469-472.

- TOVO PA. (2000). Highly active antiretroviral therapy inhibits cytokine production in HIV-uninfected subjects. *AIDS*, **14** (6): 743-744.
- TSANG, C.S., & HONG, I. (2010). HIV protease inhibitors differentially inhibit adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Mycoses*, **53**: 488-494.
- TRUDEL, N., GARG, R., MESSIER, N., SUNDAR, S., OUELLETTE, M., TREMBLAY, M.J. (2008). Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J. Infect. Dis.* **198** (9): 1292-1299.
- VALDIVIESO, E., DAGGER, F., RASCON, A. (2007). *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp. Parasitol.* **116** (1):77-82.
- VALDIVIESO, E., RANGEL, A., MORENO, J., SAUGAR, J.M., CAÑAVATE, C., ALVAR, J., DAGGER, F. (2010). Effects of HIV aspartic-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Exp. Parasitol.*, **126**: 557-563.
- VASCONCELOS, M.F., CUNHA-JÚNIOR, E.F., ANDRADE-NETO, V.V., SIQUEIRA, L.M., D'AVILA-LEVY, C.M., MORETH, M., CUNICO, W., SOUZA, M.V., GOMES, C.R, TORRES-SANTOS, E.C. (2014) Oral effectiveness of PMIC4, a novel hydroxyethylpiperazine analogue, in *Leishmania amazonensis*. *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.*, **4** (3): 210-213.
- VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. Comparative cell biology of the kinetoplastids flagellates. (Biology of the Kinetoplastida). London: Editora Academic Press. 1976. 35-130.
- WADHONE, P., MAITI, M., AGARWAL, R., KAMAT, V., MARTIN, S., SAHA, B. Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *The Journal of Immunology*. June 1, 2009 vol. 182 no. 11 7146-7154.
- WILLIAMS, R.A., TETLEY, L., MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H. (2006). Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.*, **61** (3): 655-674.
- WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M.L., FAIRLAMB, A.H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **279** (38): 39925-39932.
- YAO, C., DONELSON, J.E., WILSON, M.E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **132** (1): 1-16.

