

JAN CARLO MORAIS OLIVEIRA BERTASSONI DELORENZI

**ALCALOIDES INDÓLICOS IBOGAÍNICOS – 18-METOXICORONARIDINA E
18-ETOXICORONARIDINA:
AVALIAÇÕES *IN SILICO*, ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* E
TOXICIDADE**

São Paulo
Janeiro/2018

JAN CARLO MORAIS OLIVEIRA BERTASSONI DELORENZI

**ALCALOIDES INDÓLICOS IBOGAÍNICOS – 18-METOXICORONARIDINA E
18-ETOXICORONARIDINA:
AVALIAÇÕES *IN SILICO*, ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* E
TOXICIDADE**

Relatório submetido ao Fundo Mackenzie de Pesquisa, como requisito para finalização de financiamento de projeto de pesquisa.

São Paulo
Janeiro/2018

ESTADO DE CONFIDENCIALIDADE

O presente trabalho apresenta resultados não publicados referentes aos fármacos 18-Metoxicoronaridina e 18-Etoxicoronaridina, cuja pesquisa foi financiada pelo grupo HEBRON FARMACÊUTICA – PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. Os dados estão protegidos por acordos de confidencialidade, podendo ser discutidos em ambientes reservados, mas não publicados sem a expressa autorização.

O presente documento, portanto, é estritamente confidencial e seu conteúdo não deve ser divulgado a outras pessoas que não os membros da banca examinadora do concurso em tela.

À Hebron Farmacêutica, por patrocinar o meu trabalho e todos os projetos que me envolvo.

À Universidade Presbiteriana Mackenzie por fornecer a estrutura para o desenvolvimento deste e de outros projetos e ao Fundo Mackenzie de Pesquisa por ser financiador do projeto.

À Savant HWP, Inc, por ceder as moléculas do estudo e pelas discussões valiosas.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade leishmanicida de dois derivados sintéticos do alcaloide natural Coronaridina (COR), a 18-Metoxicoronarina (18-MC) e a 18-Etoxicoronarina (18-EC), evidenciando suas diferenças moleculares e as contribuições que cada modificação produz nessa atividade. 18-MC, assim como COR, já havia sido investigada anteriormente, por nosso grupo, quanto a sua atividade contra a espécie *Leishmania amazonensis* (DELORENZI et al., 2002). 18-EC teve seu potencial farmacológico e citotóxico avaliado pela primeira vez. Além disso, procedemos análises preliminares *in silico* no sentido de propor um perfil farmacocinético dessas moléculas. Formas promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi* e formas amastigotas de *L. chagasi* foram tratadas, *in vitro*, com ambos os fármacos. Os resultados mostraram uma potente atividade leishmanicida tanto de 18-MC (confirmando o observado anteriormente) e de 18-EC. O IC₅₀ de 18-MC foi de 24,08µg/mL, em promastigotas de ambas as espécies, e de 16,23µg/mL, para as formas amastigotas de *L. chagasi*. Enquanto que o IC₅₀ de 18-EC foi de 17,07µg/mL, para promastigotas, e de 12,75µg/mL, para amastigotas, sugerindo que o alcaloide 18-EC possui maior atividade leishmanicida *in vitro*. As avaliações de citotoxicidade para macrófagos murinos não revelaram diferenças estatísticas entre os fármacos e evidenciaram uma baixa inibição das enzimas mitocondriais dessas células, usadas como parâmetro de toxicidade. O CC₂₀ de 18-MC foi de 30,22µg/mL e de 18-EC foi de 45,70µg/mL. Os estudos *in silico* apontaram que 18-MC tem melhor *Drug-Score* e menor potencial toxicológico que 18-EC. Já as avaliações teóricas de perfil farmacocinético sugerem que ambos os fármacos se comportam de forma semelhante. 18-MC foi avaliado em modelo murino de infecção tegumentar *in vivo* (contra *L. amazonensis*) revelando altíssima atividade leishmanicida por via oral (5 doses de 10mg/Kg), reduzindo em 99,8% a carga parasitária dos animais infectados. Além disso, os estudos de toxicidade aguda e subaguda em roedores revelaram baixo potencial tóxico, com DL₅₀ de 130mg/Kg em machos e acima de 300mg/Kg, o que classifica 18-MC como fármaco categoria 3. Os achados histopatológicos sugeriram algumas lesões renais e hepáticas em doses acima de 100mg/Kg, o que poderiam justificar a toxicidade observada. Nos estudos bioquímicos não foi observada qualquer alteração que justifique alguma toxicidade. Nossos resultados evidenciaram o elevado potencial de 18-EC e 18-MC como fármaco leishmanicida e construíram o perfil toxicológico de 18-MC que permite seu encaminhamento para estudos em seres humanos.

Palavras-chave: 18-metoxicoronarina, 18-etoxicoronarina, *Leishmania*, avaliações *in silico*, toxicidade.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the leishmanicidal activity of two synthetic derivatives of the natural occurring alkaloid, Coronaridine (COR), the 18-Methoxycoronaridine (18-MC) and 18-Ethoxycoronaridine (18-EC), highlighting their differences and molecular contributions and how each modification produces the activity investigated. 18-MC, as well as COR, had been investigated previously by our group against *Leishmania amazonensis* (Delorenzi *et al.*, 2002). This is the first time 18-EC had its pharmacological and cytotoxic potential assessed. Furthermore, preliminary *in silico* analysis were carried out to evaluate a theoretical pharmacokinetic profile of these molecules. Promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi* and amastigotes of *L. chagasi* were treated *in vitro* with both drugs. The results showed a potent leishmanicidal activity of both 18-MC (confirming previous findings) and 18-EC. The IC₅₀ of 18-MC was 24.08µg/mL for promastigotes in both species and 16.23µg/mL for the amastigotes of *L. chagasi*. While the IC₅₀ of 18-EC was 17.07µg/ml for promastigotes and of 12.75µg/ml for amastigotes, suggesting that the alkaloid 18-EC has a higher antileishmanial activity *in vitro*. Evaluations of cytotoxicity to murine macrophages revealed no statistical differences between the drugs and showed a low inhibition of mitochondrial enzymes of these cells, used to measure the toxicity. The CC₂₀ of 18-MC was 30.22µg/mL and 18-EC was 45.70µg/mL. The *in silico* studies showed that 18-MC has better *Drug-Score* and toxicological profile than 18-EC. The pharmacokinetic profile of theoretical evaluations suggested that both agents have similar behavior. 18-MC was evaluated in murine model of cutaneous infection (*against L. amazonensis*) revealing the high leishmanicidal activity. Five doses of 10mg/Kg given orally reduced in 99.8% the parasite load of infected animals. Furthermore, studies of acute and subacute toxicity in rodents showed low potential toxicity, the LD₅₀ in male was 130mg/Kg and more than 300mg/kg in females, which classifies 18-MC as a drug category 3. Histopathological findings suggested some kidney and liver damage at doses higher than 100mg/kg, which could justify the toxicity observed. Biochemical studies showed no change that justifies the toxicity. Our results revealed the high potential of 18-EC and 18-MC as leishmanicidal drug and built the safety profile of 18-MC, which will reinforce the data for human clinical studies.

Keywords: 18-methoxycoronaridina, 18-ethoxycoronaridina, *Leishmania*, *in silico* analysis, toxicity.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição Geográfica e Formas Clínicas das Leishmanioses.	30
FIGURA 2 – Distribuição Geográfica de LTA no Brasil (2000 – 2002).	31
FIGURA 3 – Georeferência de Leishmaniose Canina.	32
FIGURA 4 – Georeferência de Leishmaniose Visceral.	32
FIGURA 5 – Ciclo de Vida da <i>Leishmania</i> .	33
FIGURA 6 – Formas Clínicas das Leishmanioses.	37
FIGURA 7 – Estrutura química dos fármacos utilizados em nossos estudos. 18-MC e 18-EC.	46
FIGURA 8 – Exemplo de planilha em que são anotadas as alterações comportamentais e sinais vitais dos animais durante o experimento de Toxicidade Aguda e de Doses Repetidas.	53
FIGURA 9 – Efeito de COR-S (triângulos), 18-MC (quadrados) e GLU (círculos) na sobrevivência de amastigotas.	61
FIGURA 10 – Efeito dos alcaloides indólicos sintéticos na produção de NO por macrófagos J774.A1 não ativados (barras abertas) e previamente ativados com IFN- γ /LPS (barras cinzas).	64
FIGURA 11 – Inibição do crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. chagasi</i> após incubação com diferentes concentrações de 18-MC (25, 50 e 100 μ g/mL).	68
FIGURA 12 – Inibição do crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. chagasi</i> após incubação com diferentes concentrações de 18-EC (25, 50 e 100 μ g/mL).	69
FIGURA 13 – Avaliação comparativa da atividade leishmanicida de 18-MC e 18-EC contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (A) e <i>L. chagasi</i> (B) em diferentes concentrações dos fármacos.	71
FIGURA 14 – Avaliação comparativa da atividade leishmanicida de 18-MC e 18-EC contra amastigotas de <i>L. chagasi</i> em diferentes concentrações dos fármacos.	72
FIGURA 15 – Avaliação comparativa do efeito citotóxico de 18-MC e 18-EC contra macrófagos de camundongos BALB/C em diferentes concentrações dos fármacos.	74
FIGURA 16 – Avaliação comparativa do perfil de <i>Drug-likeness</i> e <i>Drug-Score</i> .	75
FIGURA 17 – Perfil de toxicidade de 18-MC, 18-EC, COR e os medicamentos comerciais, Miltefosina e Anfotericina B.	76

FIGURA 18 – Histologia de Baço e Fígado de animais controle infectados.	82
FIGURA 19 – Corte histológico de Baço (A) e Fígado (B) de animais infectados e tratados com 20mg/Kg/dia de 18-MC.	82
FIGURA 20 – Histologia de Coração de animais infectados apenas (A) e infectados e tratados 18-MC (B).	83
FIGURA 21 – Análise histológica de rim de animais infectados não tratados (CTRL).	83
FIGURA 22 – Análise histológica de rim de animais infectados e tratados com 18-MC.	84
FIGURA 23 - Análise histológica Cérebro (A) e Baço (B) de animais tratados com 200mg/Kg de 18-MC.	88
FIGURA 24 – Cortes histológicos de Rim de animais CTRL (A) e tratados com 200mg/Kg (B) e 300 mg/Kg (C) de 18-MC.	89
FIGURA 25 – Corte histológico de fígado de animal tratado com 200mg/Kg de 18-MC.	89
FIGURA 26 – A - Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL).	90
FIGURA 27 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL).	90
FIGURA 28 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do fígado, com parênquima hepático homogêneo. B – Corte histológico do fígado de animais não tratados (CTRL).	90
FIGURA 29 – A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do rim e das estruturas que formam os glomérulos, sem retração da cápsula de Bowman. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL).	91
FIGURA 30 – A - Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL).	91
FIGURA 31 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL).	92
FIGURA 32 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do fígado, com parênquima hepático bastante homogêneo. B – Corte histológico do fígado de animais não tratados (CTRL).	92

FIGURA 33 – A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando colabamento de alguns glomérulos com redução do espaço de Bowman. B – Corte histológico do rim de animais não tratados (CTRL).	92
FIGURA 34 – A - Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL).	93
FIGURA 35 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL).	93
FIGURA 36 – A- Baço de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do Baço. B – Corte histológico do baço de animais não tratados (CTRL).	93
FIGURA 37 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando retração citoplasmática e aumento do núcleo, com possível condensação de cromatina. B – Corte histológico do fígado do animal que não recebeu tratamento (CTRL).	94
FIGURA 38 – A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando colabamento de glomélulos e diminuição dos espaços de Bowman. B – Corte histológico de Rim de animal não tratado (CTRL).	94
FIGURA 39 – Rato Wistar após procedimento cirúrgico de introdução de cânula femural (artéria e veia) para tratamento endovenoso e coleta de sangue.	96
FIGURA 40 – Triglicerídeos V.O.- A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico.	97
FIGURA 41 – Triglicerídeos V. O. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 40.	97
FIGURA 42 – Triglicerídeos I. V. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa.	98
FIGURA 43 – Triglicerídeos I. V. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 42.	98
FIGURA 44 – Colesterol V. O. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral.	99
FIGURA 45 – Colesterol V. O. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 44.	99
FIGURA 46 – Colesterol I. V. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa.	100
FIGURA 47 – Colesterol I. V. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 46.	100

FIGURA 48 – Glicose V. O. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral.	101
FIGURA 49 – Glicose V. O. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 48.	101
FIGURA 50 - Glicose I. V. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa.	102
FIGURA 51 - Glicose I. V. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 50.	102
FIGURA 52 – AST V. O. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto, corresponde a um animal tratado no tempo específico.	103
FIGURA 53 - AST V. O. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 52.	103
FIGURA 54 - AST I. V. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa.	104
FIGURA 55 - AST I. V. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 54.	104
FIGURA 56 – ALT V. O. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico.	105
FIGURA 57 - ALT V. O. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 56.	105
FIGURA 58 - ALT I. V. - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa.	106
FIGURA 59 - ALT I. V. - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 58.	106

INDICE DE TABELAS

TABELA I – Efeito dos fármacos na viabilidade dos macrófagos.	63
TABELA II - Efeito de 18-MC <i>in vivo</i> .	66
TABELA III - Avaliação comparativa dos alcaloides indólicos COR, 18-MC E 18-EC, quanto suas propriedades eletrônicas e valores da “Regra dos 5” de Lipinski.	77
TABELA IV - Avaliação comparativa de COR, 18-MC e 18-EC quanto ao perfil ADMET.	78
TABELA V - Avaliação da atividade leishmanicida de 18-MC – 5 dias de tratamento.	80
TABELA VI – Avaliação da atividade leishmanicida de 18-MC – 10 dias de tratamento.	81
QUADRO 1 – Avaliação temporal dos animais tratados com 18-MC em doses elevadas.	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 ALCALOIDES.....	20
2.1 ALCALOIDES INDÓLICOS.....	21
2.1.1 Alcaloides Indólicos Ibogáinicos e seus derivados.....	25
3 LEISHMANIOSES.....	30
3.1 CICLO DE VIDA.....	33
3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	35
3.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	37
3.3.1 Antimoniais Pentavalentes.....	38
3.3.2 Anfotericina B.....	41
3.3.3 Miltefosina (Hexadecilfosfatidilcolina).....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	45
4.2 FÁRMACOS.....	45
4.3 ANIMAIS.....	46
4.4 AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i>	47
4.4.1 Atividade Anti-promastigota.....	47
4.4.2 Atividade Anti-amastigota.....	48
4.4.3 Citotoxicidade.....	48
4.5 AVALIAÇÕES <i>IN VIVO</i>	50
4.5.1 Avaliação da Atividade Leishmanicida.....	50
4.6 AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	51
4.6.1 Toxicidade Aguda.....	51
4.6.2 Toxicidade de Doses Repetidas.....	53
4.6.3 Análises Morfológicas.....	55
4.6.4 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos.....	56
4.6.5 Determinação de DL₅₀.....	57
4.7 AVALIAÇÕES <i>IN SILICO</i>	57
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5 RESULTADOS.....	59

5.1 PANORAMA DOS PRIMEIROS RESULTADOS ALCALOIDES INDÓLICOS IBOGAÍNICOS CONTRA <i>L. amazonensis</i> NO BRASIL.....	59
5.1.1 Atividade Anti-amastigota de <i>L. amazonensis</i>.	60
5.1.2 Citotoxicidade para Macrófagos	62
5.1.3 Produção de Óxido Nítrico (NO)	63
5.1.4 Estudos <i>in vivo</i> – avaliação preliminar (2001 – 2002)	65
5.2 AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i>	67
5.2.1 Atividade Anti-promastigota	67
5.2.2 Atividade Anti-amastigota	71
5.2.3 Citotoxicidade	73
5.3 AVALIAÇÕES <i>IN SILICO</i>	74
5.4 AVALIAÇÕES <i>IN VIVO</i>	80
5.4.1 Avaliação da Atividade Leishmanicida de 18-MC em modelo de infecção tegumentar	80
5.4.2 Avaliações Toxicológicas Aguda e de Doses Repetidas de 18-MC	84
5.4.2.1 Toxicidade Aguda.....	84
5.4.2.2 Toxicidade de Doses Repetidas (5 dias).....	87
5.4.2.3 Análises Morfológicas.....	88
5.4.3 Avaliação Bioquímica em soro de Ratos tratados com 10mg/Kg de 18-MC	95
6 DISCUSSÃO	108
7 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos de origem vegetal para fins curativos cresceu e se desenvolveu ao longo da história da humanidade. Há muito, as civilizações perceberam que as plantas são laboratórios vivos, cujos produtos de seu metabolismo especial são de tão grande complexidade que, na maioria das vezes, não seriam imaginados para serem sintetizados em laboratório (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O advento, a expansão da síntese orgânica e a utilização de fármacos sintéticos, no final do século XIX e no início do século XX relegaram, a segundo plano o uso de produtos vegetais na forma de fitoterápicos. Entretanto, é importante salientar que a grande maioria dos fármacos no mercado eram derivados sintéticos de produtos naturais. Por volta da década de 60 houve uma valorização da pesquisa e utilização de produtos naturais e fitoterápicos, diante da necessidade de tratar doenças como o câncer, Doença de Alzheimer, Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), entre outras (CARVALHO, 1986).

O Brasil tem o privilégio de possuir 120 mil das 500 mil espécies de plantas nativas existentes no mundo, constituindo a maior cobertura vegetal de todo o planeta. Das espécies já catalogadas, isso corresponde a 14% do total depositadas em herbários em todo o mundo (PEIXOTO; MORIN, 2003). O aproveitamento racional desta grande biodiversidade pode levar a descoberta de fármacos quimicamente puros e definidos, com atividades farmacológicas determinadas que possam ser utilizados diretamente na clínica ou se tornarem ponto de partida para síntese de análogos mais ativos e menos tóxicos.

Dentre os fármacos isolados de diversos organismos vivos, os alcaloides se destacam por sua complexidade química e variedade de atividades biofarmacológicas. Diversos alcaloides são utilizados rotineiramente na medicina, tais como: atropina, vimblastina, morfina e derivados, quina e derivados. O termo alcaloide foi proposto por Meissner em 1819 para caracterizar os compostos encontrados em plantas com características alcalinas (TRIER, 1931 *apud* GÜVEN *et al.*, 2010). Rapidamente essa definição se mostrou muito ampla e imprecisa, por isso logo foi readaptada, tornando-se alcaloides todos compostos que possuem um ou mais átomos de nitrogênio em um anel cíclico (BENTLEY, 1957 *apud* GÜVEN *et al.*, 2010).

Por sua complexidade e variedade química os alcaloides são classificados em grupos. Os alcaloides indólicos formam um grupo importante tanto por sua ampla distribuição no Reino Vegetal quanto no aproveitamento de suas atividades farmacológicas. O sistema indólico pode ser visto como a fusão de um anel pirrólico e um anel benzênico, dando origem a dois benzopirróis isoméricos, o indol e o iso-indol, sendo o indol o mais importante dos isômeros. Outros grupamentos químicos são associados ao anel indólico ampliando a complexidade químico-farmacológica dessas moléculas (GÜVEN *et al.*, 2010).

Os alcaloides ibogaínicos são encontrados em diversos gêneros da família Apocynaceae como *Voacanga*, *Ervatamia*, *Tabernaemontana* e outros. Estes alcaloides contêm um sistema anelar isoquinuclidínico fusionado com o anel indólico (TAESOTIKUL, 1997).

A ibogaína foi o primeiro alcaloide isolado desse grupo por Dybovsky & Landrin (1901), bem como por Haller & Heckel (1901). Esse alcaloide é encontrado em casca de raízes do arbusto *Tabernathe iboga*, uma espécie da família

Apocynaceae, encontrada no Centro-Oeste da África (SHEPPARD, 1994), e seu uso etnofarmacológico relaciona-se com sua ação no Sistema Nervoso Central (SNC). Um desses usos é a sua capacidade de reversão da dependência química a múltiplas drogas por sua ação como antagonista dos receptores $\alpha_3\beta_4$ nicotínicos, largamente distribuídos no sistema diencefálico dorsal no cérebro e com suas respectivas vias dopaminérgicas. Entretanto, este alcaloide possui efeitos tóxicos graves, que limitam seu uso na clínica (GLICK, 2000a).

Outro importante alcaloide natural deste grupo é a Coronaridina. Encontrada em diversas espécies do reino vegetal, particularmente em espécies de *Tabernaemontana*. Coronaridina foi primeiramente isolada por Gorman em 1960 e sintetizada por Kutney e colaboradores em 1970. Suas atividades farmacológicas já foram bastante avaliadas e destacam-se antitumoral, analgésica e anti-inflamatória. Seu papel no SNC e na reversão da dependência química à múltiplas drogas também foi investigado (GLICK *et al.*, 1994, 1996a, 1997) e assim como a Iboína seus efeitos foram muito promissores. É sugerido que, por possuir um grupamento carboximetil, a coronaridina apresenta efeitos colaterais menores que a Iboína, embora esses não estejam totalmente abolidos (GLICK *et al.*, 1994; 1996a; 1996b).

Tais resultados estimularam um grupo de químicos norte-americanos a desenvolverem uma biblioteca de alcaloides indólicos derivados da Coronaridina visando determinar sua atividade no SNC com reduzidas reações tóxicas/adversas. Duas moléculas de destaque são a 18-Metoxicoronaridina (18-MC) e a 18-Etoxicoronaridina (18-EC).

Coronaridina e 18-MC foram avaliadas para outros efeitos farmacológicos, como sua atividade contra uma doença negligenciada, a Leishmaniose (DELORENZI *et al.*, 2001, 2002).

As doenças tropicais como a malária, a doença de Chagas, a doença do sono (tripanossomíase humana africana, THA), a leishmaniose visceral (LV), a filariose linfática, a dengue e a esquistossomose continuam sendo uma das principais causas de morbidade e de mortalidade em todo o mundo. As doenças, conhecidas como negligenciadas, incapacitam ou matam milhões de pessoas, que habitam as regiões tropicais e subtropicais, e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida. Embora as doenças tropicais e a tuberculose sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doença, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004, foram desenvolvidos especificamente para essas doenças. Durante o mesmo período, 1.535 medicamentos foram registrados para outras doenças (disponível: www.dndi.org).

As Leishmanioses são antroponoses de prevalência mundial, representando um grave problema de saúde pública em diversos países do mundo. Atualmente, as leishmanioses são endêmicas em 88 países distribuídos em quase todos os continentes povoados do planeta. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), entre 350 e 400 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contrair a doença (NEGHINA & NEGHINA, 2010). Estima-se que 12 milhões de pessoas já foram infectadas, apresentando manifestações clínicas ou não e que 2 milhões de novos casos surgem a cada ano, embora apenas 600 mil sejam oficialmente notificados (WERNECK, 2010). Desses casos, aproximadamente 70 mil mortes são registradas anualmente (SEIFERT, 2011), entretanto, ainda devido à subnotificação e às confusões relacionadas ao diagnóstico, o número de casos clínicos e de morte pode ser muito maior. É também importante destacar que a leishmaniose é uma doença fortemente relacionada com a pobreza (SEIFERT, 2011).

Além disso, é notório que 90% de todos os casos de leishmanioses concentram-se no Brasil, Bolívia, Paquistão, Índia, Sudão, Nepal, Arábia Saudita, Afeganistão, Irã e Síria (SANTOS *et al.*, 2010). Desde o ano 2000, um esforço científico mundial, capitaneado pela OMS, tem produzido resultados significativos no aumento de casos notificados, acurácia no diagnóstico, melhora no controle de vetores, desenvolvimento de novas formas farmacêuticas dos fármacos já usados clinicamente, com redução de custos e de efeitos tóxicos.

Mais do que uma doença, as leishmanioses formam uma síndrome complexa com diferentes manifestações clínicas, a saber, tegumentar (subdivida em cutânea localizada, cutaneomucosa, cutâneo difusa) e visceral.

A incidência de Leishmaniose, em particular a tegumentar, vem aumentando significativamente na América Latina, principalmente no Brasil, que registrou 605.062 (seiscentos e cinco mil e sessenta e dois) casos no período de 1980 a 2005 (MONTEIRO *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.* 2009).

As dificuldades relacionadas ao controle do vetor e a baixa eficiência dos tratamentos de primeira e segunda linha, associadas ao aparecimento de muitas reações adversas e seleção de cepas resistentes, têm estimulado muitos pesquisadores a desenvolverem estudos e avaliações com moléculas já em uso corrente, fitoterápicos, e fármacos inovadores, produtos de investigação convencional ou oriundos de estudos de planejamento racional de fármacos, para o tratamento eficaz e seguro dessa doença (LIÑARES *et al.*, 2006; TUON *et al.*, 2008; OSORIO, 2008; SEIFERT, 2011).

Dessa forma, o presente trabalho teve como **Objetivo Geral**:

Avaliar a atividade leishmanicida de dois derivados sintéticos do alcaloide natural Coronaridina, a 18-Metoxicorinadina e a 18-Etoxicoronaridina, evidenciando suas diferenças e as contribuições que cada modificação produz nessa atividade.

Os **Objetivos Específicos** foram:

- Avaliar a atividade anti-promastigota contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, *in vitro*, de 18-Metoxicoronaridina e 18-Etoxicoronaridina;
- Avaliar a atividade anti-amastigota contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, *in vitro*, 18-Metoxicoronaridina e 18-Etoxicoronaridina;
- Avaliar a citotoxicidade dos referidos fármacos contra macrófagos peritoneais de camundongo, estabelecendo uma ordem crescente de citotoxicidade;
- Avaliar a atividade Leishmanicida, *in vivo*, em modelo de infecção tegumentar do fármaco 18-Metoxicoronaridina;
- Proceder a avaliações *in silico* do tipo ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) dos fármacos em estudo;
- Demonstrar as possíveis avaliações farmacológicas e/ou toxicológicas a serem realizadas com os fármacos que demonstram melhor efeito biológico *in vitro*, atendendo às normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e determinações da OCDE (Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico) da qual o Brasil é signatário.

2 ALCALOIDES

Os alcaloides são compostos nitrogenados que ocorrem em plantas, animais e microorganismos. O estudo dos alcaloides tem fascinado químicos desde o início do século XIX quando, em 1817, Sertritner publicou um importante artigo a respeito do alcaloide morfina, extraído de *Papaver somniferum* (NEUSS, 1970). No Reino Vegetal, a distribuição de alcaloides é particularmente rica na classe Dicotyledoneae. Muitas são as famílias desta classe que apresentam alcaloides, tais como Alangiaceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Leguminosae, Loganiaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Solanaceae.

Esses alcaloides têm sido usados na medicina popular de diversos povos, na forma de drogas brutas, como a tintura de *Atropa beladonna*, usada como antiespasmódico (a atropina, alcaloide extraído desta planta, é inibidor de receptores muscarínicos), como as raízes de *Rauwolfia serpentina*, usadas para tratar hipertensão (o alcaloide responsável por essa ação é a reserpina) e o extrato ou a tintura de *Papaver somniferum*, como analgésico e antidiarreico, entre outros. Além das plantas e dos alcaloides já citados, há no mercado uma variedade imensa de alcaloides, como a quinina (antimalárico), a emetina (emético e amebicida), a pilocarpina (miótico), vimblastina e vincristina (anti-leucêmico), entre outros (TAESOTIKUL *et al.*, 1998). É também importante destacar que muitos destes alcaloides têm servido de esqueleto básico para a síntese de novos fármacos mais potentes e menos tóxicos. Um exemplo clássico são os derivados da quina, como a cloroquina, um antimalárico mais potente do que o alcaloide que lhe deu origem.

2.1 ALCALOIDES INDÓLICOS

Entre as décadas de 50 e 60, um grupo de bases orgânicas naturais contendo um núcleo indólico recebeu grande atenção, devido a descoberta das propriedades fisiológicas do ácido lisérgico, por um lado, e da reserpina, extraída da planta indiana *Rauwolfia serpentina*, por outro (NEUSS, 1970). O interesse pelos alcaloides indólicos aumentou mais ainda com o subsequente isolamento e elucidação química da vimblastina e da vincristina, extraídas de *Catharanthus roseus*. A descoberta desses alcaloides veio intensificar as pesquisas fitoquímicas, principalmente em relação a família Apocynaceae (NEUSS, 1970).

Os alcaloides indólicos são os principais constituintes químicos do metabolismo especial da família Apocynaceae e em particular do gênero *Tabernaemontana*. Na maior parte das vezes são moléculas grandes, pouco polares e que se apresentam como monômeros, dímeros e até trímeros. Mais de 300 alcaloides indólicos foram isolados e identificados de, pelo menos, 65 espécies só do gênero *Tabernaemontana* (VAN BEEK, 1984).

Os alcaloides indólicos são substâncias de química complexa e de difícil síntese total em laboratório, tendo como núcleo principal, o anel indólico. O sistema indólico pode ser visto como a fusão de um anel pirrólico e um anel benzênico, dando origem a dois benzopirróis isoméricos, o indol e o iso-indol, sendo que o indol é o mais importante dos isômeros. O indol lembra o pirrol em muitos aspectos. O átomo de nitrogênio doa elétrons não-compartilhados para a estrutura aromática, e este deslocamento é reduzido quando os indóis formam sais na presença de ácidos (NEUSS, 1970; KUEHNE *et al.*, 2003a; KUEHNE *et al.*, 2003b). Esses alcaloides são considerados de biossíntese mista, envolvendo a via do ácido chiquímico (esta é

a via metabólica utilizada para a síntese da maioria dos alcaloides) e a via do ácido mevalônico (via pela qual é sintetizada a maioria dos terpenóides). A enzimologia de sua biossíntese não está totalmente elucidada, mas já se tem conhecimento de algumas enzimas-chave em ambas as vias (ST-PIERRE *et al.*, 1999). Na via do ácido chiquímico, a principal enzima é a triptofano decarboxilase, que catalisa a síntese de triptamina a partir do triptofano. Na via do mevalonato, uma das principais enzimas é a geraniol-10-hidroxilase que catalisa a hidroxilação do geraniol permitindo a formação de secologanina em etapas seguintes. Contudo, a enzima limitante da biossíntese dos alcaloides indólicos é a strictosidina sintase, que catalisa a fusão da triptamina com a secologanina formando strictosidina, o precursor de todos os alcaloides indólicos (DE LUCA, 1993; ST-PIERRE *et al.*, 1999).

Dependendo da família e do gênero do Reino Vegetal em que se encontram, os alcaloides indólicos podem ser distinguidos, segundo sua origem, localização taxonômica e de acordo com as moléculas que se associam ao anel indólico:

a) Indoetilaminas ou triptaminas são derivadas diretamente do aminoácido triptofano e funcionam como precursores da maior parte dos alcaloides indólicos (St-Pierre, *et al.*, 1999). No Reino Vegetal, as triptaminas são encontradas em gêneros como *Gossypium* e *Panaeoulus*. Entretanto, há ocorrência de derivados triptamínicos em mamíferos, como no caso da 5-hidroxi-triptamina ou serotonina, um neurotransmissor de grande importância biológica, que atua no controle da motilidade do trato gastrointestinal, na aceleração da agregação plaquetária, entre outras funções (SANDERS-BUSH & MAYER, 1996).

b) Alcaloides β -carbolínicos (tipo harman) são encontrados em famílias como Rubiaceae e Leguminosae. Os derivados β -carbolínicos são caracterizados

pela associação de um grupamento piridina ao indol. Estes alcaloides são muito comuns em *Peganum harmala* e espécies de *Passiflora*. A *Passiflora* é uma planta usada na medicina popular do Brasil por suas propriedades antiespasmódica e sedativa. Também, os extratos de *P. harmala* têm sido usados na medicina tradicional do Norte da África para o tratamento de diversas dermatoses, inclusive leishmaniose (IWU *et al.*, 1994). A harmalina, um alcaloide β -carbólico encontrado nessa espécie apresentou atividade leishmanicida marcante *in vitro* (IC₅₀ 24 μ g/ml) em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* (IWU *et al.*, 1994). Esse e outros alcaloides do mesmo grupo apresentaram atividade leishmanicida moderada em estudos *in vivo*, quando administrados oralmente, além de serem tóxicos (IWU *et al.*, 1994). Outros estudos demonstraram que a harmalina induz comutagenicidade e intercala ao DNA, sendo portanto, genotóxica (PICADA *et al.*, 1997). Além disso, Deecher e colaboradores (1992) mostraram que esse alcaloide é alucinógeno e tremorigêncio assim como, apresenta efeito imunossupressor (HOUSE *et al.*, 1995).

c) Alcaloides indólicos do tipo elipticina são encontrados em gêneros de *Aspidosperma*, *Ochrosia* e *Tabernaemontana*, todos da família Apocynaceae. Estes alcaloides possuem adição de grupamentos quinolínicos ao anel indólico. Os mais importantes representantes desse grupo são a elipticina e a olivacina. Esta última apresentou atividade tripanosomicida marcante (LEON *et al.*, 1978) e foi implicada na atividade antitumoral de extratos de *Peschiera australis* (RATES *et al.*, 1993).

d) Alcaloides extraídos de *Rauwolfia* (Apocynaceae) têm sido usados há vários séculos por nativos do Himalaia para diversos males, desde picada de cobra à insanidade. A reserpina, alcaloide extraído das raízes dessa planta, foi a

primeira droga descrita capaz de interferir com a função do sistema nervoso simpático em humanos, sendo largamente usada como anti-hipertensivo (OATES, 1996).

e) Alcaloides oxindólicos são caracterizados pela presença de oxigênio no carbono 2 (C-2) do anel de cinco membros do indol. São encontrados nas famílias Loganiaceae e Rubiaceae. Esses alcaloides juntam-se com outros tipos de alcaloides indólicos para formar alcaloides bis-indólicos (NEUSS, 1970).

f) Alcaloides indólicos ibogaínicos são encontrados em diversos gêneros da família Apocynaceae como *Voacanga*, *Ervatamia*, *Tabernaemontana* e outros. Eles contêm um sistema anelar isoquinuclidínico fusionado com o anel indólico.

A ibogaína foi o primeiro alcaloide isolado desse grupo, por Dybovsky & Landrin, em 1901, bem como por Haller & Heckel, no mesmo ano (POPIK & SKOLNICK, 1999). Esse alcaloide é encontrado em casca de raízes do arbusto *Tabernaemontana iboga*, uma espécie da família Apocynaceae encontrada no Centro-Oeste da África (SHEPPARD, 1994). As raízes de *T. iboga* eram usadas em rituais de iniciação religiosa, nas tribos Bwiti e Mbiri, no Gabão (FERNANDEZ, 1982). Exploradores belgas e franceses, do século XIX, foram os primeiros a descreverem os efeitos estimulantes e afrodisíacos da raiz de iboga (LECONTE, 1864; POPE, 1969 *apud* POPIK & SKOLNICK, 1999).

2.1.1 Alcaloides Indólicos Iboagínicos e seus derivados

O grupamento farmacofórico mais importante da ibogaína é o sistema Isoquinuclidínico (2-azabicyclo [2.2.2]octano), que possui caráter alcalino, de pKa 11, sendo, biologicamente, um análogo rígido das etanolaminas e das propanolaminas. Essa amina bicíclica provê similaridade estrutural a diversos fármacos do tipo alquilaminas, usados em diversos medicamentos (KHAN, *et al.* 2006).

Os primeiros achados etnofarmacológicos apontam para ações alucinógenas e de modulação do sistema nervoso central (SNC) da ibogaína (GLICK *et al.*, 2008). A partir da de 1990, começou-se a avaliar os possíveis mecanismos de ação da ibogaína como bloqueador de dependência química a múltiplas drogas. Iboagína apresenta grande afinidade por receptores nicotínicos, k-opiíodes (DEECHER *et al.*, 1992), GABAérgicos e foi demonstrado que ela pode ser um potente inibidor de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (LAYER *et al.*, 1996), que funcionam como receptores de glutamato no sistema nervoso central. Tem sido sugerido que, devido a capacidade de bloquear tais receptores, a ibogaína apresenta efeitos contra dependência química (POPIK & SKOLNICK, 1999). Os receptores NMDA, quando ativados, permitem um influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o interior do neurônio, e seu excesso ativa processos destrutivos que culminam com a morte celular, estando relacionado com o efeito neurotóxico que o excesso de glutamato promove no organismo (STANDDAERT & YOUNG, 1996). Esse efeito neurotóxico é um dos principais responsáveis pelo desencadeamento de doenças degenerativas como a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer. Além disso, a ibogaína também pode modular a liberação de dopamina no *núcleo acumbens* e *núcleo striatum*

(GLICK *et al.*, 1994; SZUMLINSKI *et al.*, 2000a) e parece modular transportadores de serotonina, aumentando os níveis desse neurotransmissor no hipocampo, *núcleo acumbens* e *núcleo striatum* (SERSHEN *et al.*, 1992; BRODERICK *et al.*, 1994; MASH *et al.* 1995).

Entretanto, a ibogaína apresenta efeitos colaterais muito relevantes que podem limitar o seu uso clínico. Dentre esses efeitos, podemos destacar: estimulante, alucinógeno e tremorigêncio (LAYER *et al.*, 1996). Em ratos, os tremores se manifestam comumente em todo o corpo e parece acontecer pela ativação da via olivo-cerebelar (O'HEARN *et al.*, 1993). Já foi descrito que altas doses de ibogaína parecem lesar o “verme cerebelar” em ratos, presumivelmente como super-estimulação das células cerebelares de Purkinje (O'HEARN, 1993). Além disso, foi demonstrado que a ibogaína atua no sistema cardiovascular, reduzindo o ritmo dos batimentos cardíacos, produzindo bradicardia em doses elevadas, sem alterar a pressão arterial (GLICK, MAISONNEUVE & SZUMLINSKI, 2000b).

Uma vez que a ibogaína apresentou resultados tão promissores e relevantes no tratamento de dependência química de múltiplas drogas (quer narcóticas, quer estimulantes), ainda que apresentando efeitos tóxicos importantes, o grupo do Dr. Stanley D. Glick (Albany Medical College) e do Dr. Martin E. Kuehne (University of Vermont) verificaram a possibilidade de utilizar outros alcaloides ibogaínicos para esse tipo de atividade farmacológica, sem que apresentassem os efeitos neurotóxicos presentes na ibogaína.

Estudos da atividade contra a dependência química e de neurotoxicidade (GLICK *et al.*, 1994) apontaram a Coronaridina ($C_{21}H_{26}N_2O_2$ e Massa Molar 338,44g/mol), outro alcaloide natural, como molécula promissora para o uso

farmacológico em questão, ou ainda, como esqueleto inicial, para a síntese de novas moléculas com elevada eficácia e reduzidos efeitos tóxicos. Digno de nota é a relação entre o grupamento Carboximetil em C-16 e a redução do efeito neurotóxico, pois o mesmo efeito pode ser observado com outros alcaloides em que tal radical está presente, caso da Voacangina e Voacristina, entretanto, os efeitos neurotóxicos não foram totalmente abolidos na coronaridina (GLICK *et al.*, 1994, GLICK *et al.*, 1996, BANDARAGE, KUEHNE & GLICK, 1999).

Sendo assim, a equipe do Dr. Kuehne emvidou esforços para sintetizar análogos que apresentassem as características farmacológicas e toxicológicas desejadas e que pudesse ser sintetizado com rendimento razoável. Partindo do alcaloide natural Albifloranina (18-hidroxicoronaridina), cuja cadeia lateral hidroxietil é um alvo interessante para modificações estruturais, foram obtidos mais de sessenta análogos sintéticos, dentre os quais a 18-Metoxicoronaridina (18-MC) que tem sido estudada há 15 anos e a 18-Etoxicoronaridina (18-EC), um derivado que possui uma Etoxila ligada ao carbono 18 e que ainda não teve seu potencial farmacológico avaliado (BANDARAGE, KUEHNE & GLICK, 1999).

A 18-EC é um novo alcaloide indólico ibogaínico, sintético, desenvolvido pelo grupo do Dr. Willian Boulanger (Obiter Research, LLC – www.obires.com), sob a supervisão do Dr. Kuehne, como aprofundamento do protocolo de síntese de derivados de ibogaína/coronaridina. Sua fórmula estrutural é $C_{23}H_{30}N_2O_3$ e peso molecular de 382,5g/mol. Ainda não teve seu potencial farmacológico explorado, sendo o presente trabalho a primeira proposta de estudo farmacológico e toxicológico.

A 18-MC é um alcaloide sintético de fórmula molecular $C_{22}H_{28}N_2O_3$ e massa molar de 368,47g/mol, sintetizado em 1996, pelo Dr. Kuehne. A introdução do

grupamento metoxila no carbono de 18 (C-18) do sistema anelar isoquinuclidínico, proporcionou a síntese de um composto menos tóxico e mais eficaz no controle da dependência às drogas, quando comparado com a ibogaína e a coronaridina. Em estudos pré-clínicos, a 18-MC praticamente não apresentou efeito tóxico, como a neurotoxicidade cerebelar, tremores, bradicardia, observados com a coronaridina e a ibogaína (MOLINARI *et al.*, 1996; GLICK *et al.*, 1999, 2000a). Aparentemente, a 18-metoxicoronaridina apresenta os mesmos efeitos farmacológicos e atuava pelos mesmos mecanismos já descritos para ibogaína e coronaridina (GLICK *et al.*, 2000b). Também já foram evidenciadas diferenças de interação fármaco-receptor com relação a ibogaína, como a baixa afinidade por receptores NMDA, serotoninérgico e $\alpha_4\beta_2$ nicotínico (MAISONNEUVE & GLICK, 2003). Por outro lado, 18-MC tem afinidade para receptores nicotínicos, sendo um antagonista potente em receptores de acetilcolina $\alpha_3\beta_4$. Esse receptor está presente apenas em uma via cerebral, habênula medial e também no núcleo interpeduncular do sistema diencefálico dorsal. Essa seletividade, por si só, já reduz os efeitos indesejáveis de fármacos antagonistas colinérgicos, como os cardiovasculares.

18-MC também parece subverter as respostas de receptores dopaminérgicos sensibilizados tanto por opioides como por estimulantes. Esse evento é importante porque a dopamina é considerada o substrato neuroquímico para o desejo na administração de diversas drogas. Esses resultados também indicam que o histórico no uso de diferentes drogas é um fator crítico para avaliar os efeitos de 18-MC.

Outra atividade bastante interessante para 18-MC foi descrita mais recentemente por Glick *et al.* (2008; 2011). Nesses trabalhos, os pesquisadores evidenciaram que 18-MC é capaz de, diminuir a ingestão oral de sacarose, prevenir o ganho de peso induzido por sacarose e reduzir a deposição de lipídios. Em doses

de 40mg/Kg de 18-MC por via intraperitoneal houve forte redução do desejo de autoadministração de sacarose em ratos normais; o grupo controle que ativamente ingeriu a solução rica em sacarose ganhou peso enquanto no grupo tratado, os animais além de não ganharem peso, experimentaram uma redução quando comparado com o início do tratamento (TARASCENKO *et al.*, 2008). Essa descoberta, ainda que inesperada, permitiu a investigação do papel de 18-MC na redução da ingestão de substâncias doces *ad libitum*, disponível juntamente com ração normal, sem que houvesse redução na ingestão de água (GLICK *et al.*, 2008).

3 LEISHMANIOSES

A Leishmaniose é uma síndrome associada, primariamente, à grande proximidade do ser humano com animais reservatórios do agente etiológico e com a capacidade de seu inseto vetor de adaptar-se em vários tipos de locais para a sua reprodução, em diferentes áreas do planeta (PETERS & SACKS, 2009). Isso garante à doença uma prevalência mundial, tornando-a endêmica em mais de 88 países distribuídos em quatro continentes com exceção da Oceania (NEGHINA & NEGHINA, 2010). A Figura 1 evidencia a distribuição geográfica da doença em 2001. Nos últimos 10 anos houve aumento do número de casos no sul da Europa, mas não houve mudança significativa na distribuição de países com casos da doença.

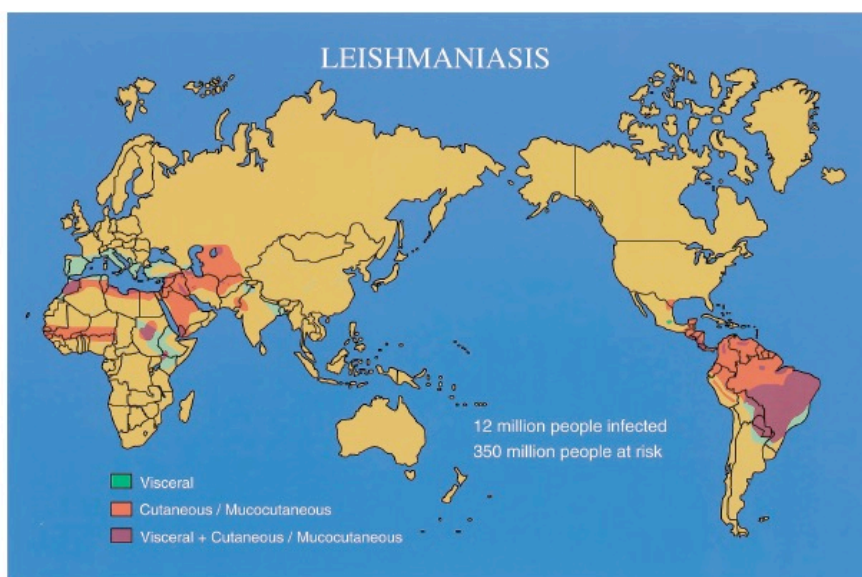


Figura 1 – Distribuição geográfica e incidência por formas clínicas das leishmanioses (Fonte: Handman, 2001).

De todos os países mencionados nas estatísticas, somente o Brasil é citado como tendo grande prevalência das três principais formas das Leishmanioses,

entretanto, levando-se em consideração o baixo grau de notificação, supõe-se que esse número seja ainda maior (OMS, 2008).

Os estados brasileiros com maior incidência da doença são os do Norte e do Nordeste, entretanto, historicamente, há registros em todos os estados do país, a única exceção era o Rio Grande do Sul (SÃO TIAGO & GUIDA, 1990), isso pode ser observado na Figura 2. Todavia, de todos os casos registrados no país até 2005, 13.384 (2,2%) foram notificados na Região Sul do Brasil, não estando, portanto, isenta da presença dessa doença, como acontecia até o início do século XXI (MONTEIRO *et al.*, 2008).

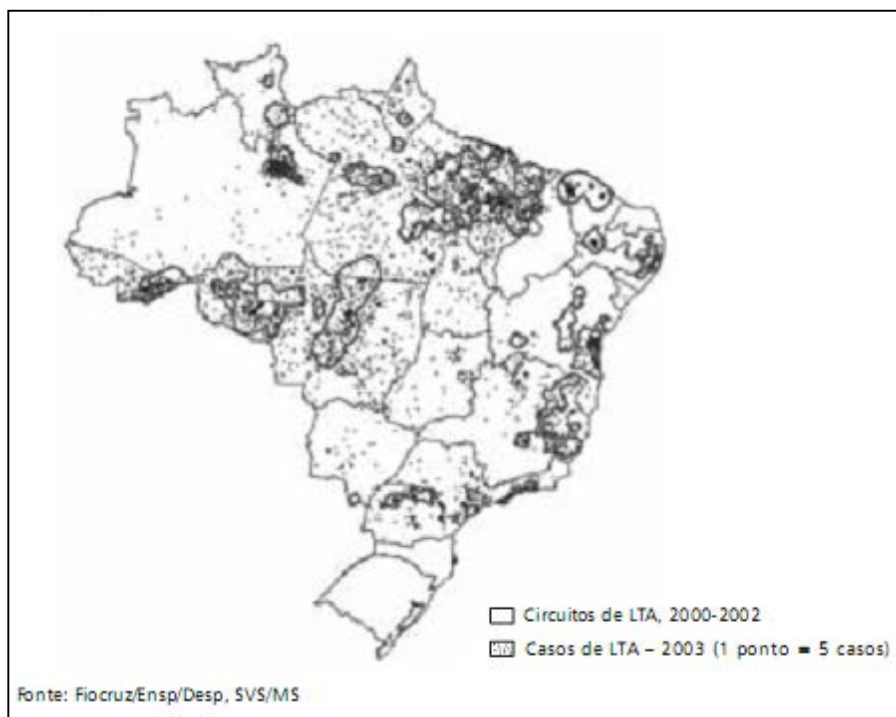


Figura 2 – Circuitos de casos de LTA (2000 – 2002) e casos de LTA por municípios. Brasil, 2003. As setas indicam locais de maior incidência da doença (Fonte: www.saude.gov.br).

Outro aspecto importante da epidemiologia das leishmanioses é que, nos últimos anos, há uma real incidência da doença em regiões metropolitanas. Isso pode estar relacionado ao fato de que o vetor deste patógeno está em franca domiciliação (PETERSON, PEREIRA & NEVES, 2004) e a grande incidência em

cães domésticos que, no ambiente urbano, se comporta como reservatório do parasito (MARGONARI *et al.*, 2006) (Figuras 3 e 4).

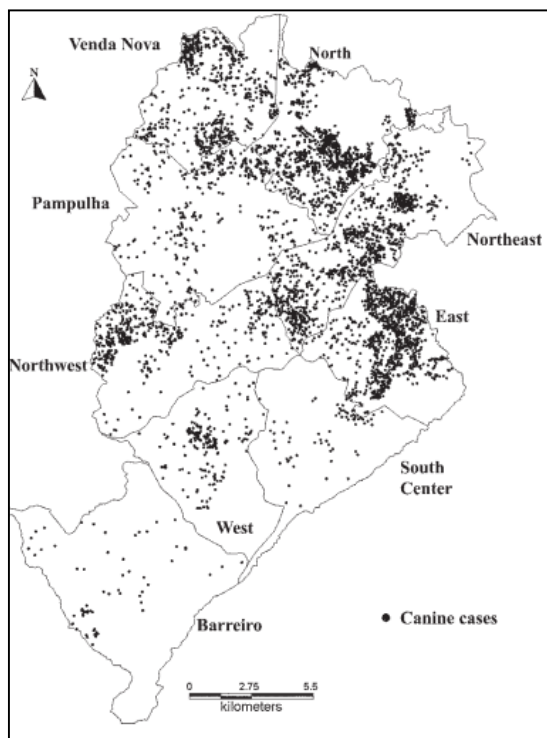


Figura 3 – Georeferência de casos de Leishmaniose Canina no município de Belo Horizonte entre abril de 2001 e março de 2002 (Fonte: MARGONARI *et al.*, 2006)

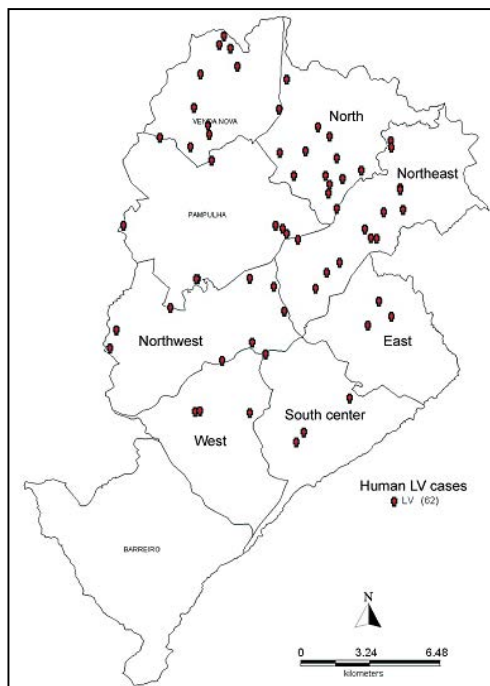


Figura 4 – Georeferência de casos de Leishmaniose Visceral Humana no município de Belo Horizonte entre abril de 2001 e março de 2002. (Fonte: MARGONARI *et al.*, 2006).

O controle epidemiológico da Leishmaniose ainda é muito insipiente, uma vez que há baixa notificação dos casos, gerada, muitas vezes, pela confusão dos sintomas com outras síndromes parasitológicas, bacterianas e virais. O Ministério da Saúde disponibiliza em sua página um quadro de notificações de leishmaniose visceral, distribuídos por estados de 1980 até 2005 (disponível: www.saude.gov.br).

3.1 CICLO DE VIDA

As Leishmanias são protozoários digenéticos que apresentam um ciclo de vida complexo em dois hospedeiros distintos e duas formas evolutivas diferentes. A forma promastigota, encontrada no inseto vetor, é alongada, com um flagelo anterior livre, e a amastigota, forma intracelular obrigatória encontrada no hospedeiro vertebrado, é ovóide sem flagelo livre (DELORENZI *et al.*, 2002) (Figura 5).

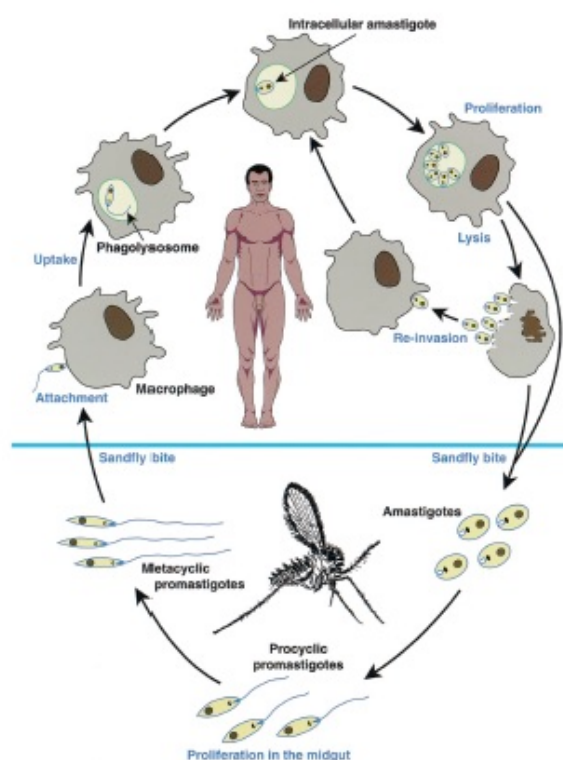


Figura 5 – Ciclo de Vida da *Leishmania* sp. (Fonte: Handman, 2001).

Com o repasto sangüíneo, o flebotomíneo ingere células do hospedeiro vertebrado infectadas com amastigotas. No trato digestivo do inseto é formada a membrana ou matriz peritrófica, que segrega o sangue para o processo digestivo. Os amastigotas se transformam em promastigotas que rompem a matriz peritrófica e se aderem às células epiteliais do intestino. Essa adesão evita que os parasitos sejam excretados com os restos da digestão e é uma etapa importante para determinar a espécie-especificidade da transmissão pelos flebotomíneos (PIMENTA *et al.*, 1994). Enquanto estão aderidos às células epiteliais do intestino, os promastigotas se multiplicam e são avirulentos, sendo chamados promastigotas procíclicos. Durante o processo de metaciclogênese, os procíclicos sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, se desligam das células epiteliais e migram para a porção anterior do tubo digestivo do flebotomíneo. Nesta fase, os parasitos são conhecidos como promastigotas metacíclicos, que são virulentos. Os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro vertebrado no momento da picada, onde se ligam às células do sistema fagocítico mononuclear, sendo endocitados em um processo mediado por receptor. Nos fagolisossomas dos macrófagos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas, se multiplicam e sobrevivem neste ambiente hostil. Com a proliferação dos amastigotas os macrófagos se rompem liberando no meio parasitas que infectam outros macrófagos, mantendo assim o ciclo no hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida do parasito se completa quando o flebotomíneo se alimenta em um hospedeiro vertebrado infectado e os parasitos estão presentes no repasto sangüíneo (SARAIVA *et al.*, 1995).

Os vetores das leishmanioses são dípteros hematófagos da família Psychodidae e sub-família Phlebotominae, que pertencem a dois gêneros principais:

Lutzomyia, que transmite a doença nas Américas, e *Phlebotomus*, que transmite a doença no Velho Mundo. A distribuição geográfica das leishmanioses, está relacionada com a distribuição dos flebotomíneos, pela sensibilidade dos insetos a climas frios, sua preferência de sangue humano ou animal e sua capacidade de transmitir as diversas espécies de *Leishmania* (OMS, 2000).

3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As leishmanioses formam uma síndrome clínica que pode se manifestar de várias maneiras, dependendo da espécie do parasita que está causando a infecção e do sistema imunológico do hospedeiro. Estas formas clínicas podem ser divididas em dois grupos principais: a forma tegumentar e a forma visceral. A forma tegumentar apresenta variantes e pode ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada, cutâneo-difusa e muco-cutânea (DELORENZI, 2002).

A leishmaniose cutânea localizada é causada por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e por membros dos complexos mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, entre outras) e braziliensis (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* entre outras) no Novo Mundo (BERMAN, 1997). As lesões cutâneas podem se apresentar como placas endurecidas, nódulos ou pápulas localizadas em qualquer parte do corpo do paciente, mas geralmente aparecendo no local da picada do inseto vetor. As ulcerações podem ser rasas ou profundas com os bordos elevados podendo progredir para cura após 1 a 18 meses.

A leishmaniose cutânea difusa pode ser causada por *L. pifanoi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. O fator determinante para o seu aparecimento é um

quadro de anergia do sistema imunológico do hospedeiro, que permite que espécies com tropismo dérmico se difundam por todo o corpo. Geralmente, a primeira lesão é no local da picada do flebotomíneo, havendo metástase e o aparecimento de diversos nódulos difusos não-ulcerativos. Nessa forma da doença, as lesões são ricas em parasitos (Figura 6F).

L. (V.) braziliensis é o agente causador da leishmaniose muco-cutânea que se caracteriza por lesões tegumentares de vários tipos e por lesões secundárias em áreas de mucosas, como a nasal e a oral. As lesões iniciais no ponto de inoculação, costumam ser do tipo pápulo-vesiculososo, podendo ser acompanhadas de linfangite e adenite satélite. Já as lesões mucosas são ulcerativas e indolores, com destruição do septo nasal e do dorso do nariz e da orelha, em casos avançados. Essas características levam a segregação e comprometimento psíquico do indivíduo. No Brasil, um estudo de 57 pacientes com leishmaniose mucosa mostrou que 40 deles possuíam cicatrizes de lesões cutâneas que os acometeram de 2 a 10 anos antes do aparecimento da lesão mucosa (Figura 6B). Esses achados sugerem ser a lesão na mucosa semelhante a uma metástase de uma leishmaniose cutânea primária (MARS DEN *et al.*, 1984).

A leishmaniose visceral ou Kala-azar (febre negra), é causada por *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e por *L. chagasi* no Novo Mundo (BERMAN, 1997). Essa é a forma mais grave da doença, evoluindo para o óbito em quase 100% dos casos não tratados, principalmente em crianças (MODABBER, 1993). Caracteriza-se por febre regular, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, anemia e caquexia em sua fase terminal. A doença pode aparecer de maneira imperceptível com adinamia, perda de apetite, palidez, ligeiro aumento do baço e elevação da temperatura, ou de forma abrupta com febre alta (39,5-40°C) contínua ou não. Em

casos não tratados, a hepatoesplenomegalia segue aumentando ao mesmo tempo em que cresce o esgotamento geral e a atonia muscular. A evolução da doença pode ser rápida, levando o paciente à caquexia e à morte em poucas semanas ou meses, ou então assumir um curso crônico (Figura 6C).



Figura 6 – Formas clínicas das Leishmanioses. (A) Forma tegumentar. (B) Forma cutâneo mucosa com acometimento de septo nasal. (C) Forma Visceral. (D) Forma dérmica pós-leishmaniose visceral. (E) Leishmaniose reicidivante. (F) Forma cutâneo difusa. Fonte: www.saude.gov.br)

3.3 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e o extermínio de cães infectados, que são o reservatório dos parasitos em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado.

As estratégias de controle preventivo da doença tem se mostrado ineficazes face ao aumento do número de casos e o particular aparecimento desses em grandes centros urbanos no Brasil (MARGONARI *et al.*, 2006; BOTELHO & NATAL, 2009) e em diversas regiões da Europa meridional, especialmente na Itália e Espanha. Nesses locais, a Leishmaniose é relacionada como uma doença oportunista, em casos de indivíduos com comprometimento de resposta imune (GOTO & LINDOSO, 2010).

Os fármacos que estão no mercado apresentam uma série de problemas, como resistência do parasito e indução de efeitos colaterais, que limitam a sua utilização e, principalmente, sua eficácia. Além disso, todos os fármacos disponíveis no Brasil e na maior parte dos países atingidos pela doença são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente. Assim, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes.

3.3.1 Antimoniais Pentavalentes

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são conhecidos por antimoniais e foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente - Sb^{3+}), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo algum sucesso, já que, naquele tempo, 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento (LAINSON, 1996). No entanto, essa formulação apresentava grande toxicidade (tosse, dor no peito e depressão) e também era de difícil administração. Em 1937, Smith introduziu a utilização do estibogluconato de sódio

(Pentostan®), um medicamento derivado do ácido estibórico, onde o antimônio estava na forma pentavalente (Sb^{5+}). Nessa forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e na toxicidade que o tártaro emético apresentava. O ácido estibórico complexado a carboidratos (duas moléculas de ácido glucônico) é usado para o tratamento das leishmanioses em países de língua inglesa. Já nos de língua francesa, espanhola e no Brasil, a droga utilizada é o antimoniato de N-metilglucamina, também um antimonial pentavalente (Glucantime®) (BERMAN, 1988). A estrutura do Glucantime ficou pouco conhecida durante muitos anos, mas recentemente, Roberts e colaboradores (1998) a descreveram, mostrando que as moléculas de N-metil-D-glucamina estão coordenadas com um único átomo de antimônio.

A OMS preconiza como tratamento, para a leishmaniose visceral, 20 mg de Sb/Kg/dia por via intramuscular ou intravenosa por no mínimo 20 dias e até duas semanas após a cura parasitológica, com dose diária máxima de 850 mg de antimônio. Para a leishmaniose cutânea, a recomendação é de 10-20 mg de Sb/Kg/dia até que a lesão se cure. Para a leishmaniose muco-cutânea, é recomendado a administração de 20 mg de Sb/Kg/dia durante 30 dias (TRACY & WEBESTER Jr., 1996).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes continua pouco compreendido, mas parece ser um evento multifatorial envolvendo diversos aspectos do metabolismo do parasito. Tem sido sugerido que algumas particularidades químicas na composição desses fármacos podem contribuir para seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glucônico (Pentostan®) ou N-metilglucamina (Glucantime®), são capazes de formar complexos com o átomo de antimônio, que são solúveis em água; essa

característica pode servir para distribuir os agentes antimoniais para os macrófagos hospedeiros (ROBERTS *et al.*, 1995; SERENO *et al.*, 1998; NEVES, CALDAS & SAMPAIO, 2009).

Além disso, como a forma pentavalente apresenta pouca toxicidade, é possível que se comporte como uma pró-droga, sendo convertida na forma mais tóxica, trivalente, em seu local de ação, ou seja, no interior dos macrófagos ou próximo dessas células. Essa conversão foi sugerida há mais de 50 anos por Goodwin & Page (GOODWIN & PAGE, 1943 *apud* GOODWIN, 1995), e tem sido corroborada pela evidência em soro de pacientes tratados com Glucantime, que continham 15 a 25% de compostos com antimônio trivalente (SERENO *et al.*, 1998). Sereno e colaboradores (1998 e 2001) demonstraram que compostos de antimônio trivalente são extremamente tóxicos para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a forma pentavalente é muito menos tóxica. Os antimoniais pentavalentes (ou a forma ativa, trivalente) parecem interferir com a produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise como a β -oxidação de ácidos graxos, reduzindo os níveis de ATP e GTP, comprometendo assim toda a vida da célula (TRACY & WEBSTER Jr., 1996). Além desses mecanismos, Chakraborty & Majunder (1988) demonstraram que o Pentostan é capaz de inibir a enzima Topoisomerase I purificada de *L. donovani*. Essa inibição parece ser específica uma vez que, tanto a Topoisomerase I, de timo de vitelo, quanto DNA-girase, de *E. coli*, não foram inibidas no mesmo ensaio. A demonstração por Lucumi e colaboradores (1998) de que o tratamento de promastigotas de *L. panamensis* com antimoniais pentavalentes é capaz de estabilizar complexos DNA-proteína está de acordo com a inibição da Topoisomerase I. Também foi mostrado que antimoniais pentavalentes inibem a enzima fosfofrutocinase, envolvida na síntese de

nucleotídeos trifosfatados (BERMAN *et al.*, 2005). Da mesma forma, já foi observado a fragmentação do DNA de *Leishmania* mediada por antimoniais, o que sugere que esses fármacos seriam capazes de induzir a apoptose do parasito (SERENO *et al.*, 2001).

Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, mas algumas reações colaterais são perceptíveis, como dores no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações e arritmias. Elevação das transaminases hepáticas também foi observada, mas de uma maneira reversível, cessando com o término do tratamento (TRACY & WEBSTER Jr., 1996). Além disso, Gasser e colaboradores (1994) relataram casos de pancreatite em pacientes com leishmaniose cutânea tratados com Pentostan® e Glucantime®, nas doses recomendadas pela OMS.

Outro problema em relação à utilização de antimoniais, é o aparecimento de cepas resistentes das mais diferentes espécies do parasita (GRÖGL *et al.*, 1992; LIRA *et al.*, 1999), o que limita a utilização dessa droga e facilita ainda mais o agravamento dessa endemia (HADIGHI *et al.*, 2007; PADRON-NIEVES *et al.*, 2009).

3.3.2 Anfotericina B

A Anfotericina B (Deoxicolato de Anfotericina B) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida, sendo o fármaco de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil. *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas, ao invés do colesterol das membranas de mamíferos. Esse lipídio é um esteróide com 28 carbonos (C-28), dupla ligação em C-22 e uma metila em C-24. O mecanismo de

ação da anfotericina B decorre de sua ligação com ergosterol, com conseqüente alteração da permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (SAHA *et al.*, 1986; OLLIARO & BRYCESON, 1993; URBINA, 1997). O uso clínico de Anfotericina B é recomendado para os casos severos de leishmaniose não-responsiva ao tratamento convencional, com ameaça de vida para o paciente. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febre, calafrio, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (BERMAN, 1998; SINGODIA *et al.*, 2010).

No final da década de 90, foram desenvolvidas novas formas farmacêuticas visando diminuir a toxicidade da Anfotericina B. Nessas formulações, o deoxicolato foi substituído por outros lipídios: Anfotericina B lipossomal - AmBisome (Fujisawa, Deerfield, IL), colesterol sulfato de Anfotericina B - Amphotec (Sequus, Menlo Park, CA) e o complexo lipídico de Anfotericina B - Abelcet, (Liposome Co., Princeton, NJ).

Em geral, essas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual as *Leishmania* residem, sendo pouco absorvidas pelos rins, o órgão-alvo de toxicidade da Anfotericina B (BERMAN, 1998). Dentre essas novas formulações, AmBisome (Fujisawa), foi a mais extensivamente estudada e seu uso para o tratamento de leishmaniose visceral foi aprovado em vários países europeus. Nos Estados Unidos, essa foi a primeira droga aprovada para o tratamento de qualquer forma de leishmaniose (BERMAN, 1998). A grande vantagem dessa formulação foi a notável ausência de efeitos colaterais, mas seu elevado custo constitui um fator limitante para sua utilização em países pobres. As duas outras formulações, Abelcet e Amphotec, foram eficientes no tratamento das leishmanioses mas não eliminaram os efeitos colaterais observados com a anfotericina B (BERMAN, 1998; SUNDAR *et al.*, 2009; SINGODIA *et al.*, 2010).

3.3.3 Miltefosina (Hexadecilfosfatidilcolina)

Dos fármacos mais recentemente investigados, a Miltefosina é o mais promissor, está em fase III de avaliação clínica, com registro para uso na Colômbia e em fase IV de avaliação clínica na Índia (CROFT, SEIFERT & YARDLEY, 2005). Esse fármaco é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (UNGER *et al.*, 1989). A Miltefosina primariamente se mostrou ativa contra *L. donovani in vitro* e em um estudo piloto revelou ter um índice terapêutico bastante favorável para o tratamento da doença visceral na Índia. Dessa forma, esse foi o primeiro país a licenciar este fármaco (OUELLETE *et al.*, 2004). Outra vantagem importante é que a Miltefosina é um fármaco administrado por via oral.

O mecanismo de ação da Miltefosina contra *Leishmania* ainda é bastante controverso. Lux e colaboradores (1996) mostraram que a síntese de LPG e gp63 está inibida em parasitas tratados com esse fármaco. Esses mesmos autores (2000) observaram a inibição da enzima sn-1-acil-2-liso-glicero-3-fosfocolina aciltransferase em promastigotas tratados *in situ* com diferentes concentrações de Miltefosina. Entretanto, a relevância de tais achados no tratamento clínico ainda não foi evidenciada. É possível que essa droga atue em *Leishmania*, como atua em células tumorais, induzindo a apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídios (ARTHUR & BITTMAN, 1998; DEBRABAN *et al.*, 2003). Outros estudos sugerem que essa droga possui propriedades imunomodulatórias (EUE *et al.*, 1995; SAFA *et al.*, 1997), incluindo uma atividade co-estimulatória para a ativação de células T e macrófagos *in vitro*. Esse efeito leva ao aumento da produção de GM-CSF (fator estimulador do crescimento de colônias de granulócitos-monócitos) em monócitos humanos periféricos estimulados com IL-2. Indução da produção de óxido

nítrico na linhagem celular U937 (histiócito humano) e macrófagos peritoneais, após ativação com LPS também foi mostrada (GRIEWANK *et al.*, 2010). Além disso, seu mecanismo de ação pode estar relacionado com a modulação da permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, bem como a interferência na composição de lipídios e na alteração da transdução de sinal. Do ponto de vista farmacocinético, é bem absorvida por via oral e largamente distribuída (PALUMBO, 2008). Em estudos clínicos (SINGH *et al.*, 2006; SUNDAR *et al.*, 2006), a Miltefosina apresentou desconforto gastrointestinal, com vômitos e diarreia e elevação transiente dos níveis plasmáticos de AST/TGO (Transaminase glutâmico-oxaloacética) e ALT/TGP (transaminase glutâmico pirúvica), além de alterações de ureia e de creatinina, mas mesmo assim, foi melhor tolerada que a Anfotericina B (BHATTACHARYA *et al.*, 2007).

Além das reações desagradáveis, a resistência ao parasito já foi relatada na clínica e pode estar relacionada mecanismos de redução do influxo do fármaco para o interior do parasito, permeabilidade de membrana plasmática modificada e rápido metabolismo do fármaco (OUELLETE *et al.*, 2004; SEIFERT, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais adotados para o estudo obedeceram às normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Presbiteriana Mackenzie, estando a presente proposição sob a égide do Projeto de Pesquisa aprovado pelo referido comitê sob o número CEUA 046/2009.

4.1 *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) e de *Leishmania chagasi* (Cepa WHOM/LD/1972) foram cultivados a 26° C em meio 199 (Cultilab, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), 2% de urina humana e 50µg/ml de Gentamicina (Mantecorp, Rio de Janeiro, Brasil), doravante denominado Meio de Cultivo.

4.2 FÁRMACOS

Os alcaloides 18-metoxicoronaridina (18-MC) e 18-Etoxicoronaridina, na forma de cloridrato, solúveis em água, são sintetizados por Obiter Research LLC, segundo o procedimento proposto por Kuehne *et al.* (2003b) e foram fornecidos pela Savant HWP, Inc, nossa parceira no projeto.

Dessa forma, a fórmula do cloridrato de 18-MC é $C_{22}H_{29}ClN_2O_3$, (PM 404,93g/mol) e do cloridrato de 18-EC é $C_{23}H_{31}ClN_2O_3$ (PM 418,96g/mol).

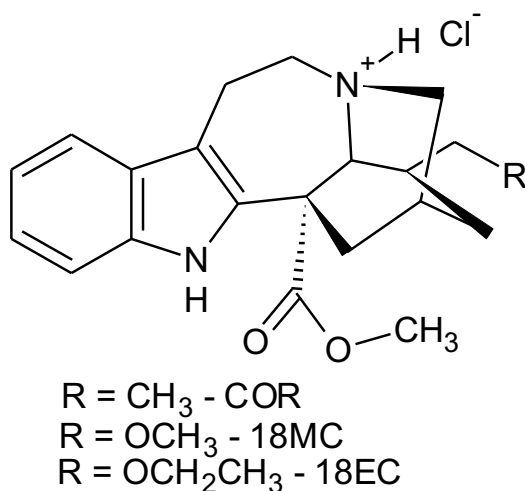


Figura 7 – Estrutura química dos fármacos utilizados em nossos estudos. 18-MC e 18-EC foram avaliadas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* na forma de Cloridrato. COR foi submetida à avaliações *in silico* na forma de Cloridrato.

4.3 ANIMAIS

Camundongos da linhagem BALB/C, machos e fêmeas, com aproximadamente 4 semanas e 20-25g foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Estes foram mantidos no Biotério Central da Universidade Presbiteriana Mackenzie em ambiente com temperatura controlada (22° a 25° C), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e à alimentação. O peso dos animais foi monitorado diariamente durante o período experimental.

Ratos Wistar, fêmeas, com aproximadamente 8 semanas e 250g foram adquiridos do Biotério do Instituto do Coração – Faculdade de Medicina da USP. As condições de acondicionamento dos animais foram as mesmas dos camundongos.

Para todos os processos experimentais, quer seja para obtenção de células, quer para procedimentos cirúrgicos e/ou coleta de tecidos, os animais foram

induzidos ao óbito livres de sofrimento e dor por sobrecarga anestésica (Cetamina/Xilazina 90mg.Kg⁻¹/10mg.Kg⁻¹).

4.4 AVALIAÇÕES *IN VITRO*

4.4.1 Atividade Anti-promastigota

A inibição do crescimento de promastigotas (1.10⁶/mL) de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi avaliada incubando-se as culturas dos parasitos nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL de 18-EC e 18-MC. Os fármacos foram adicionados uma única vez às culturas dos parasitos e seu crescimento foi avaliado em contagens diárias em hemocitômetro, por 4 dias. Todos os experimentos foram feitos em duplicata e os resultados são expressos em inibição do crescimento em comparação com o controle (DELORENZI, 1998).

Em outro conjunto de experimentos, promastigotas (5.10⁵/poço) de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram incubados em Meio de Cultivo por 72 horas a 26°C em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) com diferentes concentrações (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100µg/mL) do fármacos. A sobrevivência foi determinada por contagem dos parasitos após três dias de cultivo. Cada um dos fármacos foi testado em triplicata e os resultados de dois experimentos estão expressos em percentagem de inibição do crescimento em relação aos controles não tratados (DELORENZI, 1998).

4.4.2 Atividade Anti-amastigota

Os ensaios de atividade anti-amastigota foram realizados segundo proposto por Soares *et al.* (2010). Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/C, previamente elicitados com Tioglicolato (Sigma, EUA), foram obtidos por lavagem peritoneal com meio de Cultura RPMI (Cultilab). Após a lavagem as células foram centrifugadas e o número de células plaqueadas por poço ajustado para $5 \cdot 10^6$, cultivadas em meio RPMI + 10% soro fetal bovino por 24h a $35^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após 24 horas essas células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. chagasi* na proporção de 10:1 por 1 hora, lavados e incubados por mais 24 horas, como já descrito. As culturas foram tratadas com os fármacos nas concentrações de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$ por outras 24 horas e então lavadas, fixadas e coradas com Giemsa (Synth, São Paulo, Brasil). O Índice de Infectividade (% de macrófagos infectados X número de parasitas por macrófago) foi determinado por microscopia óptica contando-se, pelo menos, 200 células por cultura, em duplicata. Os resultados são expressos como percentual de inibição da sobrevivência em relação aos controles sem tratamento.

4.4.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos fármacos frente a macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C foi avaliada utilizando o método do XTT (2,3bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilida, Sigma), ou seja, verificando se os fármacos são capazes de inibir a atividade enzimática de desidrogenases mitocondriais, como proposto por Delorenzi *et al.* (2001) e Soares *et al.* (2010). Os macrófagos foram obtidos como descrito na secção 4.4.2, lavados para retirar as

células não aderentes e tratados com diferentes concentrações dos fármacos, por 24 horas, a 26° C e depois incubados com XTT e o ativador mitocondrial Phenazine Methosulfato (PMS, Sigma), por 4 horas. O produto da reação colorimétrica foi lido em espectrofotômetro a 450nm. As células mortas ou com comprometimento de enzimas vitais à sobrevivência celular foram incapazes de quebrar o reagente, não produzindo o corante solúvel (incolor/amarelo para alaranjado). Os resultados de três experimentos realizados em triplicata são expressos em percentual de inibição da sobrevivência das células tratadas em relação aos controles não tratados.

4.5 AVALIAÇÕES *IN VIVO*

4.5.1 Avaliação da Atividade Leishmanicida

Camundongos BALB/C foram infectados com 1.10^7 promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária, no coxim plantar direito. Após 30 dias de infecção, os animais foram randomicamente distribuídos nos grupos de estudo. Em cada grupo 5 animais foram tratados diariamente durante 5 ou 10 dias com 20mg/kg de 18-MC por gavagem intragástrica. Animais (5) tratados com Glucantime (200mg/Kg IP) formaram o Grupo Controle Positivo.

Os grupos experimentais foram:

1. 18-MC – 10mg/kg – 500 μ L VO
2. 18-MC - 20mg/kg – 500 μ L VO
3. GLU - 200mg/kg – 200 μ L IP
4. CTRL - Água – 500 μ L VO

Três dias após o fim do tratamento, os animais foram eutanaziados e a pata e o linfonodo regional (poplíteo) excisados para verificar a existência de parasitos nos tecidos.

Para detecção dos parasitos foi utilizada a metodologia de Diluição limitante, proposto por Lima *et al.* (1997) e Titus (1985). Em resumo, o tecido infectado foi cortado em pequenos pedaços, homogenizado e colocado em 1 ml de meio de cultivo 199+10% de soro fetal bovino + 2% de urina humana, suplementado com 150 μ g/ml de Gentamicina. Os homogenatos foram, então, transferidos para placas de 96 poços de fundo chato realizando-se 24 diluições por título. O número de

parasitos na pata e no linfonodo poplíteo foi estimado verificando-se o crescimento de formas promastigotas na maior diluição possível, após 7 dias de cultivo, a 26° C.

4.6 AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS

4.6.1 Toxicidade Aguda

Os estudos de toxicidade aguda são geralmente realizados em duas espécies, ambas as quais podem ser roedores, antes da primeira dose humana. É também conhecida como estudo de dose única e os animais devem ser observados por 14 dias. Um estudo bem desenhado de escalonamento de dose em duas espécies de roedores, ou um roedor e uma espécie não roedora, também é aceitável. Para estudos de toxicidade de dose única, as avaliações de duas vias de administração, a pretendida e via parenteral são recomendadas (ANVISA, 2010). A dose máxima a ser testada será a não-letal, ou até 1000 mg/kg.

Em nossos estudos, foi utilizado apenas uma espécie roedora e uma única via de administração, a Via Oral (VO). Camundongos foram divididos aleatória e randomicamente em cinco grupos (n=5 animais/grupo), privados de alimento por 4 horas antes da realização dos experimentos de toxicidade aguda e 2 horas após, mantendo o acesso à água. Os grupos experimentais são:

1. Controle (CTRL) - água
2. 18-MC 50mg/kg
3. 18-MC 100mg/kg
4. 18-MC 200mg/kg
5. 18-MC 300mg/kg

Tanto a água quanto os fármacos foram administrados por gavagem (200µl) usando uma cânula metálica com dimensões específicas para camundongo.

Após a administração, os animais foram observados atenciosamente por 2 horas, em uma superfície plana e cercada e também em suas respectivas gaiolas. Passadas as 2 horas, a observação aconteceu em intervalos regulares de 4 horas no dia do tratamento e a cada 24 horas, por 14 dias.

As alterações comportamentais observadas foram, dentre outras: movimentos estereotipados, deambulação, depressão, convulsão, sedação, tremor, piloereção, ereção da cauda e letalidade. Esses e outros parâmetros foram anotados em tabelas como as apresentadas abaixo e propostas por Roux, Sablé & Porsolt (2004).

Test Substance :		Date :												Round n																														
Dose (mg/kg)		0												First animal administration time :																														
Weight (g)														Beginning 180 min:																														
Time (min)		0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr	0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr	0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr	
Lethality																																												
Convulsions																																												
Tremor																																												
Straub																																												
Sedation		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#			
Observations																																												

= parameters not measured

Figure 10.10.2A Raw data sheet for primary observation (Irwin) test in the rat. *continued*

Test Substance :		Date :																																									
Dose (mg/kg)		0																																									
Time (min)		0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr	0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr	0-15	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	24hr
Excitation		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#			
Abnormal gait (rolling)																																											
Abnormal gait (stope)																																											
Jumps																																											
Motor incoordination																																											
Loss of balance																																											
Observations																																											

= parameter not measured

Figure 10.10.2B *Continued*

Test Substance :												Date :																								
Dose (mg/kg)	0																																			
Time (min)	0-15 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	135 min	150 min	165 min	180 min	195 min	210 min	225 min	240 min	0-15 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	135 min	150 min	165 min	180 min	195 min	210 min	225 min	240 min		
Fore-paw treading																																				
Withes																																				
Piloerection																																				
Stereotypies (sniffing)																																				
Stereotypies (chewing)																																				
Stereotypies (head movements)																																				
Observations																																				

Figure 10.10.2C Continued

Figura 8 – Exemplo de planilha em que são anotadas as alterações comportamentais e sinais vitais dos animais durante o experimento de Toxicidade Aguda e de Doses Repetidas dos fármacos em estudo (Fonte: Roux, Sablé & Porsolt, 2004).

Após os 14 dias de observação os animais foram eutanasiados por sobrecarga anestésica (Ketamina/Xilazina, 90 mg.Kg⁻¹/10mg.Kg⁻¹, *i.p.*), livre de sofrimento e dor segundo procedimento aprovado pelo CEUA/Mackenzie, para realização de necropsia e preparo de amostra para análises histopatológicas como descrito em seções posteriores.

4.6.2 Toxicidade De Doses Repetidas

Os estudos de toxicidade de doses repetidas geralmente são realizados em duas espécies de mamíferos, roedores e não roedores. A duração desses estudos é geralmente igual ou maior que a duração do ensaio clínico, até ao máximo recomendado. Em alguns casos, os ensaios clínicos podem exceder a duração apoiada por estudos de toxicidade de dose repetida. Isso é verdade, principalmente, quando há uma vantagem significativa no plano terapêutico para a substância em ensaio e uma ausência de efeitos adversos observados clinicamente. Fortes diferenças regionais continuam a existir nas recomendações para a realização de

estudos de toxicologia com não roedores. Para europeus e japoneses, o prazo máximo de seis meses é suficiente para estudos de toxicologia não roedores, enquanto a FDA toma a posição de que os estudos de 6 meses não são suficientes para que os eventos adversos potenciais sejam totalmente observados. Portanto, não há um consenso internacional de que estudos com roedores de seis meses e estudos com não-roedores de 9 meses são aceitáveis para um plano de desenvolvimento tripartite. Anvisa adota a mesma posição do FDA (ANVISA, 2010).

Para os ensaios de toxicidade com doses repetidas com roedores, os camundongos BALB/c foram divididos aleatória e randomicamente em 4 grupos (n=5 animais/grupo) privados de alimento por 4 horas antes da realização dos experimentos de toxicidade de doses repetidas e 2 horas após, mantendo o acesso à água, a cada dia do tratamento, que se estendeu por 5 dias.

1. Controle (CTRL) – água
2. 18-MC 20mg/kg
3. 18-MC 50mg/kg
4. 18-MC 100mg/kg

Tanto a água quanto os fármacos foram administrados por gavagem (200 μ L) usando uma cânula metálica com dimensões específicas para camundongo.

Após cada administração, os animais foram observados atenciosamente por 2 horas, em uma superfície plana e cercada e também em suas respectivas gaiolas. Passadas as 2 horas, a observação aconteceu em intervalos regulares de 4 horas em cada dia de tratamento e a cada 24 horas por 28 dias após a última administração do fármaco.

As alterações comportamentais observadas foram as mesmas avaliadas para os experimentos de toxicidade aguda, como propostas por Roux, Sablé & Porsolt (2004) e anotadas no mesmo tipo de tabela como mostrado na Figura 7.

Após os 28 dias observação (contados a partir da última administração do fármaco), os animais foram eutanasiados por sobrecarga anestésica (Ketamina/Xilazina, 90 mg.Kg⁻¹/10mg.Kg⁻¹, *i.p.*), livre de sofrimento e dor segundo procedimento aprovado pelo CEUA/Mackenzie, para realização de necropsia e preparo de amostra para análises histopatológicas, como descrito em seções posteriores.

4.6.3 Análises Morfológicas

Após a eutanásia dos animais (descrito anteriormente), tanto nos estudos de toxicologia aguda como de doses repetidas, a necropsia foi realizada com cada grupo para análise de alterações macroscópicas dos órgãos. A análise concentrou-se especialmente nos órgãos baço, cérebro, coração, fígado, pulmões e rins. Esses foram retirados cirurgicamente, pesados e logo depois, perfundidos com solução de formol a 10%. Os órgãos foram cortados longitudinalmente ou transversalmente dependendo de sua simetria e os fragmentos permaneceram em formol 10% durante 24h. Ao final das 24 horas, os referidos órgãos foram colocados em álcool 70% até o processamento do tecido, que consistiu em desidratação, diafanização e inclusão em blocos de parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo obtendo-se cortes de 6 µm de espessura, sendo então corados com Hematoxilina-Eosina, Picrossirius, para pesquisa das fibras colágenas e com Periodic acid-Schiff (P.A.S) para coloração das mucoproteínas da Cápsula de Bowman (TOLOSA *et al.*, 2003).

4.6.4 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos

Ratos Wistar fêmeas (n=5/experimento), pesando aproximadamente 250g, foram anestesiados como descrito previamente e submetidos à canulação da artéria e veia femoral para coleta de sangue em diferentes tempos após a administração de 10mg/kg de 18-MC. Para a canulação, utilizamos cânulas de polietileno (PE-10 fundido com uma extensão de PE-50 – ClayAdams, USA).

O fármaco foi administrado primeiramente por via venosa e em outra bateria de experimentos por via oral (gavagem). Nesse caso, o fármaco foi administrado 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. A primeira coleta de sangue (T0) foi realizada 30 minutos após a administração de 18-MC.

Após o procedimento cirúrgico, as cânulas da artéria e as seringas de coleta foram heparinizadas. O sangue foi coletado imediatamente antes da administração do fármaco e nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração dos mesmos. O volume de sangue coletado foi de aproximadamente 900µL em cada tempo.

Esse sangue foi submetido à centrifugação (10.000 RPM/ 5minutos) para obtenção do soro que ficou armazenado a -20° C até as determinações bioquímicas. Os parâmetros avaliados foram: Glicose, Triglicerídeos, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Colesterol. Além disso, 250µL de soro em cada tempo foi utilizado para a determinação da concentração plasmática de 18-MC por HPLC.

4.6.5 Determinação de DL₅₀

Decorridos 24 horas as administração do fármaco para avaliação de toxicidade aguda, o valor da dose letal (DL₅₀) foi estimada seguindo a metodologia proposta por Miller & Tainter em 1944 (RANDHAWA, 2009) por regressão linear.

4.7 AVALIAÇÕES *IN SILICO*

Avaliações teóricas *in silico* foram realizadas, segundo proposto por Pinheiro *et al.* (2012) e diferentes descritores foram analisados como o Coeficiente de Partição Octanol/Água (cLogP), Peso Molecular (PM), Volume Molecular (VM), Número de Ligações Doadoras de Hidrogênio (HBD) e Aceptora de Hidrogênio (HBA), usando as ferramentas OSIRIS Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>), MedChem Designer (Simulations Plus, Inc) e Marvin Sketch (ChemAxon - <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>). Os compostos também foram submetidos a análises ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), usando a ferramenta ADMETSAR (www.admetexp.org), sendo, nesse caso, analisados os parâmetros de absorção, metabolismo, excreção e perfil toxicológico dos fármacos (FEIXIONG, 2012). Todas as ferramentas utilizadas são *softwares* gratuitos disponíveis na rede mundial de computadores (*internet*).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Quando a variância foi homogênea, os grupos foram comparados através da análise de variância (ANOVA), seguidos pelos Testes de Newman-Keuls ou Tukey. Em caso de variância não-homogênea, as análises seguiram métodos não paramétricos como o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, quando necessário. A probabilidade de nível inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerada significativa. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um programa de computador e do Software GraphPad Prism 6 PRO[®].

5 RESULTADOS

5.2 AVALIAÇÕES *IN VITRO*

Os estudos (utilizando os lotes dos fármacos produzidos pela Obiter Research LLC) *in vitro* revelaram um pronunciado efeito leishmanicida de ambos os fármacos tanto contra *L. amazonensis* quanto contra *L. chagasi*. Os resultados abaixo corroboram essa afirmação.

5.2.1 Atividade Anti-promastigota

Estudos de avaliação de atividade leishmanicida *in vitro*, normalmente, iniciam-se pela avaliação da atividade anti-promastigota. Embora essa forma do parasito seja encontrada apenas no hospedeiro invertebrado, a facilidade de manutenção em cultura e de realização dos testes a torna uma ferramenta útil especialmente em fase de triagem de vários fármacos. É importante destacar que, não necessariamente uma alta atividade anti-promastigota redundará em alta atividade anti-amastigota ou mesmo atividade *in vivo*, mas pode ser um indicativo do potencial de um fármaco específico contra espécies de *Leishmania*.

Outro aspecto de relevância é que espécies diferentes apresentam susceptibilidade diversa aos fármacos estudados. Desta forma, é muitíssimo importante a avaliação de várias espécies para a triagem farmacológica. Em nosso caso, avaliamos uma espécie causadora de doença tegumentar e outra de doença visceral, nas Américas.

A Figura 11 mostra atividade de 18-MC contra promastigotas de *L. amazonensis* (Fig. 11A) e *L. chagasi* (Fig. 11B) ao longo do tempo. As concentrações avaliadas foram 25, 50 e 100µg/mL e o fármaco foi adicionado uma única vez à cultura de células. É possível observar uma significativa redução do número de parasitos já nas primeiras 24 horas nos tratamentos de 50 e 100 µg/mL em comparação com o grupo controle não tratado em ambas as espécies. Em 72 horas todos os tratamentos diminuem drasticamente o número de promastigotas nas culturas em comparação com o controle. Há significância estatística $p \leq 0,001$ ao longo do tempo e entre os grupos.

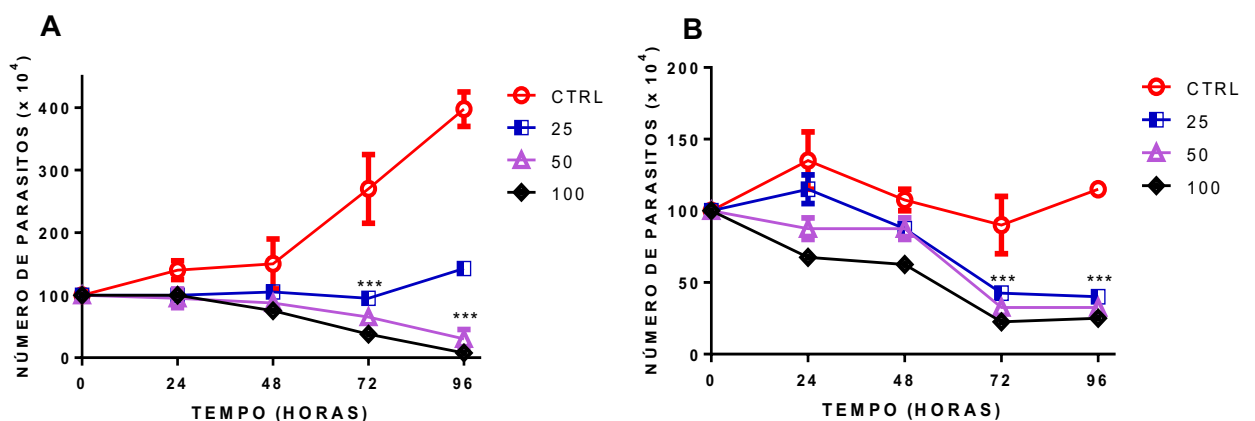


Figura11 – Inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. chagasi* após incubação com diferentes concentrações de 18-MC (25, 50 e 100µg/mL). O resultado de três experimentos feitos em duplicata são expressos em inibição do crescimento, comparados ao controle não tratado. *** $p \leq 0,01$.

Em contrapartida, ao analisarmos a atividade de 18-EC (Figura 12A e 12B) nas mesmas condições, observamos a mesma redução pronunciada nas concentrações de 50 e 100µg/mL nas primeiras 24 horas de cultivo em ambas as espécies estudadas. Por outro lado, 18-EC reduziu drasticamente o número de promastigotas em todos os grupos tratados já em 48 horas de cultivo e que se

manteve ao longo do tempo de avaliação, revelando uma atividade mais rápida quando comparada com 18-MC. Há significância estatística $p \leq 0,001$ ao longo do tempo e entre os grupos.

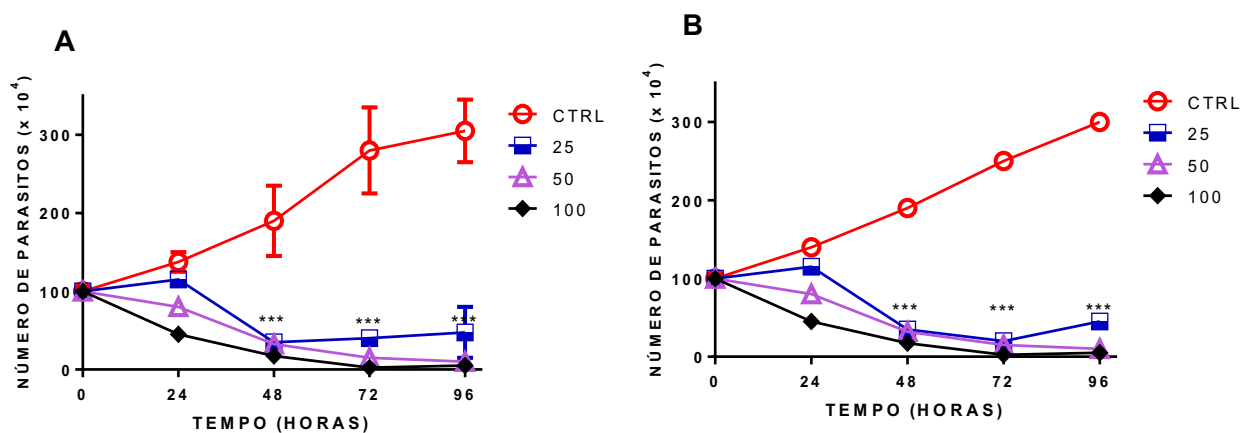
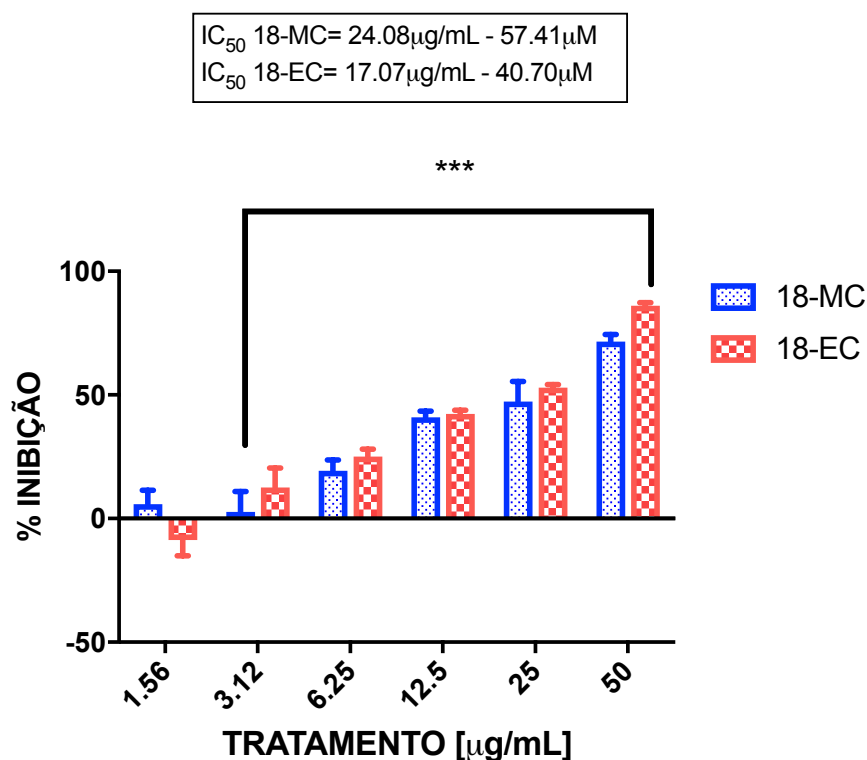


Figura 12 - Inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. chagasi* após incubação com diferentes concentrações de 18-EC (25, 50 e 100 μ g/mL). Os resultados [Média \pm Erro da Média (SEM)] de três experimentos feitos em duplicata são expressos em inibição do crescimento, comparados ao controle não tratado. *** $p \leq 0,01$.

Após avaliarmos que o ápice da atividade anti-promastigota para ambos os fármacos acontecia em 72 horas (48h para 18-EC e 72h para 18-MC), que as concentrações de 50 e 100 μ g/mL possuíam atividades muito próximas e que o comportamento de ambos era muito semelhante nas duas espécies avaliadas, realizamos um estudo da atividade anti-promastigota em diferentes concentrações dos fármacos no intuito de determinar o IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%) de cada um. Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram, então, incubados por 72 horas em diferentes concentrações dos fármacos; após esse tempo a viabilidade/sobrevivência dos parasitos foi determinada por microscopia de luz em hemocítômetro. Os resultados são expressos como inibição da sobrevivência em relação ao grupo controle não tratado.

A Figura 13 (A e B) sugere que a atividade de 18-EC é maior que de 18-MC nas duas espécies avaliadas. É possível observar uma pequena inibição da sobrevivência dos parasitos já na menor concentração avaliada. Em concentrações intermediárias essa diferença entre os fármacos é um pouco menor, mas volta a ser relevante na concentração de 25µg/mL. Os IC₅₀ determinados para os fármacos são em *L. amazonensis* são: 18-EC – 17,07µg/mL (40,64µM) e de 18-MC – 24,08µg/mL (59,40µM) e em *L. chagasi* são: 18-EC – 17,09µg/mL (40,67µM) e de 18-MC – 24,03µg/mL (59,40µM), revelando a semelhança de atividades em ambas as espécies do parasito que foram estudadas. Os resultados são estatisticamente significativos e $p \leq 0,001$.



A

ANTI-PROMASTIGOTES ACTIVITY OF 18-MC AND 18-EC

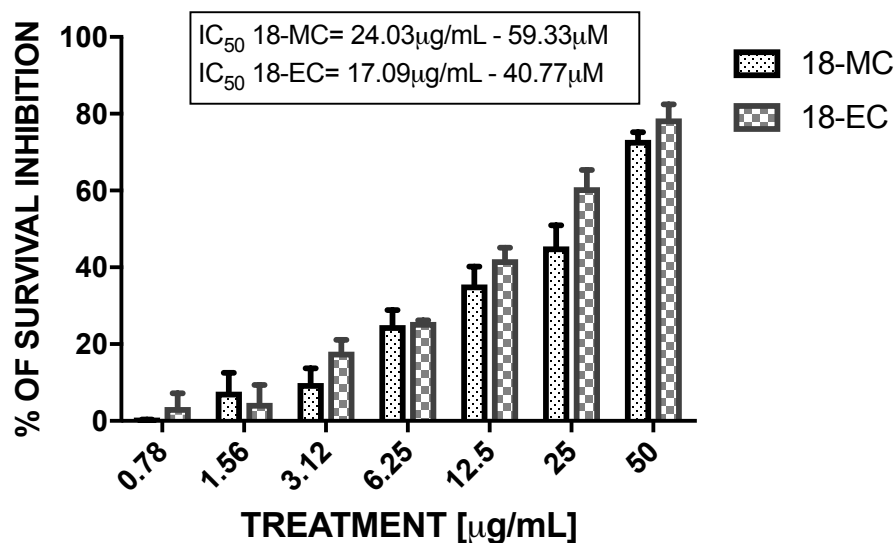


Figura 13 – Avaliação comparativa da atividade leishmanicida de 18-MC e 18-EC contra promastigotas de *L. amazonensis* (A) e *L. chagasi* (B) em diferentes concentrações dos fármacos. Os resultados (Média \pm SEM) de três experimentos em triplicata são apresentados em percentual de inibição da sobrevivência dos parasitos em relação aos controles não tratados. *** $p \leq 0,001$.

5.2.2 Atividade Anti-amastigota

A etapa subsequente à avaliação anti-promastigota é avaliar o efeito leishmanicida dos fármacos contra as formas amastigotas do parasito. As formas amastigotas são encontradas no hospedeiro vertebrado e, portanto, fármacos que possuem atividade significativa nessa forma evolutiva são potencialmente mais efetivos *in vivo*, do que os que possuem baixa atividade.

A atividade do fármaco, nesse caso, é medida avaliando-se a sua capacidade em reduzir o Índice de Infectividade do parasito, parâmetro que leva em consideração o percentual de macrófagos infectados multiplicado pelo número médio de parasitos por macrófago. A inibição da sobrevivência é expressa em relação aos controles não tratados.

Ao observarmos a atividade anti-amastigota de 18-MC e 18-EC (10, 20 e 40 μ g/mL) em *L. chagasi* é possível verificar que ambos os fármacos foram capazes de inibir a sobrevivência do parasito de forma bastante significativa (Figura 14).

Ao tratarmos os macrófagos infectados com 10 μ g/mL dos fármacos, observamos uma inibição 2,5 vezes maior gerada por 18-EC em relação a 18-MC. Tal diferença não é observada nas demais concentrações avaliadas, em que 18-MC apresentou atividade um pouco maior. O IC₅₀ calculado de ambos os fármacos foi: 18-EC – 12,75 μ g/mL (28,71 μ M) e 18-MC – 16,23 μ g/mL (39,60 μ M). As diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

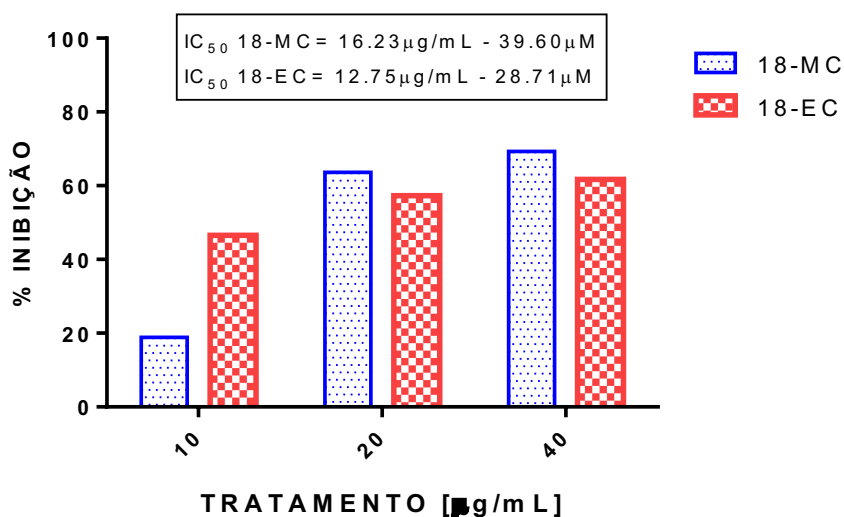


Figura 14 – Avaliação comparativa da atividade leishmanicida de 18-MC e 18-EC contra amastigotas de *L. chagasi* em diferentes concentrações dos fármacos. Os resultados oriundos de um experimento (de um total de três experimentos) em duplicata são apresentados em percentual de inibição da sobrevivência dos parasitos em relação aos controles não tratados.

Por questões técnicas, não foi possível avaliar a atividade anti-amastigota dos fármacos na espécie *L. amazonensis*. O referido estudo está em andamento, entretanto, levando-se em consideração a atividade já estudada de 18-MC contra *L. amazonensis*, evidenciada na Figura 9 (DELORENZI *et al.*, 2002), e a atividade

revelada contra o parasito causador da doença visceral, é possível inferir que ambos os fármacos também serão ativos contra essa espécie causadora de doença tegumentar.

5.2.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos fármacos foi determinada usando o método do XTT (BOU-HABIB *et al.*, 1994) que mede a atividade de desidrogenases mitocondriais e, conseqüentemente, permite avaliar a viabilidade celular em etapas anteriores à morte da célula quando sua membrana plasmática já sofreu rompimento.

Como mostrado em secções anteriores, 18-MC mostrou-se extremamente segura em nosso sistema experimental. Novas avaliações de citotoxicidade de 18-MC e também 18-EC foram realizadas utilizando-se os novos lotes obtidos para o desenvolvimento do presente projeto (Figura 15). Essas avaliações foram realizadas em diferentes concentrações dos fármacos para que fosse possível determinar a CC_{50} (Concentração Citotóxica para 50% das células) dos mesmos nesse sistema experimental. Entretanto, não foi possível determinar tal parâmetro uma vez que a maior concentração testada ($100\mu\text{g/mL}$) não inibiu mais de 29% da atividade mitocondrial dos macrófagos, revelando que ambos os fármacos são extremamente seguros. Nesse caso, portanto, foi determinado o CC_{20} (Concentração Citotóxica de 20% das células): 18-EC – $45,70\mu\text{g/mL}$ ($107,65\mu\text{M}$) e 18-MC – $30,22\mu\text{g/mL}$ ($74,26\mu\text{M}$). As diferenças observadas entre os fármacos não foram estatisticamente significativas com $p \geq 0,05$.

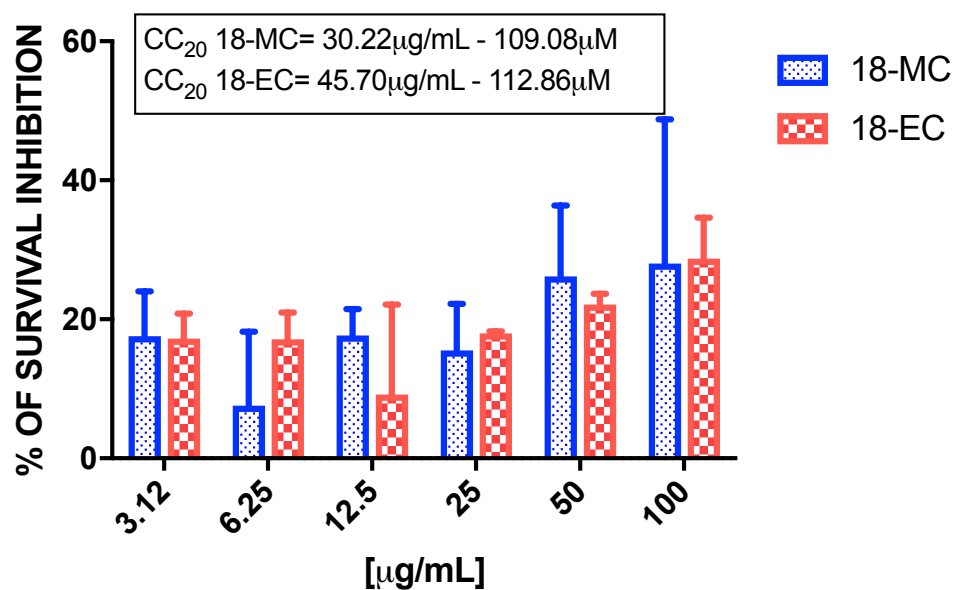


Figura 15 – Avaliação comparativa do efeito citotóxico de 18-MC e 18-EC contra macrófagos de camundongos BALB/C em diferentes concentrações dos fármacos. Os resultados (Média \pm SEM) de três experimentos em triplicata são apresentados em percentual de inibição da sobrevivência dos parasitos em relação aos controles não tratados. ** $p \leq 0,05$ entre os tratados e o grupo controle. $P > 0,05$ entre os fármacos.

5.3 AVALIAÇÕES *IN SILICO*

Avaliações *in silico* são ferramentas computacionais úteis para a previsão do comportamento de moléculas como fármacos. Parâmetros que levem em conta o perfil hidrofóbico, relacionado com a biodisponibilidade oral, e propriedades eletrônicas das substâncias podem ser usados para gerar uma escala de valores/pontos que classificam a molécula como potencial fármaco passível de ser utilizado clinicamente.

O *software* OSIRIS permite o cálculo do potencial de ser fármaco (*Druglikeness*), baseado nas propriedades eletrônicas e hidrofobicidade. A Figura 16A revela tais valores obtidos pelos alcaloides em estudo, comparados com o alcaloide parental, Coronaridina (COR), além de compararmos com Miltefonisa e

Anfotericina B. Da mesma forma o *Drug-Score* é um parâmetro que combina o *Druglikeness*, cLog P, peso molecular e riscos tóxicos potenciais. Na Figura 16B é possível observar a pontuação obtida por cada um dos fármacos estudado via software Osiris. Miltefosina, fármaco já em uso corrente para o tratamento de Leishmaniose visceral na Índia apresenta o pior *druglikeness*, o que, em teoria, o tornaria uma molécula pouco viável a ser tornar um medicamento. O melhor valor de *drugliness* foi obtido pela COR, entretanto, pelas avaliações *in vitro* apresentadas em secções anteriores observamos que 18-EC teria o melhor efeito leishmanicida, entretanto, obteve um *druglikeness* negativo.

Tais resultados apontam que, nesse caso, possivelmente não há uma correlação direta entre essas previsões teóricas e os fármacos avaliados. Contudo, apontam também que nossos alcaloides apresentam *Drug-Score* superior aos fármacos disponíveis no mercado, o que estimula a continuidade do estudo com essas substâncias.

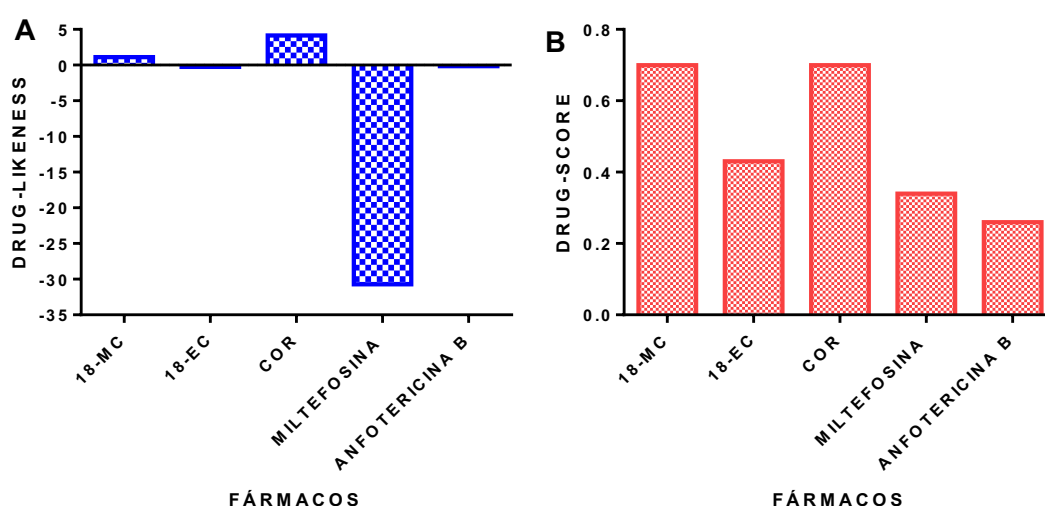


Figura 16 – Avaliação comparativa do perfil de *Drug-likeness* e *Drug-Score*, obtidos usando ferramentas de avaliação *in silico*, nesse caso, o software Osiris, de 18-MC, 18-EC, COR e os fármacos comerciais Miltefosina e Anfotericina B.

Na figura 17 é possível observar os riscos tóxicos potenciais das mesmas moléculas avaliadas pelo *software* Osiris. Com exceção de 18-EC que apresenta moderado potencial de se comportar como um fármaco irritativo, todos os outros avaliados apresentam baixo risco tóxico.

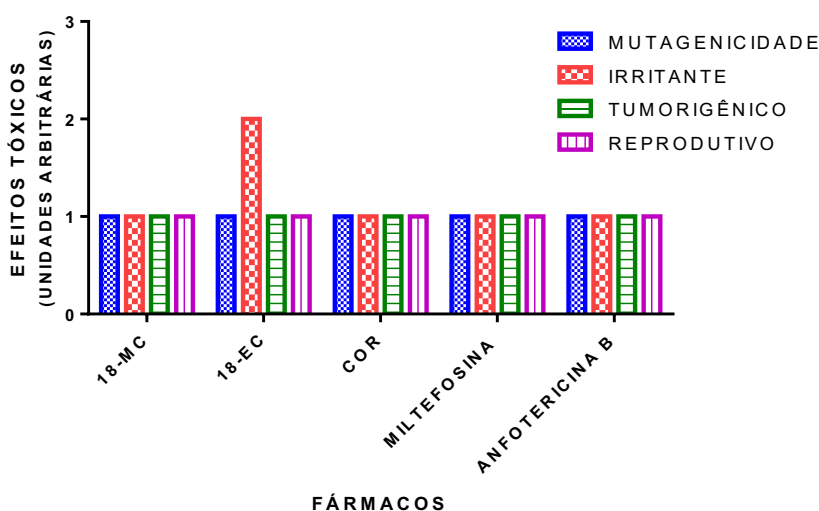


Figura 17 – Perfil de toxicidade de 18-MC, 18-EC, COR e os medicamentos comerciais, Miltefosina e Anfotericina B, avaliados *in silico* pelo programa Osiris.

Utilizando o *software* Marvin avaliamos algumas propriedades eletrônicas dos três alcaloides, bem como se os mesmos atenderiam à “Regra dos 5” proposta por Lipinski (2001) e comparamos com o efeito leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Na Tabela III é possível observar os resultados. Os três alcaloides atendem à “Regra dos 5” e possuem características eletrônicas muito semelhantes, com exceção do MD de 18-EC. Dessa forma, não é possível estabelecer uma correlação direta entre as propriedades eletrônicas e as diferenças de eficácia de cada molécula. Em nosso estudo experimental, não avaliamos a atividade leishmanicida de COR, entretanto esse alcaloide foi avaliado anteriormente, apresentando alta atividade, embora menor que 18-MC (DELORENZI *et al.*, 2002).

Tabela III – Avaliação comparativa dos alcaloides indólicos COR, 18-MC E 18-EC, quanto suas propriedades eletrônicas e valores da “Regra dos 5” de Lipinski, além da atividade Leishmanicida dos mesmos

FÁRMACO	R em C ₁₈	ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA (IC ₅₀ µg/mL)		“REGRA DOS 5” LIPINSKI (2001)							
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>	CLogP	LogD *	HBA	HBD	PM	pKa	PI	MD
COR	-H ₃	ND	ND	3,52	2,33	1	2	339,45	8,56	12,47	3,63
18-MC	-OCH ₃	24,08	24,03	2,73	1,69	2	2	369,47	8,39	12,40	3,57
18-EC	-OCH ₂ CH ₃	17,07	17,09	3,08	2,05	2	2	383,50	8,39	12,40	2,36

ND – Não determinada; CLogP (coeficiente de partição octanol/água); LogD (coeficiente de partição octanol/água em pH específico: *pH=7,4); HBA (Ligações Aceptoras de Hidrogênio); HBD (Ligações doadoras de Hidrogênio); PM (Peso Molecular); pKa (constante de dissociação); PI (ponto isoelétrico); MD (momento dipolar). Todos os cálculos foram determinados pelo Software Marvin (ChemAxon, Inc).

Do ponto de vista das características farmacocinéticas, utilizamos o software AdmetSar para as avaliações de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Os resultados são apresentados na Tabela IV e sugerem perfil de absorção bastante interessante das moléculas em estudo, evidenciando que os mesmos podem ultrapassar a barreira hemato-encefálica e que possuem boa absorção intestinal. Entretanto, sugere que apenas a COR seja permeável às células CACO-2, o que evidencia que as modificações em C-18 diminuiriam a permeabilidade plasmática desses alcaloides. Além disso, sugere também que os três alcaloides são substratos, apenas, do complexo enzimático CYP450 3A4 e que apenas a COR inibiriam os complexos 2D6 e 3A4.

Do ponto de vista da toxicidade, os três alcaloides não seriam potencialmente carcinogênicos ou mutagênicos, entretanto, é possível que apresentem elevada toxicidade ambiental (Tabela IV).

Tabela IV – Avaliação comparativa de COR, 18-MC e 18-EC quanto ao perfil ADMET. As avaliações foram realizadas usando o software AdmetSar (CHENG *et al.*, 2012).

PARÂMETRO AVALIADO	COR	18-MC	18-EC
	RESULTADO	RESULTADO	RESULTADO
ABSORÇÃO			
Barreira Encefálica	Permeável	Permeável	Permeável
Absorção Intestinal	Permeável	Permeável	Permeável
Permeabilidade CACO-2	Permeável	Não-Permeável	Não-Permeável
Transportador Renal	Inibidor	Inibidor	Inibidor
DISTRIBUIÇÃO	ND	ND	ND
METABOLISMO			
Substrato de CYP450 2C9	Não substrato	Não substrato	Não substrato
Substrato de CYP450 2D6	Não substrato	Não substrato	Não substrato
Substrato de CYP450 3A4	Substrato	Substrato	Substrato
Inibidor de CYP450 1A2	Não inibidor	Não inibidor	Não inibidor
Inibidor de CYP450 2C9	Não inibidor	Não inibidor	Não inibidor
Inibidor de CYP450 2D6	Inibidor	Não inibidor	Não inibidor
Inibidor de CYP450 2C19	Não inibidor	Não inibidor	Não inibidor
Inibidor de CYP450 3A4	Inibidor	Não inibidor	Não inibidor
EXCREÇÃO	ND	ND	ND
TOXICIDADE			
Human Ether-a-go-go-Related Gene Inhibition (hERG)	Inibidor Fraco	Inibidor Fraco	Inibidor Fraco
Toxicidade AMES	Nenhuma Toxicidade	Nenhuma Toxicidade	Nenhuma Toxicidade
Carcinogênico	Não carcinogênico	Não carcinogênico	Não carcinogênico
Toxicidade à Peixes	Elevada	Elevada	Elevada
Toxicidade a <i>Tetrahymena pyriformis</i>	Elevada	Elevada	Elevada
Toxicidade a Abelhas Melíferas	Baixa	Baixa	Baixa
Biodegradação	Não Biodegradável	Não Biodegradável	Não Biodegradável

LD ₅₀ Toxicidade Aguda – Ratos	3.0136 mol/Kg	2.8795 mol/Kg	2.9019 mol/Kg
LD ₅₀ Toxicidade Peixes	1.1632 mg/L	1.4232 mg/L	1.4903 mg/L
LD ₅₀ Toxicidade Tetrahymena pyriformis	0.5139 µg/L	0.5238 † g/L	0.4597 † g/L

ND – Não Determinada.

5.4 AVALIAÇÕES *IN VIVO*

5.4.1 Avaliação da Atividade Leishmanicida de 18-MC em modelo de infecção tegumentar

Seguindo o mesmo modelo descrito na secção 5.1.4, contudo, utilizando o lote de 18-MC descrito em Materiais e Métodos, um novo conjunto de avaliações da atividade do fármaco em modelo de infecção tegumentar foi realizado recentemente.

A atividade leishmanicida de 18-MC foi determinada em modelo de infecção estabelecida (crônica) (LE FICHOUX *et al.*, 1998), os resultados observados foram ainda mais relevantes que os observados na Tabela II. Os resultados de redução da carga parasitária podem ser observados na Tabela V. Camundongos BALB/C foram infectados com 5.10^6 promastigotas/animal de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento e o tratamento foi iniciado no trigésimo dia (D30) após a infecção. Neste caso, 20mg/Kg/dia, VO de 18-MC foi administrada por cinco dias consecutivos.

Tabela V – Avaliação da atividade leishmanicida de 18-MC – 5 dias de tratamento.

Tratamento Fármaco [mg/kg.dia]	Redução Carga Parasitária			
	Pata		Linfonodo	
	Nº Parasitas (x 10 ³)	%	Nº Parasitas (x 10 ³)	%
CTRL	54,6	0	65,5	0
GLU 200 IP	0,55*	99	0,13*	99,8
18-MC 20 VO	0,15*	99,7	0,12*	99,9

* $p < 0,001$ para os testes de Tukey, Dunnett e Student

É importante destacar que este modelo de infecção estabelecida (crônica) é o que melhor mimetiza o que acontece no ser humano, uma vez que, somente com a infecção estabelecida e com o aparecimento das lesões é que o indivíduo busca assistência médica e o tratamento adequado.

Com intuito de observar o aparecimento de cura estéril nos animais infectados no modelo crônico, o tratamento com 18-MC foi duplicado, ou seja, os animais foram tratados com 10 ou 20mg/Kg/dia, VO por 10 dias consecutivos. Os resultados podem ser observados na Tabela VI.

Tabela VI – Avaliação da atividade leishmanicida de 18-MC – 10 dias de tratamento.

Tratamento Fármaco [mg/kg.dia]	Pata	
	Nº Parasitas (x 10 ⁴)	%
CTRL	423	0
GLU 200 IP	2,43*	99,40
18-MC 10 VO	0,34*	99,91
18-MC 20 VO	0,074*	99,98

* $p < 0,05$ pelos testes Tukey e Dunnett

Após a eutanásia, os órgãos de animais infectados e tratados com 18-MC foram coletados para análise de possíveis alterações histopatológicas induzidas pelo fármaco na dose terapêutica, ou seja, 20mg/Kg/dia. Os órgãos coletados foram: baço, cérebro, coração, fígado e rim. As Figuras 18 e 19 mostram cortes histológicos de baço e fígado de animais controle e tratados com 18-MC, respectivamente. É possível observar que, em dose terapêutica, o fármaco não provocou nenhuma alteração macroestrutural destes órgãos, bem como na arquitetura tecidual, revelando um tecido homogêneo, com suas características histológicas preservadas quando comparadas com os animais controle. É importante destacar com relação ao baço

que, tanto a polpa branca quanto a vermelha estão bem visualizadas, sem apresentar sinais de indução de resposta imunológica diferentes entre animais tratados e controle.

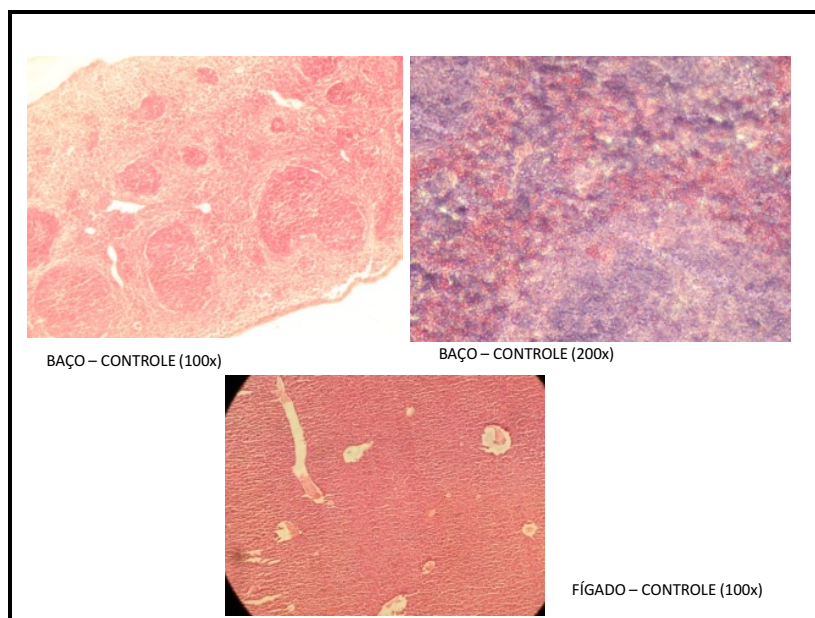


Figura 18 – Histologia de Baço e Fígado de animais controle infectados. Coloração: Hematoxilina-Eosina.(100X e 200X)

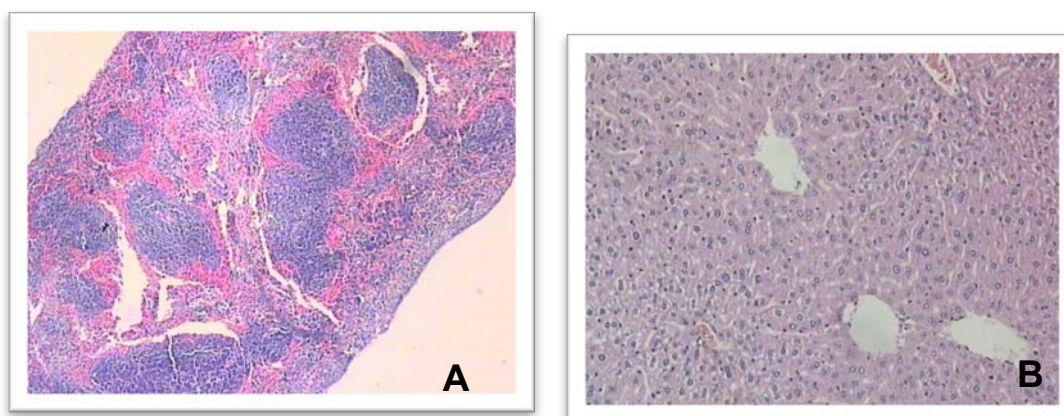


Figura 19 – Corte histológico de Baço (A) e Fígado (B) de animais infectados e tratados com 20mg/Kg/dia de 18-MC. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: A: 50X e B: 200X.

Da mesma maneira, outros órgãos de animais infectados e tratados com 18-MC foram avaliados do ponto de vista histológico e não apresentaram qualquer alteração morfológica que possa ser atribuída aos fármacos.

Na Figura 20 é possível observar a morfologia típica do coração de um animal controle (A) com suas fibras cardíacas bem preservadas e de um animal tratado com

20mg/Kg/dia de 18-MC (B) apresentando a mesma morfologia típica do tecido do animal controle.

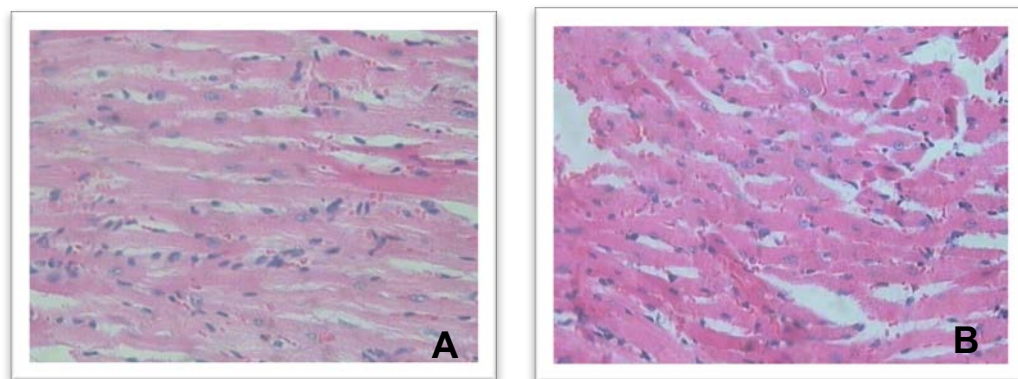


Figura 20 – Histologia de Coração de animais infectados apenas (A) e infectados e tratados 18-MC (B). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200X.

Nas Figuras 21 e 22 é possível observar a morfologia típica das estruturas renais dos animais infectados, não tratados (CTRL) e tratados com 18-MC, respectivamente. Quando comparados com os controles, os tecidos dos animais tratados não apresentaram qualquer alteração, tanto na região cortical quanto medular, evidenciando, que na dose em que o efeito leishmanicida é observado não há toxicidade para esse órgão. A análise histopatológica do cérebro não revelou qualquer alteração dos animais tratados quando comparados com os controles não tratados (dados não mostrados).

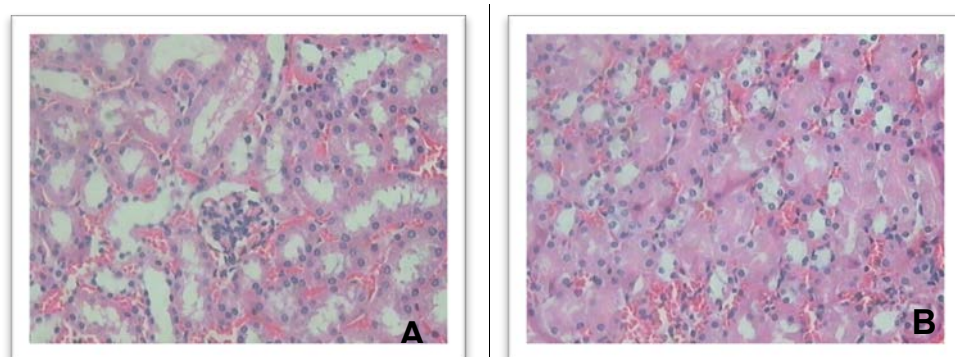


Figura 21 – Análise histológica de rim de animais infectados não tratados (CTRL). (A) Região Cortical. (B) Região Medular. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200X.

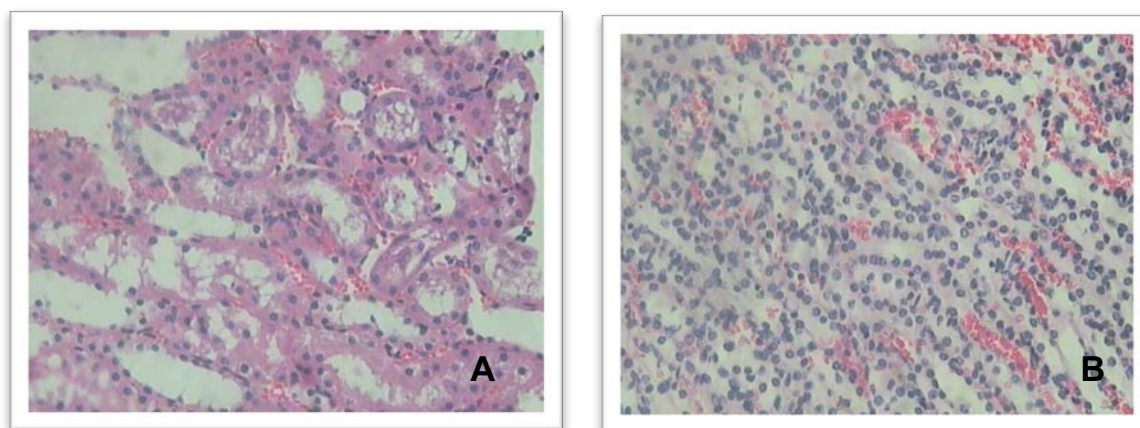


Figura 22 – Análise histológica de rim de animais infectados e tratados com 18-MC. (A) Região Cortical. (B) Região Medular. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200X.

5.4.2 Avaliações Toxicológicas Aguda e de Doses Repetidas de 18-MC

5.4.2.1 Toxicidade Aguda

No Quadro 1 é possível observar as informações oriundas do tratamento em doses elevadas de 18-MC. O protocolo utilizado para tal fim é o clássico proposto pela OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development* – e recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), usando machos e fêmeas de camundongos BALB/c de mesma ninhada em cada experimento. O fármaco apresentou toxicidade variada e óbito nas doses mais elevadas. Entretanto, essas doses foram, pelo menos, 10 vezes maior do que a terapêutica (ANVISA, 2010 e OECD, 2001).

Quadro 1 – Avaliação temporal dos animais tratados com 18-MC em doses elevadas. 18-MC foi administrada em dose única nas concentrações de 50, 100, 200 e 300mg/Kg VO. m – machos e f – fêmeas. Aos animais do Grupo Controle foi administrado água potável pela mesma via de administração.

TRATAMENTO	ÓBITOS	SINAIS/SINTOMAS
CTRL	0	
18-MC 50mg/Kg (n=5 fêmeas e 8 machos)	0	<p>Fêmeas – os animais não apresentaram qualquer alteração fisiológica e comportamental.</p> <p>Machos – Os animais ficaram sonolentos nos primeiros 15 minutos após o tratamento. Após 1 hora todos estavam reativos aos estímulos. Houve diminuição significativa nas brigas.</p>
18-MC 100mg/Kg (n=3 fêmeas e 13 machos)	0 f 3 m	<p>Fêmeas</p> <p>1ª hora: Animais prostrados; dois apresentaram diarreia; aumento da ingestão de água.</p> <p>A partir da 2ª hora: animais recuperados; após 4 horas, alimentaram-se normalmente.</p> <p>Após 7 dias: animais em atividade normal; ingestão de água e alimento sem qualquer alteração.</p> <p>Machos</p> <p>Tremor: Animais apresentaram tremor após 30 minutos da administração oral. Retornaram à normalidade após 180 minutos.</p> <p>Descoordenação motora/equilíbrio: apresentaram dificuldade de locomoção 30 minutos após a gavagem. Retorno à normalidade após 180 minutos.</p> <p>Outros sinais: respiração descompensada, sonolência, letargia, vascularização, lacrimejamento, defecação. Os sinais desapareceram após 180 minutos do tratamento.</p> <p>Morte: 1 animal morreu após 180 minutos do tratamento e outros 2 morreram após 24 horas. Os sinais anteriores ao óbito foram tremores, prostração e convulsão. A necrópsia dos animais não revelou alteração orgânica que justificasse a convulsão.</p>
18-MC 200mg/Kg (n=7 fêmeas e 4 machos)	3 f 4 m	<p>Fêmeas</p> <p>1ª hora: Animais prostrados; dois apresentaram diarreia; aumento da ingestão</p>

	<p>de água. Um dos animais em estágio de caquexia.</p> <p>A partir da 2ª hora: um dos animais apresentou quadro convulsivo e evoluiu para o óbito 2:30 após o tratamento. O segundo e terceiro animais estavam letárgicos e não responsivos a estímulos. Os outros estavam normais.</p> <p>Após 2 dias: o segundo e terceiro animais foram a óbito, apresentando quadro de hemorragia interna.</p> <p>Após 7 dias: os animais que sobreviveram, estavam normais.</p> <p>Machos</p> <p>Apresentaram convulsão, tremor e descoordenação motora nas primeiras horas após o tratamento. Todos evoluíram para óbito após 180 minutos. Os sinais anteriores ao óbito foram tremores, prostração e convulsão. A necrópsia dos animais não revelou alteração orgânica que justificasse a convulsão.</p>
<p>18-MC 300mg/Kg (n=7 fêmeas e 4 machos)</p>	<p>3 f 4 m</p> <p>Fêmeas</p> <p>1ª hora: Animais prostrados; quatro apresentaram diarréia; aumento da ingesta de água. Dois dos animais em estágio de caquexia.</p> <p>A partir da 2ª hora: Dois dos animais apresentaram quadro convulsivo e ambos foram a óbito 2:30 e 3:15h após o tratamento. O terceiro animal continuou letárgico e não responsivo a estímulos. Os outros animais estavam normais.</p> <p>Após 5 dias: o terceiro animal evoluiu para o óbito após quadro convulsivo</p> <p>Após 7 dias: os animais que sobreviveram estavam normais.</p> <p>Machos</p> <p>Apresentaram convulsão, tremor e descoordenação motora nas primeiras horas após o tratamento. Todos evoluíram para óbito após 180 minutos. Os sinais anteriores ao óbito foram tremores, prostração e convulsão. A necrópsia dos animais não revelou alteração orgânica que justificasse a convulsão.</p>

5.4.2.2 Toxicidade de Doses Repetidas (5 dias)

Para o protocolo de toxicidade em doses repetidas foram utilizados camundongos BALB/C machos com aproximadamente seis semanas de vida e 25 g. 18-MC foi administrada uma vez por dia, por cinco dias nas concentrações de 20, 50 e 100 mg/Kg. Cada grupo possuía 4 animais e o grupo controle (aos quais foi oferecido apenas água), 5 animais.

Todos os animais estavam bastante agitados antes do início do tratamento, o que é considerado comportamento normal em machos de camundongos. Após o primeiro dia de tratamento, os grupos tratados adquiriram comportamento mais calmo, mas não apresentaram letargia ou sonolência. Nenhum sinal de convulsão ou descoordenação motora foi observado em qualquer dos grupos e não houve nenhum óbito.

Em cada dia de tratamento, os grupos foram acompanhados por 180 minutos após a gavagem. Após o fim do tratamento os animais foram acompanhados diariamente, por 120 minutos, por 25 dias. Nenhum sinal de toxicidade foi observado nesse período.

Estas observações contrapõem-se aos observado no protocolo agudo, contudo, não foram utilizadas as concentrações em que ocorreram óbitos no protocolo anterior. Além disso, na dose de 100mg/Kg no primeiro dia de tratamento, os animais deste grupo mostraram-se sonolentos e letárgicos nas primeiras duas horas após o tratamento, fato não observado nos dias subseqüentes, o que parece indicar uma possível atenuação de algum efeito central em altas doses após a primeira dose do fármaco.

Não houve qualquer alteração em peso dos animais ou consumo de água ou ração durante o tempo de tratamento (dados não mostrados).

5.4.2.3 Análises Morfológicas

a) Toxicidade Aguda

As análises histológicas do baço e do cérebro de animais que evoluíram para o óbito após o tratamento agudo com 200mg/Kg de 18-MC não evidenciaram alterações morfológicas significativas, sendo comparáveis com os controles avaliados nos mesmos experimentos. A Figura 23 é representativa desta condição.

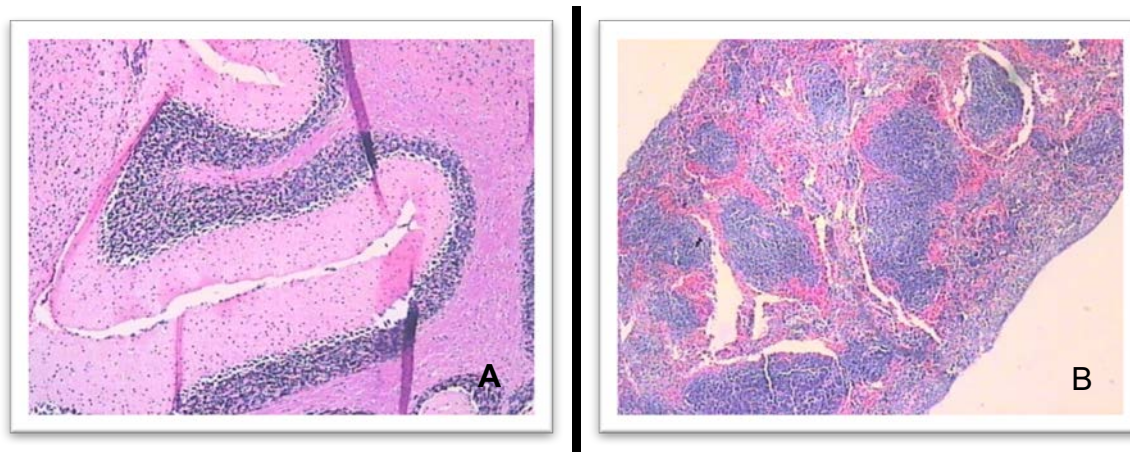


Figura 23 – Análise histológica Cérebro (A) e Baço (B) de animais tratados com 200mg/Kg de 18-MC, não evidenciando alterações morfológicas quando esses animais foram tratados com doses tóxicas de 18-MC. (A) Aumento: 100X. (B) Aumento: 50X. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

Por outro lado, as análises histopatológicas dos rins e fígado de animais tratados com uma única dose 200 ou 300mg/kg de 18-MC revelaram danos teciduais que poderiam ser implicados como co-responsáveis do óbito induzido pelo fármaco nesses animais. As Figuras 24 e 25 mostram cortes histológicos representativos dessa condição de rim e fígado, respectivamente.

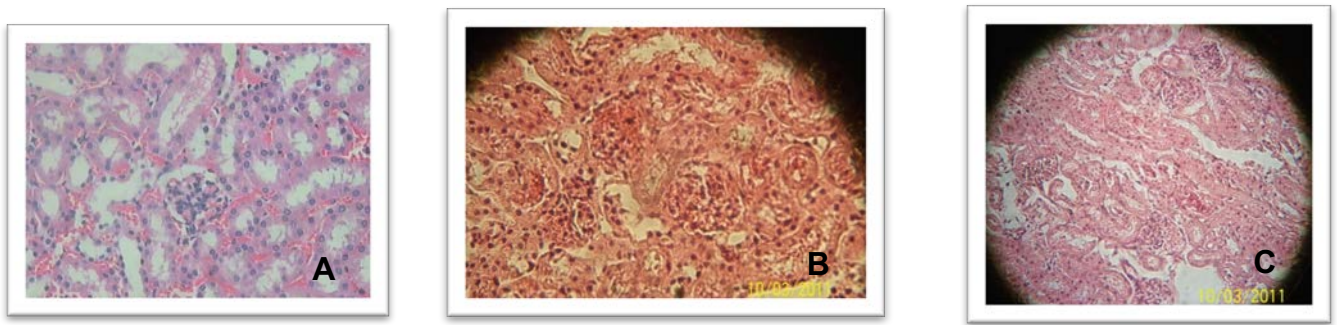


Figura 24 – Cortes histológicos de Rim de animais CTRL (A) e tratados com 200mg/Kg (B) e 300 mg/Kg (C) de 18-MC. É possível observar o colapso das cápsulas de Bowman nos animais tratados, o que poderia justificar alguns dos efeitos tóxicos observados nessas concentrações. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200X.

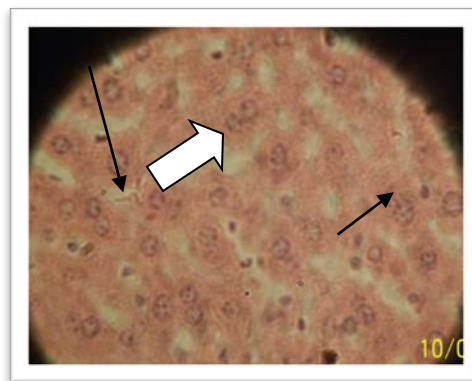


Figura 25 – Corte histológico de fígado de animal tratado com 200mg/Kg de 18-MC. As setas finas sugerem aumento do núcleo e possível condensação da cromatina e a seta larga indica possível retração celular, uma vez que o parênquima hepático se caracteriza por um tecido homogêneo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200X.

b) Toxicidade Crônica

Os achados histopatológicos do estudo de doses repetidas, 5 dias, assemelham-se em muito com os dados obtidos na toxicidade aguda. Órgãos como baço, cérebro, coração, pulmão apresentaram estrutura tecidual bem preservada, comparável aos controles, em todas as concentrações estudadas. Rins e fígado parecem ser órgãos preferenciais para os danos teciduais potencialmente causados por 18-MC. As doses em que as possíveis alterações foram observadas são 50 e 100mg/Kg/dia.

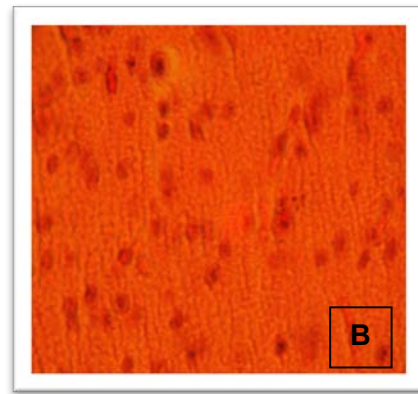
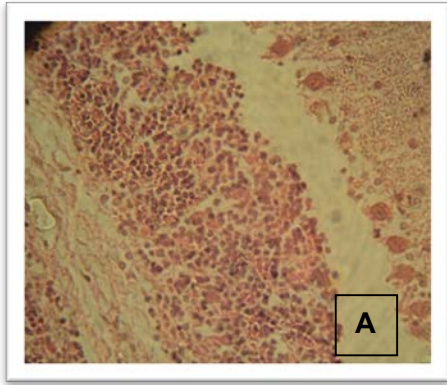


Figura 26 – A - Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

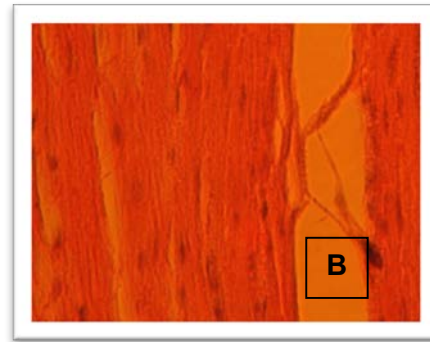
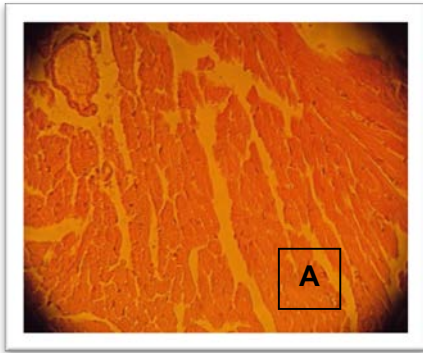


Figura 27 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

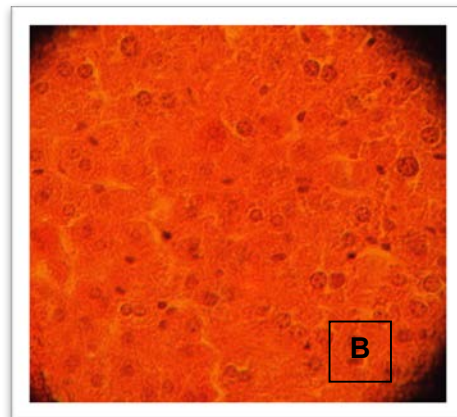
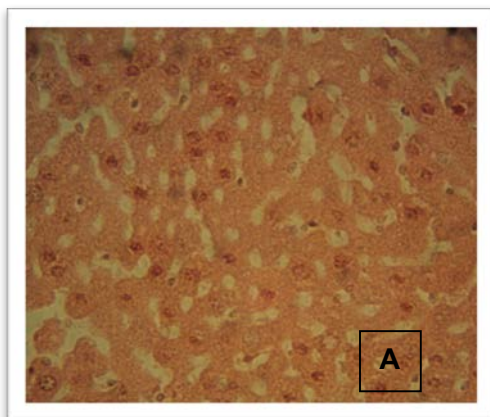


Figura 28 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do fígado, com parênquima hepático homogêneo. B – Corte histológico do fígado de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

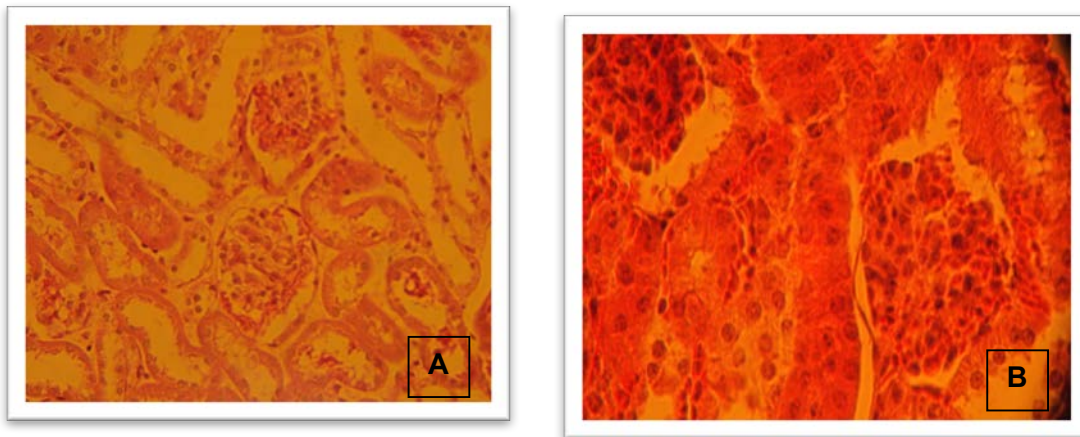


Figura 29 – A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 20mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do rim e das estruturas que formam os glomérulos, sem retração da cápsula de Bowman. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

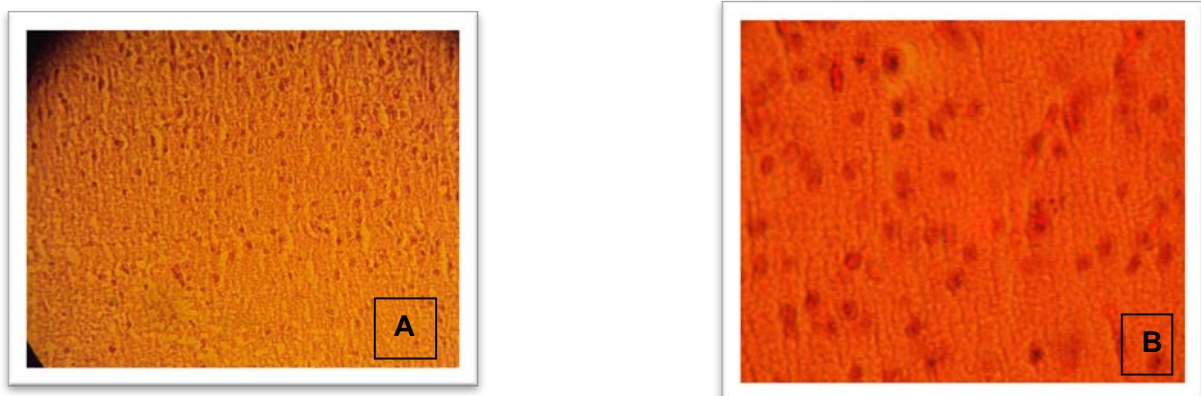


Figura 30 – A - Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. Aumento: 100X. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

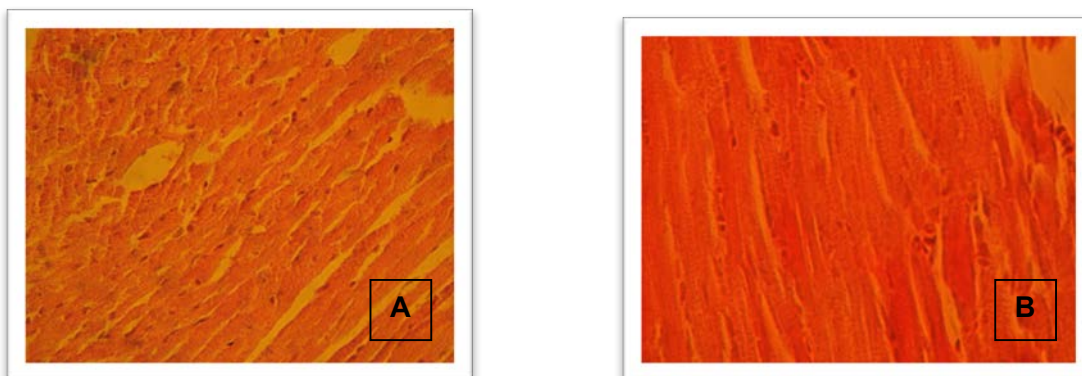


Figura 31 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração; Aumento: 100X. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 100X.

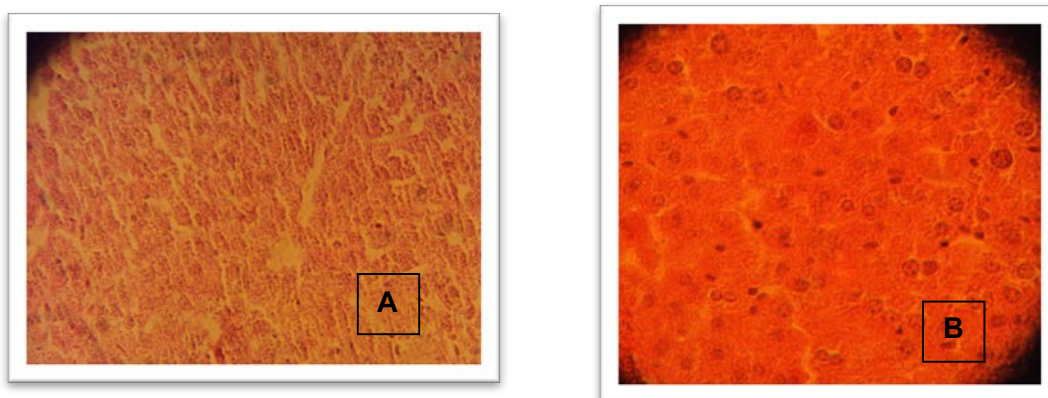


Figura 32 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do fígado, com parênquima hepático bastante homogêneo. Aumento: 100X. B – Corte histológico do fígado de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

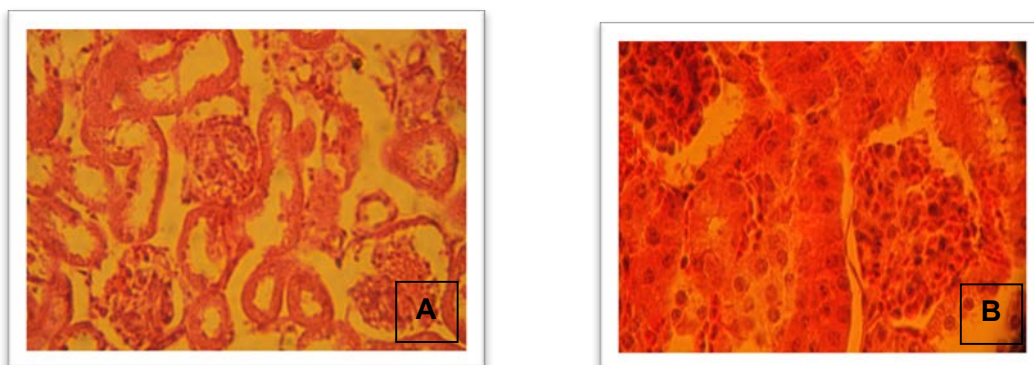


Figura 33 – A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 50mg/kg de 18-MC apresentando colabamento de alguns glomérulos com redução do espaço de Bowman. B – Corte histológico do rim de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

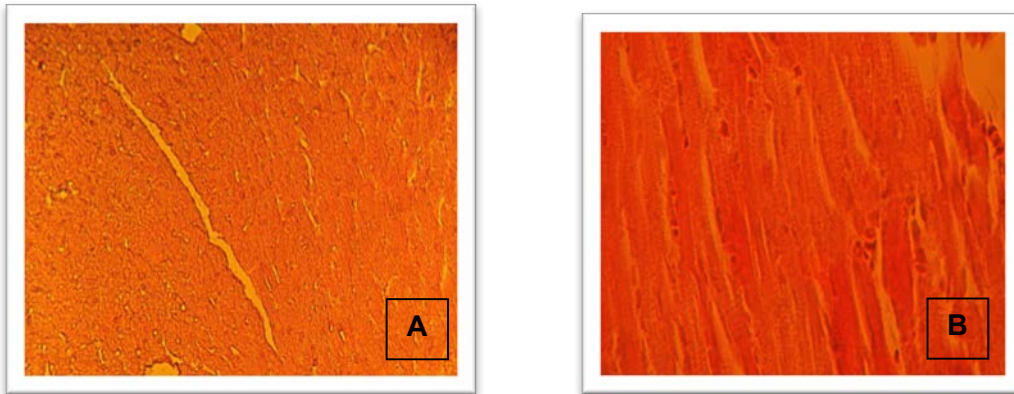


Figura 34 – A- Cérebro de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do cérebro. B – Corte histológico do cérebro de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

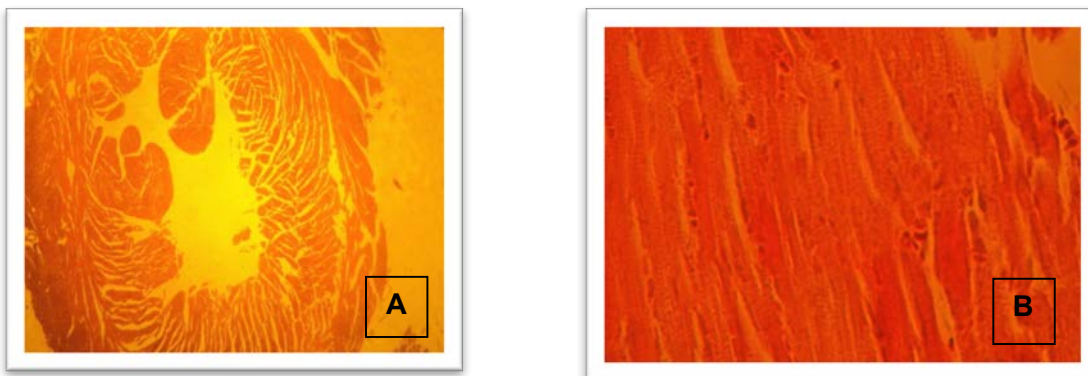


Figura 35 – A - Coração de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do coração. B – Corte histológico do coração de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

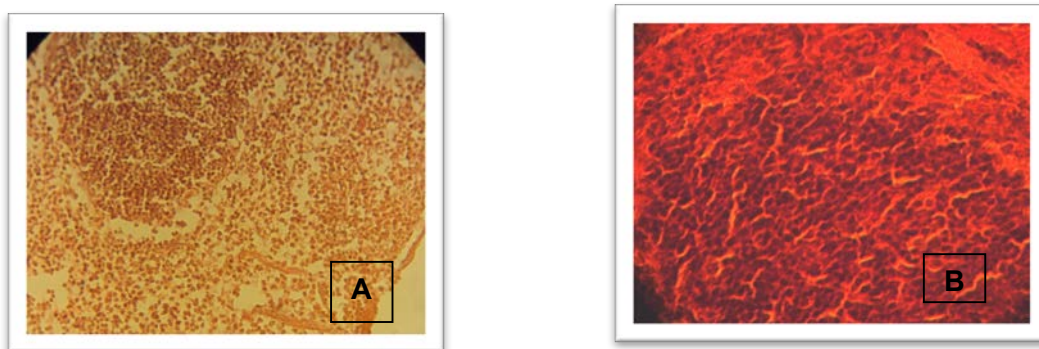


Figura 36 – A- Baço de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando boa preservação da arquitetura tecidual do Baço. B – Corte histológico do baço de animais não tratados (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

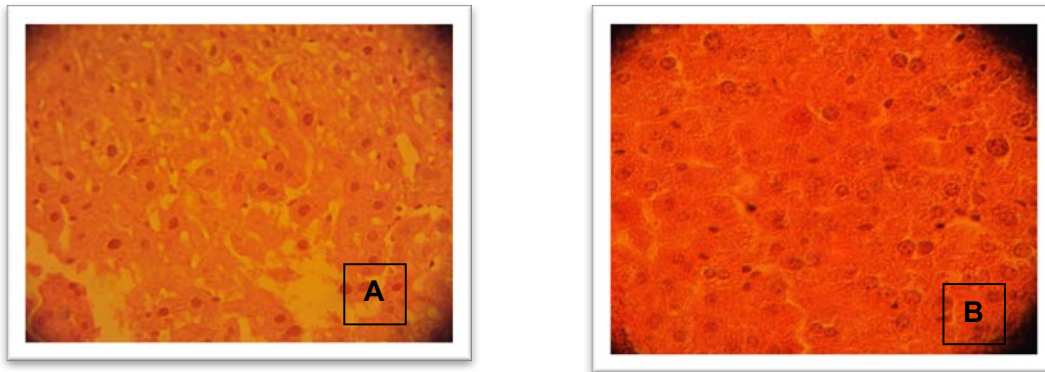


Figura 37 – A - Fígado de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando retração citoplasmática e aumento do núcleo, com possível condensação de cromatina. B – Corte histológico do fígado do animal que não recebeu tratamento (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

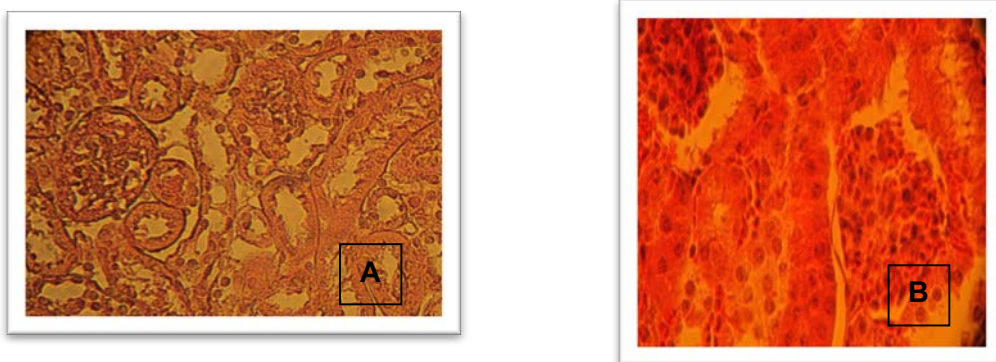


Figura 38 - A - Rim de animal tratado com dose única diária por cinco dias de 100mg/kg de 18-MC apresentando colabamento de glomélulos e diminuição dos espaços de Bowman. B – Corte histológico de Rim de animal não tratado (CTRL). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 400X.

É possível observar que tanto no estudo de toxicidade aguda quanto no de toxicidade de doses repetidas o órgão mais susceptível ao fármaco 18-MC foi o Rim (Figuras 33 e 38). O colabamento das cápsulas de Bowman pode comprometer a filtração glomerular e o acúmulo de líquidos e substâncias tóxicas ao organismo, o que pode estar implicado na toxicidade nas doses mais elevadas, gerando o óbito dos animais. É importante destacar que para a toxicidade de doses repetidas, tal

observação na dose de 50mg/Kg não correspondeu com óbitos dos animais ou quaisquer alterações clínicas passíveis de percepção ao observador treinado.

Outro fato importante é que em na dose de 100mg/Kg para a toxicidade de doses repetidas foi possível observar alterações do parênquima hepático (Figura 37), com possível retração citoplasmática e também o aparecimento de hepatócitos com cromatina condensada, especialmente na periferia da membrana nuclear. Tal observação indica a necessidade de realização de avaliação para a indução de morte celular programada (apoptose) em células de mamíferos.

5.4.3 Avaliação Bioquímica em soro de Ratos tratados com 10mg/Kg de 18-MC

Ratos Wistar foram submetidos a cirurgia (livre de sofrimento e dor) para colocação de cateter na veia e artéria femerais para administração de 18-MC endovenoso (veia) e coleta de sangue em diversos tempos (artéria). Os experimentos foram conduzidos usando uma única dose de 18-MC na concentração de 10mg/Kg. As vias de administração foram endovenosa e oral (nesse caso, 18-MC foi administrado 30 minutos antes de iniciar o processo de coleta de sangue, ou seja, no tratamento por via oral, o T₀ correspondeu a 30 minutos após o tratamento). O sangue desses animais foi coletado em diferentes tempos e submetido a dosagens bioquímicas de AST, ALT, Glicose, Colesterol e Triglicerídeos (Figura 39).

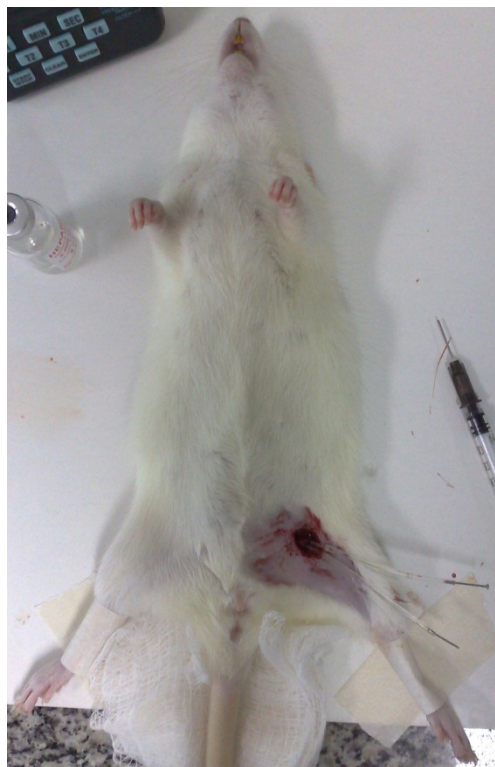


Figura 39 – Rato Wistar após procedimento cirúrgico de introdução de cânula femural (artéris e veia) para tratamento endovenoso e coleta de sangue.

Alterações nesses parâmetros poderiam ser sugestivas de alguma toxicidade mesmo em doses baixas do fármaco. Nenhuma alteração significativa foi observada nas dosagens realizadas. Nas Figuras 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 os resultados são expressos em dispersão de pontos em que cada ponto refere-se a um animal e é evidenciada a mediana dos dados; por outro lado, nas Figuras 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 e 55, 57, 59 os dados de cada parâmetro avaliado na administração do fármaco por via oral ou endovenosa são expressos em média \pm erro padrão dos animais tratados.

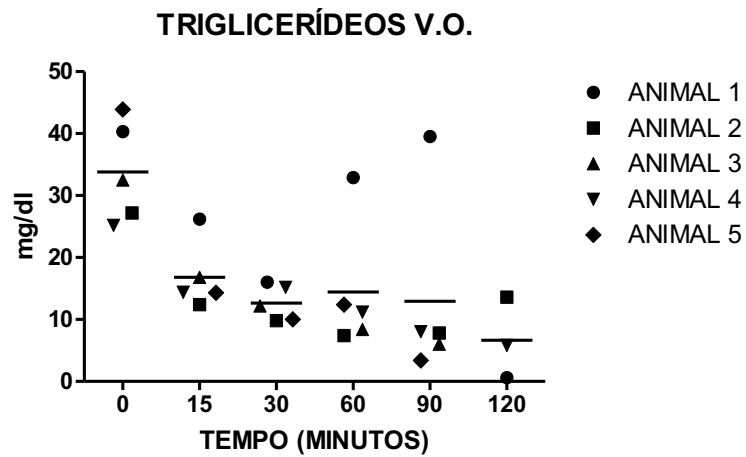


Figura 40 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco, pois os mesmos foram anestesiados após 15 minutos de ingestão oral deste para realizar a canulação da artéria e da veia femurais. Dessa forma, t_{15} corresponde a 45 minutos após a administração, t_{30} a 60 minutos, t_{60} a 90 minutos, t_{90} a 120 minutos e t_{120} a 180 minutos após administração do fármaco. $p \leq 0.05$

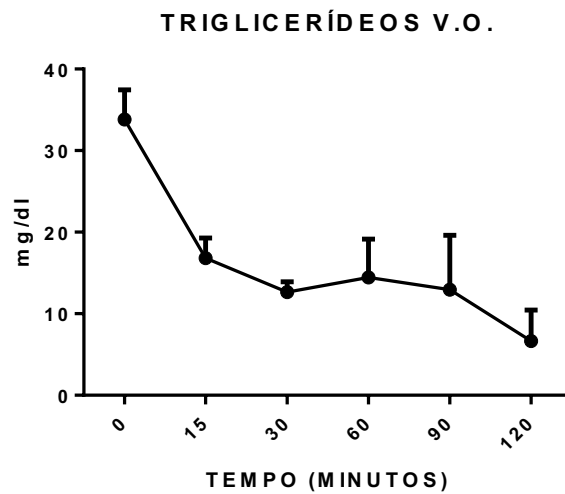


Figura 41 – Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 40. $p \leq 0,01$.

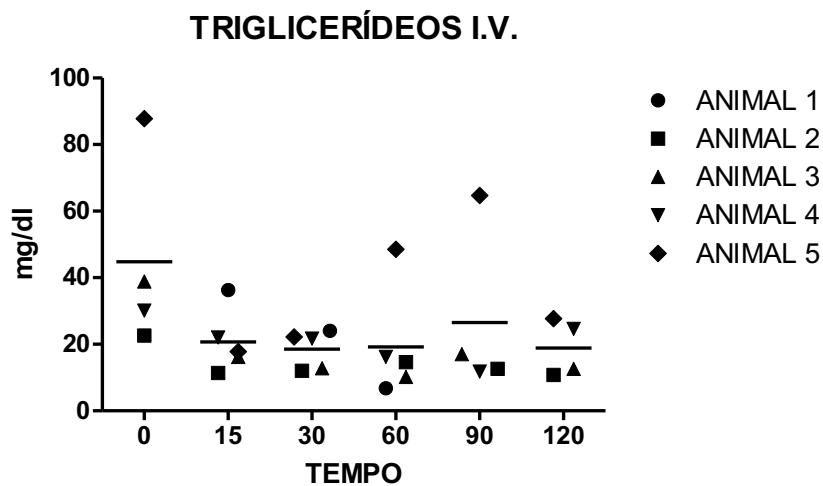


Figura 42 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado antes da administração do fármaco. As coletas foram realizadas 15 minutos após a administração do fármaco e a cada 30 minutos subsequente até 120 minutos. $p \leq 0.05$

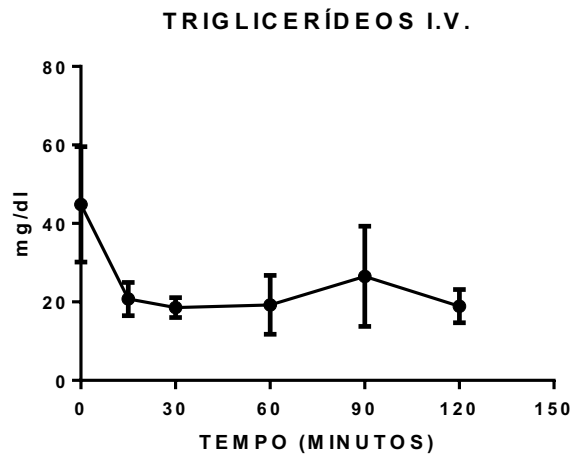


Figura 43 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 42. $p \leq 0,01$.

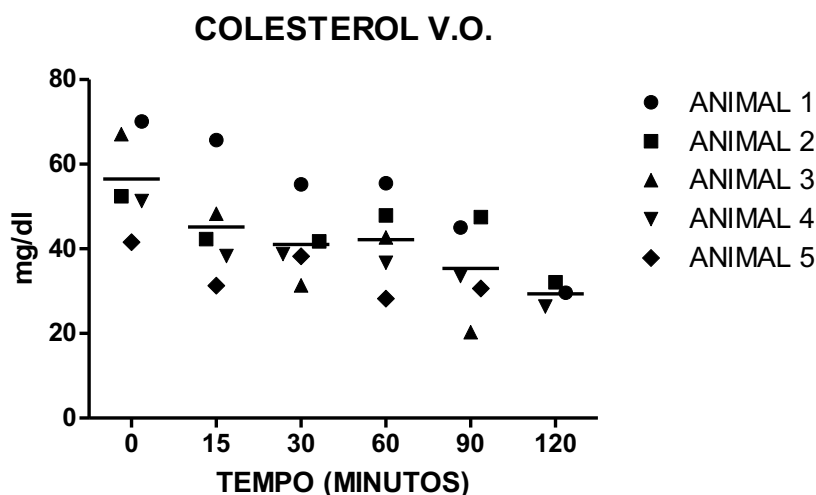


Figura 44 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco, pois os mesmos foram anestesiados após 15 minutos de ingestão oral do fármaco para realizar a canulação da artéria e da veia femurais. Dessa forma, t_{15} corresponde a 45 minutos após a administração, t_{30} a 60 minutos, t_{60} a 90 minutos, t_{90} a 120 minutos e t_{120} a 180 minutos após administração do fármaco. $P \leq 0.01$.

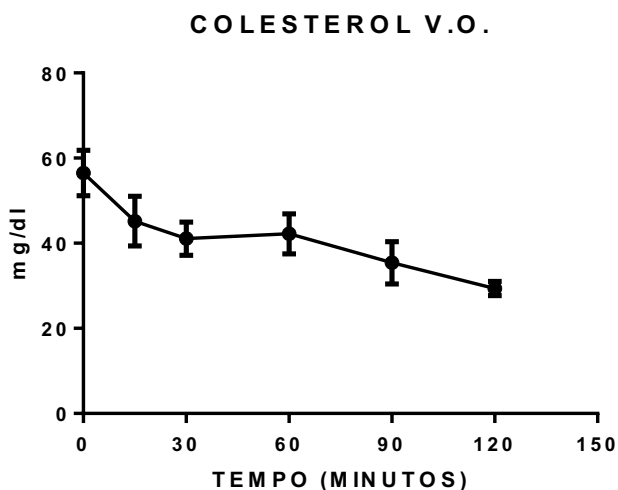


Figura 45 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 44. $P \leq 0,01$.

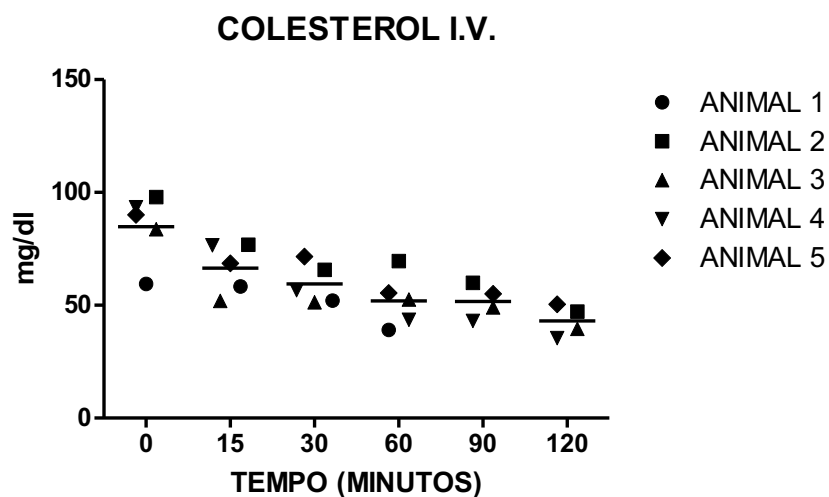


Figura 46 – A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado antes da administração do fármaco. As coletas foram realizadas 15 minutos após a administração do fármaco e a cada 30 minutos subsequente até 120 minutos. $P \leq 0.01$.

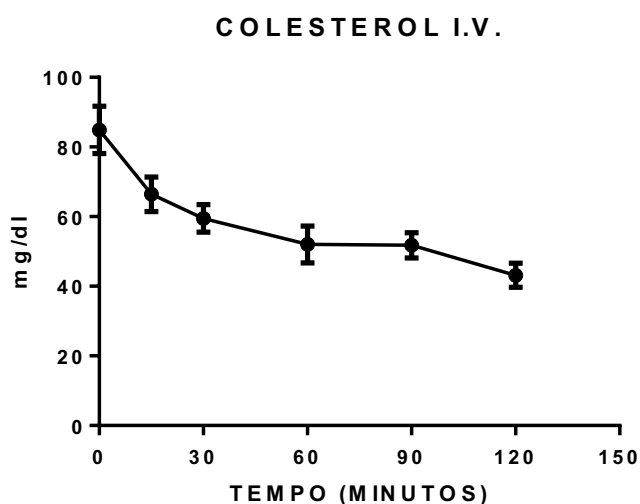


Figura 47 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 46. $p \leq 0,01$.

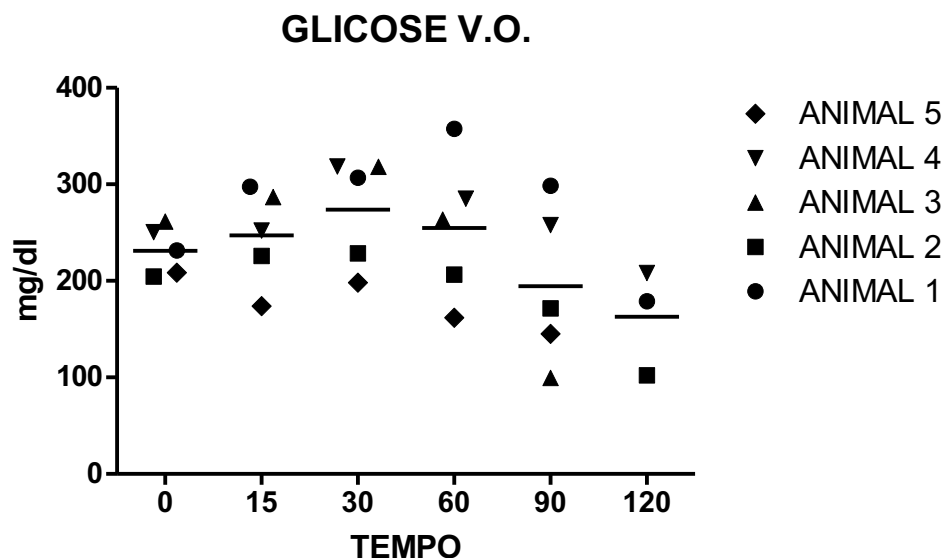


Figura 48 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto, corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco, pois os mesmos foram anestesiados após 15 minutos de ingestão oral do fármaco para realizar a canulação da artéria e da veia femurais. Dessa forma, t_{15} corresponde a 45 minutos após a administração, t_{30} a 60 minutos, t_{60} a 90 minutos, t_{90} a 120 minutos e t_{120} a 180 minutos após administração do fármaco. $p \leq 0.01$.

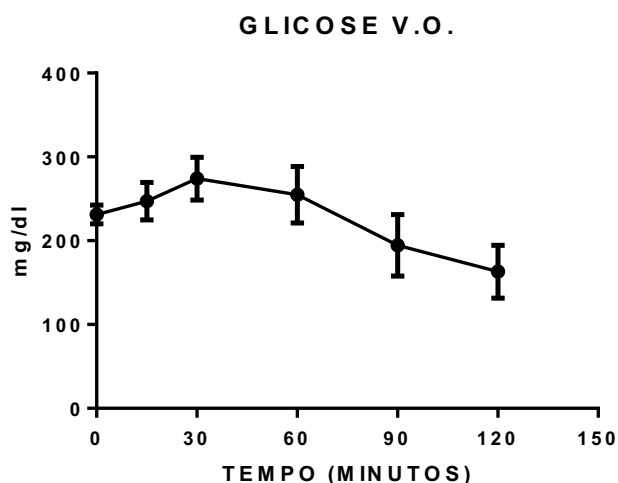


Figura 49 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 48. $p \leq 0,01$.

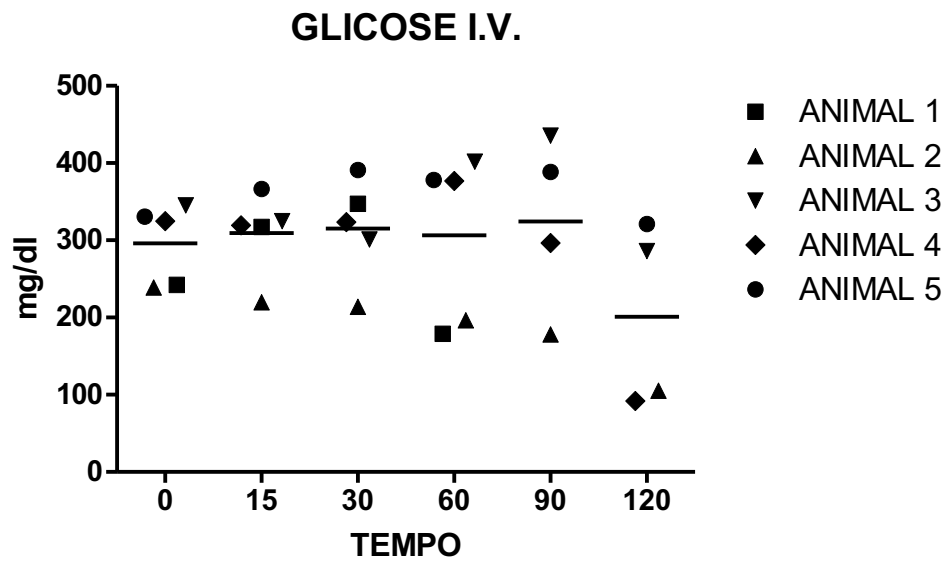


Figura 50 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado antes da administração do fármaco. As coletas foram realizadas 15 minutos após a administração do fármaco e a cada 30 minutos subsequente até 120 minutos. $p \leq 0.01$.

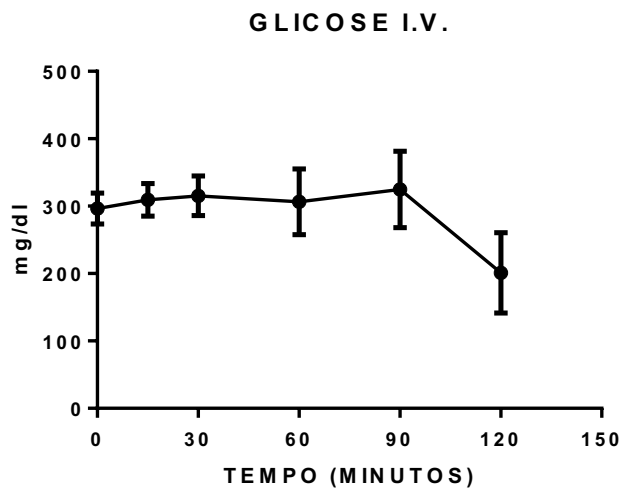


Figura 51 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 50. $p \leq 0,01$.

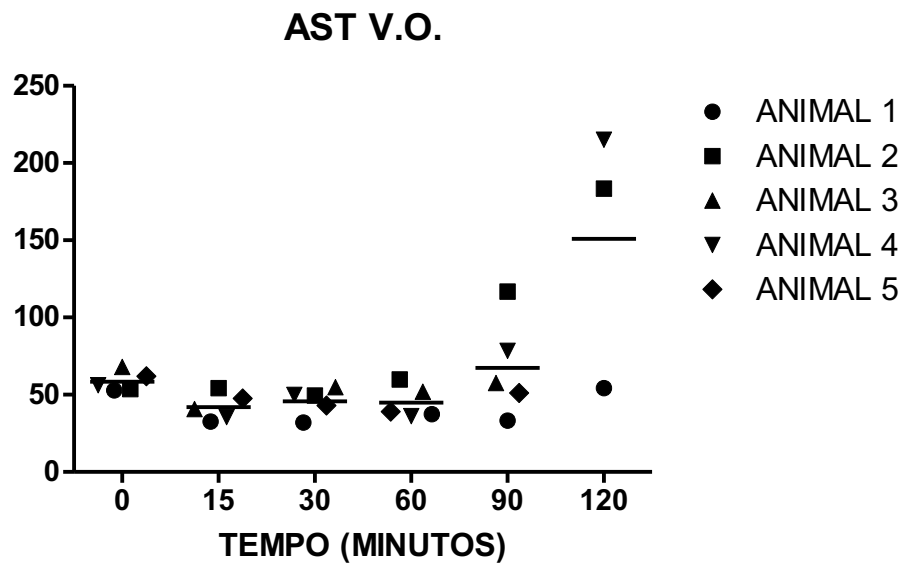


Figura 52 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto, corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco, pois os mesmos foram anestesiados após 15 minutos de ingestão oral do fármaco para realizar a canulação da artéria e da veia femurais. Dessa forma, t_{15} corresponde a 45 minutos após a administração, t_{30} a 60 minutos, t_{60} a 90 minutos, t_{90} a 120 minutos e t_{120} a 180 minutos após administração do fármaco. $p \leq 0.05$.

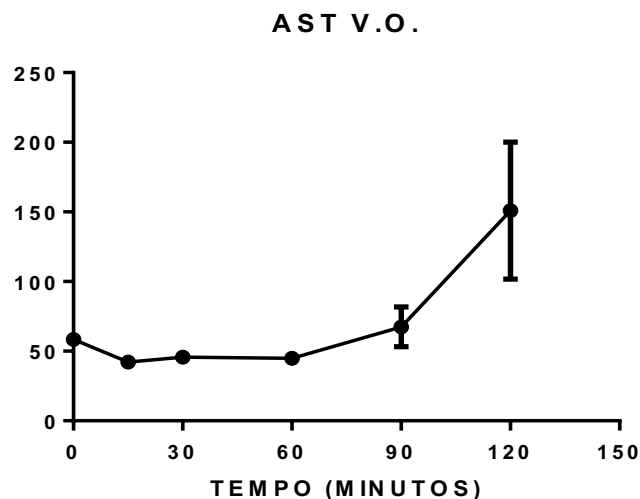


Figura 53 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 52. $p \leq 0,01$.

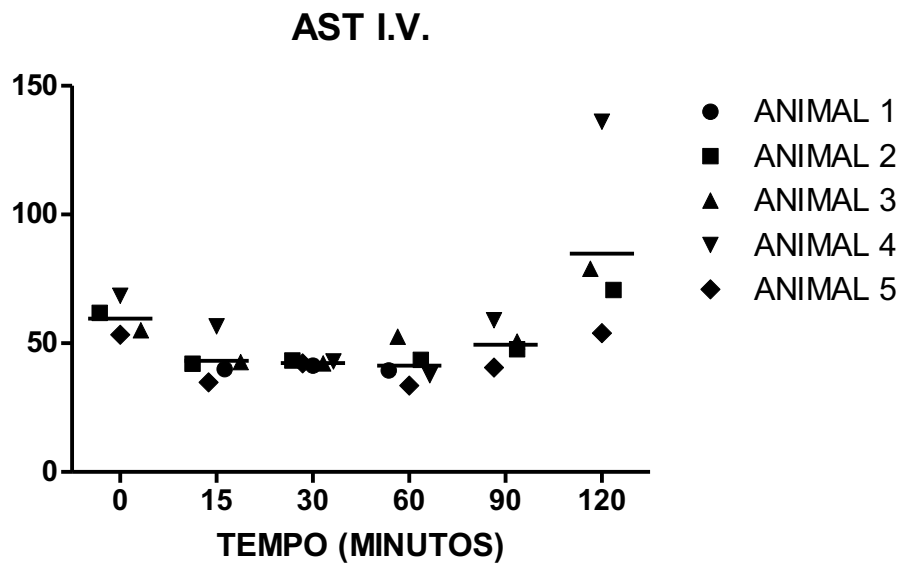


Figura 54 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado antes da administração do fármaco. As coletas foram realizadas 15 minutos após a administração do fármaco e a cada 30 minutos subsequente até 120 minutos. $p \leq 0.01$.

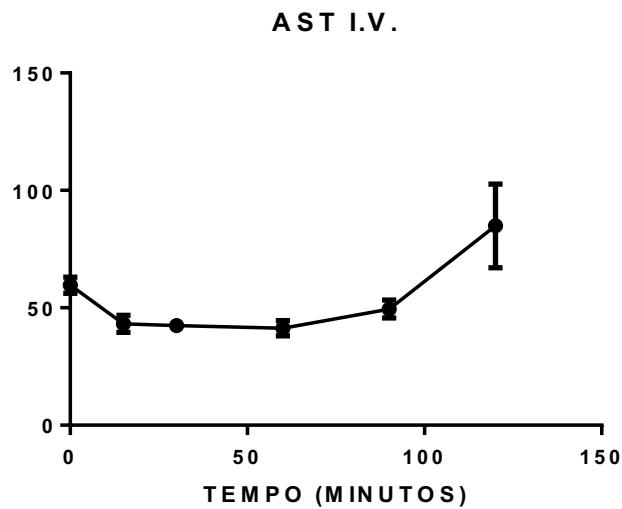


Figura 55 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 54. $p \leq 0,01$.

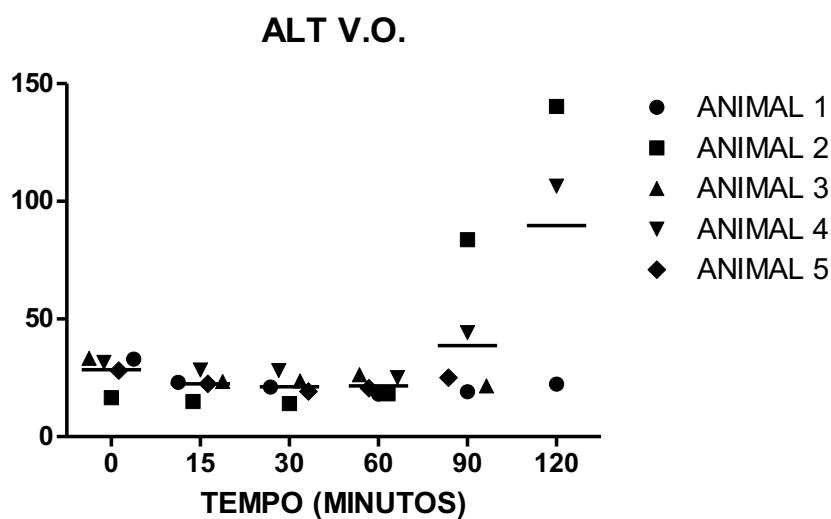


Figura 56 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via oral. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado 30 minutos após a administração oral do fármaco, pois os mesmos foram anestesiados após 15 minutos de ingestão oral do fármaco para realizar a canulação da artéria e da veia femurais. Dessa forma, t_{15} corresponde a 45 minutos após a administração, t_{30} a 60 minutos, t_{60} a 90 minutos, t_{90} a 120 minutos e t_{120} a 180 minutos após administração do fármaco. $p \leq 0.05$.

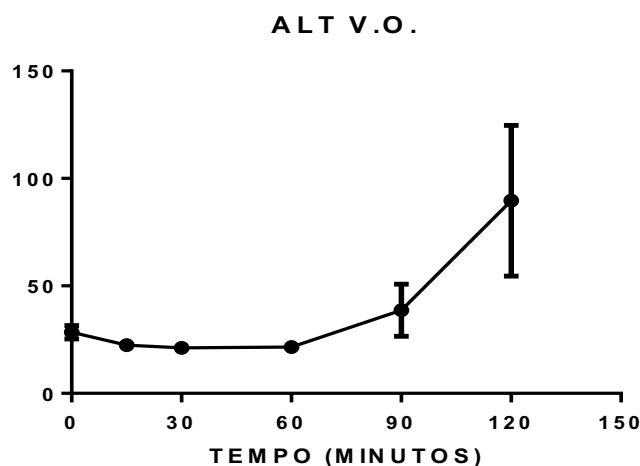


Figura 57 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 56. $p \leq 0,05$.

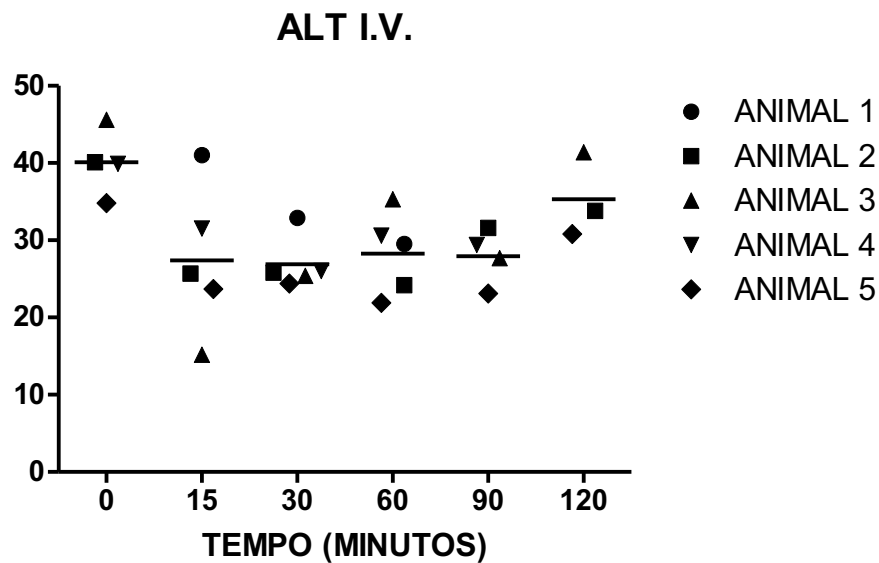


Figura 58 - A figura representa o tratamento de cinco Ratos Wistar com 10mg/kg de 18-MC por via intravenosa. Cada ponto corresponde a um animal tratado no tempo específico. O t_0 corresponde ao sangue coletado antes da administração do fármaco. As coletas foram realizadas 15 minutos após a administração do fármaco e a cada 30 minutos subsequente até 120 minutos. $p \leq 0.01$.

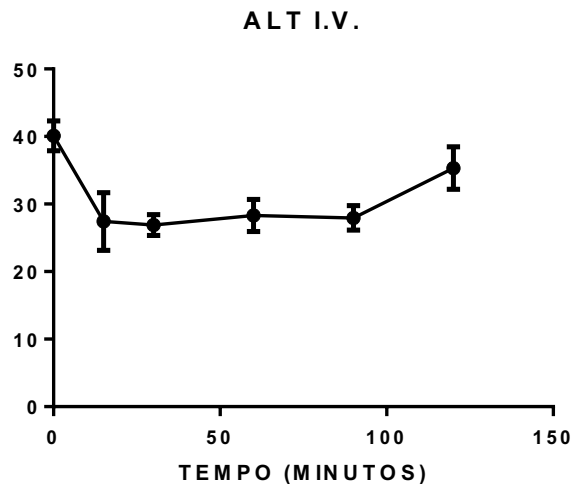


Figura 59 - Apresentação da Média \pm Erro Padrão dos dados mostrados na figura 58. $p \leq 0,01$.

A única alteração nos dados bioquímicos que teve maior relevância foi a elevação da concentração de glicose logo após o tratamento (Figuras 48, 49, 50 e 51). Essa elevação atingiu seu ponto máximo em 60 (IV) e 90 minutos (VO) do

tratamento com o fármaco, retornando aos níveis normais nos últimos tempos avaliados. Tal fato requer novos experimentos para confirmação, mas ainda tenha sido observada alguma alteração na concentração plasmática da glicose, o retorno para os níveis anteriores ao tratamento é indicativo de que o fármaco pode ser usado com segurança.

6 DISCUSSÃO

Alcaloides são moléculas fascinantes. Mesmo as mais simples apresentam particularidades químicas que garantem anos de estudos. Além disso, desde as primeiras descobertas, com Sertritner (NEUSS, 1970), novos alcaloides são sempre adicionados à lista de moléculas com alto potencial farmacológico. A pesquisa com tais compostos tem permitido o desenvolvimento de medicamentos com uma variedade de alvos terapêuticos, sendo utilizados para o tratamento de reações inflamatórias, câncer, infecções bacterianas, doenças cardíacas e vasculares, doenças neurológicas, bloqueio central da dor, anestesia, ansiedade, depressão, cefaleias e enxaquecas, dentre muitas outras ações (TAESOTIKUL, 1997; TAESOTIKUL *et al.*, 1998).

Infecções por protozoários causam doenças com elevada mortalidade e/ou morbidade em todo o mundo, especialmente em áreas tropicais. As Leishmanioses pertencem ao grupo de dezessete doenças definidas pela Organização Mundial de Saúde como Doenças Negligenciadas. Essas doenças são assim classificadas pois, embora atinjam mais de um bilhão de pessoas, normalmente são populações que vivem abaixo da linha da pobreza e, portanto, não despertam o interesse das grandes indústrias farmacêuticas transnacionais no sentido do desenvolvimento de fármacos inovadores para o tratamento dessas moléstias (SCHMIDT *et al.*, 2012).

O potencial dos alcaloides para o tratamento das leishmanioses foi investigado nos últimos anos por Mishra e colaboradores (2009). Esses autores compilaram diversos trabalhos publicados em que a atividade leishmanicida de alcaloides de origem natural foi investigada e revelaram que diferentes classes desses compostos possuem essa atividade: alcaloides indólicos, isoquinolínicos,

quinolínicos, benzoquinolizidínicos, e outros foram relacionados como ativos. Dentre os alcaloides relacionados, há destaque para a Coronaridina e pelo estudo realizado anteriormente por Delorenzi *et al* (2001).

Desta forma, a ampliação e o aprofundamento das avaliações de atividade leishmanicida e toxicológicas com os derivados do alcaloide Coronaridina torna-se muito interessante, devido a alta atividade, *in vitro*, revelada pelos compostos e sua baixa citotoxicidade (Figura 9 e Tabela 1 – publicado em DELORENZI *et al*, 2002). É importante destacar que já nos primeiros estudos a 18-MC mostrou-se mais ativa que a substância parental, a Coronaridina, sugerindo que, possivelmente, a introdução do grupamento $-OCH_3$ (Metoxila) no Carbono 18 (C-18) possa ser preponderante para o aumento da atividade contra o parasito e para a redução da citotoxicidade (GLICK *et al.*, 2000a; SZUMLISNKI *et al.*, 2000b; KUEHNE *et al.*, 2003a). Um outro aspecto importante é que ao comparar a toxicidade exibida pelo alcaloide Ibogaína (que deu origem à classificação do grupo como alcaloides indólicos Ibogaínicos), é possível relacionar que a existência do grupamento Carboximetil (CO_2CH_3) no Carbono 16 (C-16), que naturalmente ocorre em Coronaridina, seja fundamental para abolição dos efeitos extrapiramidais e lesões cerebelares observadas com o tratamento de ibogaína (GLICK *et al.*, 2000b; REZVANI *et al.*, 1997).

Além disso, o grupo liderado pelo Dr. Martin E. Kuehne sintetizou uma série de derivados de 18-MC, relacionando-os com a atividade anti-vício e com a reversão de comportamento compulsivo já amplamente demonstrada pelo grupo do Dr. Stanley D. Glick (1996b, 1998, 2000a, 2008, 2011; TARASCENKO *et al.*, 2010, 2011a, 2011b), baseando-se principalmente em estudos de ancoragem (*docking*) desses derivados ao receptor nicotínico $\alpha 3\beta 4$, cujo antagonismo é exercido por 18-

MC e implicado como possível alvo farmacológico dessa molécula (KUEHNE *et al.*, 2003a).

Os resultados promissores, especialmente com 18-MC nos estimularam a continuar as avaliações com esse fármaco em outras espécies de *Leishmania* e também realizar avaliações de eficácia e toxicidade *in vivo*. Também, avaliamos um dos derivados produzidos pelo grupo do Dr. Kuehne, a 18-Etoxicoronaridina (18-EC). Esta última molécula ainda não foi alvo de nenhuma avaliação biológica senão as apresentadas no presente trabalho, entretanto, sua síntese é descrita e protegida pela Patente U.S. 006211360 (GLICK & KUEHNE, 2001).

A Figura 11 (A e B) evidencia a atividade leishmanicida de 18-MC contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente, ao longo do tempo. É possível observar que, em ambos os casos, o fármaco inibiu o crescimento dos parasitos após 72 horas de sua adição às culturas, em todas as concentrações avaliadas, sendo que essa inibição foi mais significativa nas concentrações de 50 e 100 µg/mL ($p \leq 0,001$). Por outro lado, o novo fármaco avaliado, 18-EC, apresentou significativa redução do crescimento dos parasitos de ambas as espécies em 48 horas de cultivo em todas as concentrações adicionadas às culturas ($p \leq 0,001$), como pode ser observado na Figura 12 (A e B). Tais resultados indicam que a ação de 18-EC é mais rápida que 18-MC. Nossos resultados assemelham-se aos de Ferreira *et al.* (2011) em que promastigotas de *L. amazonensis* são inibidos após 48 horas de incubação de 50 µM de piperina e seus análogos, evidenciando apenas uma pequena inibição após 24 horas. Além disso, de todos os análogos avaliados, a piperina foi a que se mostrou mais ativa nesse sistema.

Após determinarmos o tempo necessário para que houvesse uma inibição maior que 50% do número de promastigotas, tanto de *L. amazonensis* quanto de *L.*

chagasi em cultura, avaliamos a atividade de ambos os fármacos em diferentes concentrações (Figura 13 A e B), incubando-as com os fármacos por 72 horas. A análise da curva de concentração possibilitou o cálculo de IC₅₀ das moléculas. O IC₅₀ de 18-EC contra *L. amazonensis* (17,07µg/mL – 40,67µM) foi 1,4 vezes menor que o de 18-MC (24,08 µg/mL – 59,40µM), a mesma diferença observada contra *L. chagasi*: 18-EC (17,09µg/mL – 40,67µM) e 18-MC (24,03 µg/mL – 59,40µM). Esses resultados sugerem que 18-EC apresenta uma atividade maior que 18-MC em promastigotas de ambas as espécies avaliadas. Nossos resultados mostraram uma atividade leishmanicida muito semelhante ao da Quercetina, cujo IC₅₀ foi de 31,4 µM (FONSECA-SILVA *et al.*, 2011).

Ao avaliarmos a atividade leishmanicida dos fármacos contra as formas amastigotas de *L. chagasi*, observamos que esta foi consideravelmente maior (Figura14). O IC₅₀ calculado nesse caso foi de 12,75µg/mL (28,71µM) para 18-EC e 16,23µg/mL (39,60µM) para 18-MC. A análise dos IC₅₀ sugere que 18-EC é 1,3 vezes mais potente que 18-MC, entretanto, ao analisarmos todas as concentrações avaliadas, especialmente 40µg/mL, observamos que a inibição imposta por 18-MC aos parasitos é percentualmente maior (~70% em 18-MC X ~ 62% em 18-EC). O IC₅₀ de ambos os fármacos é semelhante ao observado por Soares e colaboradores (2010) ao tratar amastigotas de *L. amazonensis* com o látex de *Himatanthus siccuba* (IC₅₀= 15,7µg/mL). Em contrapartida, Delorenzi *et al* (2002) avaliando a atividade leishmanicida de 18-MC contra formas amastigotas de *L. amazonensis* observou um IC₉₀ de 16µg/mL, sugerindo uma atividade muito mais intensa desse fármaco contra essa forma da referida espécie. Em nosso sistema atual, por problemas técnicos, não foi possível avaliar a ação de 18-EC e 18-MC contra amastigotas de *L. amazonensis*, entretanto, nossos resultados atuais, em conjunto

com os previamente publicados, sugerem que *L. chagasi* é mais resistente à ação de 18-MC que *L. amazonensis*. Também é possível inferir que o aumento da cadeia em C-18 potencializou o efeito leishmanicida já observado com 18-MC.

Tanto 18-MC quanto 18-EC apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C. Para avaliação de citotoxicidade utilizamos o método proposto por Scudiero *et al.* (1988), utilizando o reagente XTT. Em células viáveis esse composto é quebrado em um formazan solúvel, apresentando uma coloração alaranjada no final da reação. A quebra da molécula é realizada por desidrogenases mitocondriais, cujo funcionamento é vital para a sobrevivência das células. Dessa forma observamos uma etapa anterior ao processo de morte celular definitiva, etapa essa, que inviabiliza a sobrevivência da célula caso tais enzimas estejam inibidas. A metodologia do XTT é bastante relevante, pois observa lesões e comprometimento da viabilidade celular, mesmo que as membranas plasmáticas ainda estejam íntegras e, no caso dos macrófagos, estejam aderidos à superfície da placa de cultura. Dessa forma, ao utilizarmos tal método é possível afirmar com mais precisão se um dado fármaco é realmente citotóxico ou não, sendo esse modelo experimental mais eficiente que os modelos de coloração e contagem de células, como o método de fixação/coloração com Giemsa e Azul de Trypan (PINHEIRO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2010).

A variação da atividade observada não foi estatisticamente significativa entre os fármacos e na concentração mais elevada avaliada, 100 μ g/mL, não ultrapassou 30% de inibição da sobrevivência das células. Dessa forma, não foi possível determinar o CC₅₀ dos fármacos, sendo determinado o CC₂₀: 18-EC – 45,70 μ g/mL (107,65 μ M) e 18-MC – 30,22 μ g/mL (74,26 μ M). Como dissemos anteriormente, embora tenha sido observado uma diferença numérica no CC₂₀ dos fármacos, essa

diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 15). Sendo assim, é possível afirmar que ambos os fármacos apresentam baixa toxicidade em nosso sistema experimental. Ao avaliar a citotoxicidade de Piperina e derivados no mesmo sistema que utilizamos, Ferreira e colaboradores (2011) observaram uma inibição de apenas 20% na sobrevivência das células quando tratadas com 50 μ M de Piperina.

Os resultados relevantes e promissores nas avaliações *in vitro* com os dois alcaloides indólicos estudados, 18-MC e 18-EC, estimularam-nos no aprofundamento dos estudos passando para as avaliações de eficácia e toxicidade *in vivo*. Antes, porém, procedemos à avaliações *in silico* na tentativa de determinar as contribuições positivas e negativas que as modificações em C-18 poderiam trazer em cada um dos fármacos. Todas as análises foram comparadas com o fármaco parental, a Coronaridina (COR), também na forma de Cloridrato como nas moléculas anteriores.

As avaliações *in silico* são ferramentas computacionais que utilizam diferentes tipos de *softwares*, que permitiram avanços na previsão de desempenho *in vivo* de medicamentos, mudando a forma como os medicamentos são desenvolvidos e revisados. Os métodos de modelagem e simulação são agora largamente utilizados no estudo de produtos e revisão regulatória de medicamentos (JIANG *et al.*, 2011). Essas aplicações incluem: o desenvolvimento de especificações biorelevantes, a determinação de métricas de bioequivalência de produtos de liberação modificada com início terapêutico rápido, o desenho de ensaios *in vitro-in vivo* evidenciando parâmetros previamente analisados via ferramenta computacional, identificação e otimização de moléculas com regiões com potencial tóxico, avaliação de biodisponibilidade, modificações incrementais do potencial farmacológico em moléculas já utilizadas na clínica e outras aplicações relevantes (VALÉRIO, 2011).

Um dos *softwares* mais utilizados nesse tipo de avaliação é o OSIRES (www.organic-chemistry.org/prog/peo/). Utilizando-o é possível fazer previsão se uma molécula tem o potencial para atuar como fármaco (*Drug-Likeness*) baseado em descritores topológicos, marcadores estruturais-chave e/ou outras propriedades como o cLog P (Coeficiente de Partição Octanol/Água) e pesos moleculares (DIAS *et al.*, 2007). Nesse programa a ocorrência de cada fragmento é determinada dentre uma coleção comercial de fármacos e em uma coleção de supostos “não-fármaco” de compostos Fluka. Nesse caso, valores positivos (0.1 – 10 pontos) indicam que a molécula contém os melhores fragmentos já encontrados em fármacos comerciais (DEVEREUX & POPELIER, 2010).

Em nosso estudo, como mostrado na Figura 16A, os fármacos comerciais utilizados para o tratamento das Leishmaniose, Miltefosina apresentou resultado fortemente negativo (~ -30 pontos) em *Drug-Likeness*; Anfotericina B apresentou valor negativo próximo a zero (-0,14), assim como 18-EC (-0,25). Por outro lado, 18-MC (1,13) e COR apresentaram valores positivos, sendo que COR apresentou a melhor pontuação (4,14).

Outro parâmetro importante para avaliações *in silico* de fármacos é o *Drug-Score*. Esse parâmetro é resultante da combinação dos valores de *Drug-Likeness*, cLog P, Log S, peso molecular e riscos toxicológicos. Esse valor é muito usado para o julgamento e determinação das melhores moléculas em uma série de compostos, servindo para decisão da continuação de avaliações *in vitro* e *in vivo* com as moléculas com o melhor *Drug-Score* (DIAS *et al.*, 2007). A Figura 16B revela o *Drug-Score* de COR, 18-MC e 18-EC e compara com os valores obtidos para Anfotericina B e Miltefosina, no mesmo sistema computacional. 18-MC e COR apresentaram os melhores *Drug-Score* (0,7), enquanto que os fármacos já utilizados clinicamente

apresentaram os valores mais baixos (abaixo de 0,4) e 18-EC apresentou um *Drug-Score* de 0,4. Isso sugere que 18-MC e COR possuiriam as melhores condições de se comportarem como fármacos. Ao avaliarmos a atividade leishmanicida da série de alcaloides verificamos que 18-EC apresentou a melhor atividade *in vitro*, tanto contra promastigotas quanto amastigotas de *L. chagasi* (Figuras 13 e 14). Esse resultado contraditório sugere que, os estudos teóricos devem sempre ser acompanhados dos estudos experimentais *in vitro*, para corroborar ou contradizer os achados teóricos.

Os riscos toxicológicos mencionado no parágrafo anterior também são determinados com a utilização do *software* OSIRES. Os riscos teóricos sugeridos são: Tumorigênico, Irritativo, Mutagênico e Efeitos Reprodutivos. Ao submetermos nossos fármacos a esse tipo de análise e comparar os resultados com os achados para Miltefosina e Anfotericina B, observamos que todos os fármacos avaliados apresentaram um baixo potencial tóxico teoricamente calculado (Figura 17). Apenas 18-EC apresentou risco moderado de ser um fármaco irritante. É interessante que a introdução de apenas um grupamento $-CH_2$ tenha sido suficiente para alterar o risco toxicológico de um fármaco (SANDER *et al.*, 2009).

Miltefosina e Anfotericina B foram selecionadas como fármacos a serem comparados com as nossas moléculas em estudo pelo fato de serem disponíveis comercialmente; por uma delas, a Miltefosina, ser administrada por via oral, assim como nossos fármacos poderão sê-lo e por Anfotericina B ser utilizada em casos refratários da leishmaniose. É interessante destacar que Miltefosina é um fármaco capaz de induzir alguma toxicidade do tipo irritativa em pacientes durante os estudos clínicos (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; SOTO *et al.*, 2008). Da mesma maneira, a Anfotericina B é um medicamento de uso restrito aos casos refratários da doença

por apresentar efeitos tóxicos graves como falência renal (SINGODIA *et al.*, 2010). Esses resultados clinicamente observados contradiz aos achados teóricos (PINHEIRO *et al.*, 2012).

Submetemos nossos alcaloides a ferramentas de modelagem molecular na tentativa de compreender a contribuição que as alterações em C-18 poderiam trazer para a molécula, calculando algumas propriedades eletrônicas moleculares como pKa, PI e momento dipolar. Os resultados são apresentados na Tabela III e revelam que não houve nenhuma alteração nas propriedades eletrônicas com a adição de um grupamento -OCH₃ (18-MC) ou -OCH₂CH₃ (18-EC) quando comparados com a COR. É importante destacar que o pKa das três moléculas é de 8,39 tanto para 18-MC quanto para 18-EC e de 8,56 para COR. Os dados apresentados na Tabela III foram determinados utilizando as ferramentas computacionais Marvin (ChemAxon), MedChem Designer (Simulations Plus, InC) e Millsian (Millsian InC).

A análise do padrão de hidrofobicidade relacionado à biodisponibilidade oral também foi calculado, segundo a proposta da “Regra dos 5”, proposta por Lipinski *et al.*, (2001). Essa regra enumera requisitos para que uma molécula possa ser hidrofóbica o suficiente para ser bem absorvida por via oral e é baseada na distribuição das propriedades calculadas entre alguns milhares de fármacos disponíveis em diferentes bibliotecas. De acordo com a proposta dos autores, uma molécula com grande potencial para ser bem absorvida por via oral necessita:

1. Ter peso molecular menor que 500Da
2. Ter o Log P abaixo de 5
3. Ter menos que 5 ligações doadoras de H⁺
4. Ter menos que 10 ligações aceptoras de H⁺

A Tabela III aponta que os três alcaloides que avaliamos *in silico* atende a todos os parâmetros da “Regra dos 5” e também é possível observar que não há correlação direta entre os parâmetros dessa regra com a atividade leishmanicida exercida por 18-MC e 18-EC *in vitro*. Nosso sistema experimental sugere que 18-EC é mais ativa que 18-MC, entretanto, não está claro como a introdução do CH₂ modificou a distribuição eletrônica e a hidrofobicidade do fármaco de forma a aumentar seu efeito leishmanicida. Da Silva *et al.* (2007) e Pinheiro *et al.* (2012) também observaram não ser possível correlacionar as diferenças sutis da Regra dos 5 com a atividade leishmanicida avaliada em seus sistemas *in vitro*.

Na sequência das análises *in silico*, utilizamos o *software* admetSAR (www.admetexp.org) e avaliamos o potencial de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de COR, 18-MC e 18-EC. Como tais avaliações são realizadas confrontando um banco de dados, nem todos os parâmetros puderam ser determinados, face a escassez de informações liberadas relacionadas ao grupo de alcaloides indólicos Ibogaínicos (www.savanthwp.com). Entretanto, todas as três moléculas avaliadas apresentam potencial de serem bem absorvidas por via intestinal e, possivelmente, são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, o que corrobora o seu potencial em modular a resposta dopaminérgica no sistema diencefálico dorsal do Sistema Nervoso Central (GLICK *et al.*, 2008; TARASCENKO *et al.*, 2011a). Do ponto de vista de metabolismo, 18-MC e 18-EC guardam maiores similaridades entre si do que com a COR, como é possível observar na Tabela IV. Outro aspecto importante é o potencial tóxico dos fármacos, não apresentando potencial carcinogênico ou mutagênico (AMES), mas sendo potencialmente muito tóxicos para o ambiente aquático, como sugere a toxicidade a peixes e a *Tetrahymena pyriformis*.

Após as avaliações *in silico* e tendo obtido resultados promissores *in vitro*, passamos aos estudos *in vivo* para a confirmação da atividade leishmanicida e verificação de toxicidade. O alcaloide 18-MC foi o escolhido para os estudos *in vivo*, por três motivos principais: ser a molécula mais amplamente conhecida da série sendo estudada em modelo de leishmaniose desde 2000; ter maior disponibilidade de amostras para a realização dos estudos e o interesse da Indústria Farmacêutica tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos pelo aprofundamento dos estudos.

Previamente já havíamos observado que 18-MC apresentava relevante efeito leishmanicida em um modelo de infecção recente contra *L. amazonensis*, como proposto por Le Fichoux *et al.* (1998) e a estimativa da quantidade de parasitos no sítio de infecção e no linfonodo drenante foi realizada segundo o método proposto por Lima *et al.* (1997), conhecido como estimativa de carga parasitária. Nesse caso, camundongos BALB/C foram infectados no coxim plantar com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento. Após sete dias da inoculação dos parasitos, iniciamos o tratamento com 40mg/Kg/dia de 18-MC utilizando três vias de administração, a oral (VO), intraperitoneal (IP) e intralesional (IL), por 5 dias, como observado na Tabela II (DELORENZI, 2002). Os resultados obtidos foram bastante significativos na redução da infecção recente, levando a uma redução da carga parasitária acima de 93%, atingindo até 99% de redução da carga parasitária em pata e linfonodo regional dos animais infectados. Ao compararmos com Glucantime, observamos que o medicamento de referência reduziu a carga parasitária em 87%.

Para melhor entendermos a dinâmica da inibição da infecção por *L. amazonensis*, investigamos a atividade de 18-MC em modelo de infecção estabelecida (crônica), segundo mais uma vez a metodologia proposta por Le

Fichoux *et al.* (1998). Por se tratar de um novo lote e devido a disponibilidade do material reduzimos a concentração do fármaco para 20mg/Kg/dia, sendo que os animais infectados foram tratados por 5 dias apenas VO. A Tabela III evidencia a elevada atividade de 18-MC nesse modelo de infecção, sendo capaz de reduzir em mais de 99% a carga parasitária nos animais infectados. Ao utilizar um modelo de infecção estabelecida semelhante ao nosso, Miguel e colaboradores (2008) observaram que o tratamento dos animais infectados com 20mg/Kg/dia por 15 dias de Tamoxifeno (IP) provocava uma redução de 99,8% na carga parasitária. Esse percentual é muito próximo ao que observamos, entretanto, nosso tratamento foi realizado por apenas 5 dias e por via oral.

Na tentativa de observar cura estéril dos animais infectados e tratados com 18-MC, ampliamos o tempo de tratamento para 10 dias, sempre por via oral. Além disso, nesse caso, comparamos doses diferentes, 10 e 20mg/Kg/dia para verificar se com o aumento do tempo de tratamento a dose diária poderia ser reduzida. Essa medida é útil tanto do ponto de vista toxicológico quanto do ponto de vista econômico. Os resultados são mostrados na Tabela IV e revelaram que o aumento do tempo de tratamento não levou à cura estéril, mantendo-se o percentual de redução da carga parasitária acima de 99%. Um aspecto relevante é que o tratamento com 10mg/Kg/dia obteve resultados estatisticamente semelhantes ao de 20mg/Kg/dia, passando a ser a dose de 10mg/Kg/dia a de escolha para os experimentos subsequentes. Ao compararmos nossos resultados com os de Miguel *et al.* (2008) observamos que também não foi observada cura estéril no tratamento com Tamoxifeno. Em estudos com um derivado de Pterocarpanquinona, LQB-118, Da Cunha-Junior e colaboradores (2011) demonstraram a eficiência desse fármaco ao tratar camundongos BALB/C infectados com *L. amazonensis* (4,5mg/Kg/dia, IP

ou VO) por 85 dias não consecutivos, (5 dias por semana, totalizando aproximadamente 60 dias de tratamento consecutivo). Nesse caso também não foi observada cura estéril, embora a carga parasitária tenha sido reduzida em mais de 90%.

Os resultados do tratamento *in vivo* com 18-MC são bastante promissores e relevantes, uma vez que mostrou-se extremamente eficiente ao usarmos uma concentração baixa (10mg/Kg/dia) e um tempo de tratamento curto (5 ou 10 dias). Contudo, conquanto o fármaco seja muitíssimo ativo no modelo de infecção analisado, é importante que o mesmo não cause qualquer toxicidade para o animal em dose terapêutica. Dessa forma, seguindo o Guia para Ensaios não-clínicos (ANVISA, 2010) procedemos a análise de possíveis alterações histopatológicas induzidas por 18-MC nos animais infectados e tratados. As Figuras 19 a 22 mostram as histografias de baço, fígado, rim e coração dos animais infectados tratados ou não com 20mg/Kg/dia de 18-MC. Ao compararmos os órgãos dos animais infectados não tratados com os que receberam o fármaco, observamos que todos guardam a mesma arquitetura tecidual, tendo suas características morfológicas preservadas. Nesse sentido, é importante dizer que mesmo a infecção não causou alteração na morfologia dos tecidos analisados. Dessa forma, em dose terapêutica, 18-MC não provocou nenhuma toxicidade observável do ponto de vista histopatológico.

Entretanto, para que uma molécula ultrapasse a barreira do estudo acadêmico e possa, de fato, entrar na bateria de testes que atendam o interesse da indústria é necessário que, dentre outras avaliações, a mesma seja submetida a rigorosos testes de toxicidade agudo e de doses repetidas.

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que

avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE *et al.*, 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO *et al.*, 2006; COECKE *et al.*, 2006). Nosso protocolo seguiu, primariamente, o Método Clássico de Toxicidade Aguda (OECD, 2001)

A toxicidade aguda é avaliada através da administração de uma única dose do fármaco/medicamento ou de doses fracionadas ao animal, em um período não superior a 24 horas. A toxicidade de doses repetidas é medida em estudos com período mínimo de 14 dias, quando o fármaco é administrado em intervalos regulares (GOLDIM, 2007). A avaliação da toxicidade aguda de 18-MC foi realizada usando doses do fármaco cinco, dez, vinte e trinta vezes maior que a dose eficaz de 10mg/Kg/dia. Ou seja, foi avaliada nas doses de 50, 100, 200 e 300mg/Kg de 18-MC, em camundongos BALB/C machos e fêmeas. Após a administração do fármaco, os animais foram acompanhados exaustivamente durante as primeiras 3 horas após o tratamento, e a cada 12 horas nos 5 dias subsequentes. Após esse tempo, os

animais foram avaliados uma vez por dia até completarem 14 dias após o tratamento, quando foram submetidos à eutanásia por sobrecarga anestésica. Além da letalidade, sinais clínicos como convulsões, tremores, sonolência, alterações motoras e respiratórias foram avaliadas e anotadas em planilhas semelhantes às apresentadas na Figura 8 (Materiais e Métodos).

O Quadro 1 traz um grande resumo dos resultados anotados nas já referidas planilhas, tanto para machos quanto para fêmeas. O primeiro fato importante observado nos testes de toxicidade aguda é que os camundongos machos são muito mais susceptíveis do que as fêmeas a 18-MC. As primeiras alterações nas fêmeas apareceram apenas quando foram tratadas com 100mg/Kg do fármaco. Com machos, o tratamento com 50mg/Kg de 18-MC induziu sonolência e prostração. Com 100mg/Kg já foi observado óbito entre os machos, além de convulsões, tremores e dificuldades respiratórias.

Nas doses de 200 e 300mg/Kg de 18-MC observamos óbito em 100% dos camundongos machos em 43% das fêmeas. Interessante destacar que todos os machos foram a óbito nas primeiras 3 horas após o tratamento, enquanto que as fêmeas evoluíram para o óbito após as primeiras 24 horas (apenas uma na dose de 200mg/Kg e duas na de 300mg/Kg foram a óbito nas primeiras 3 horas), revelando uma maior resistência das fêmeas ao tratamento com 18-MC. Nossas observações se contrapõem as diretrizes emanadas nos *Guidelines* da OECD (2001), que sugerem a utilização de fêmeas, uma vez que, embora habitualmente haja pequena ou nenhuma diferença de sensibilidade entre os sexos, quando essas diferenças são observadas, as fêmeas são geralmente um pouco mais sensíveis (OECD 2008; LIPNICK *et al.*, 1995). Nossos estudos de toxicidade aguda apontaram que a DL_{50}

para machos tratados com 18-MC é de 130mg/Kg e para fêmeas é maior que 300mg/Kg, não sendo possível precisar o valor pois é superior a maior dose testada.

A maior letalidade exercida por 18-MC em machos de camundongos é compartilhada com uma maior susceptibilidade de Ratos Sprague-Dawley machos e obesos ao tratamento com 18-MC na tentativa de redução da deposição de gordura epididimal (TARASCHENKO *et al.*, 2011a). Essa maior susceptibilidade parece estar relacionada com o fato de 18-MC possuir afinidade com os três receptores opióides, e o receptor k-opióide ser implicado na supressão da ingestão de alimentos mais notadamente em machos do que em fêmeas (RASAKHAM & LIU-CHEN, 2011).

Na tentativa de compreender quais seriam as possíveis lesões induzidas por 18-MC nos animais tratados com doses elevadas e também em atenção ao solicitado no Guia de Ensaios Não-Clínicos da ANVISA (2010), procedemos a análise histopatológica de alguns órgãos-chave do organismo, como o baço, fígado, cérebro, coração e rim. A Figura 23 apresenta cortes histológicos de cérebro (A) e baço (B) de animais tratados com 200mg/Kg de 18-MC e é possível observar que não há qualquer alteração morfológica significativa nesses tecidos, sendo que o parênquima tecidual é comparável aos controles não tratados. Por outro lado, as Figuras 24 e 25 apresentam cortes de Rim e Fígado de animais tratados com 200 e 300mg/Kg. Na Figura 24 (B e C), os tecidos os cortes de rim sugerem alterações patológicas como o colapso da cápsula de Bowman, não observável nos cortes dos animais controle (Figura 24A). Essa alteração poderia ser implicada como adjuvante da letalidade do fármaco nessas concentrações. Da mesma forma, a Figura 25 aponta lesões sugestivas de condensação de cromatina do hepatócito e formação de trabéculas no parênquima hepático quando os animais foram tratados com 200mg/Kg de 18-MC. Também essas alterações poderiam ser implicadas como

adjuvantes da letalidade do fármaco. É importante ressaltar que com 50 ou 100mg/Kg nenhuma alteração tecidual foi observada (dados não mostrados).

Os estudos de avaliação de toxicidade aguda com alcaloides indólicos são escassos e, normalmente, restritos a avaliações de toxicidade de extratos de plantas. Os resultados mostram DL₅₀ dos extratos acima dos que foram observados com 18-MC (PEREZ *et al.*, 2012; YI *et al.*, 2013).

Enquanto os ensaios de toxicidade aguda tratam dos efeitos adversos da administração de doses únicas, uma forma mais comum de exposição humana a muitas substâncias químicas é sob a forma de doses repetidas que não produzam efeitos tóxicos imediatos. Efeitos retardados podem ocorrer devido à acumulação da substância química em tecidos ou outros mecanismos, e é importante identificar qualquer toxicidade potencial através de avaliações de toxicidade subaguda e/ou subcrônica. Estes estudos são importantes porque eles irão fornecer informações detalhadas sobre os efeitos tóxicos, órgãos-alvo e de reversibilidade dos efeitos indesejáveis resultante do tratamento com o fármaco (OECD, 2008).

Em nossos ensaios de doses repetidas, camundongos BALB/C machos foram tratados com 20, 50 e 100mg/Kg de 18-MC administrado em uma única dose diária, por cinco dias, caracterizando um teste de toxicidade subaguda. Os animais foram acompanhados posteriormente por 25 dias.

É digno de destaque que, nesses ensaios, não observamos nenhum óbito, mesmo na dose mais alta avaliada (100mg/Kg). Entretanto, na referida dose, os animais ficaram levemente sonolentos, calmos, mas não letárgicos, após as primeiras horas da administração da primeira dose do fármaco. Nas administrações subsequentes não foi observado nenhuma alteração. Esse fato pode estar relacionado com uma possível atenuação central dos efeitos do fármaco, como

observado anteriormente por Glick *et al.* (2000b) em seu modelo de reversão de vício à múltiplas drogas, quando os animais foram tratados com ibogaína e 18-MC. Nas outras doses avaliadas não foram observados quaisquer sinais que indicassem alguma toxicidade. Também não foi observada redução na ingesta de água e de alimentos nos grupos tratados e não houve alteração de peso corporal.

As análises histopatológicas cujos achados não revelaram quaisquer alterações nos órgãos analisados são mostradas nas Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35 e 36. Quando 18-MC foi administrado na dose de 20mg/Kg não foi observada nenhuma lesão tecidual dos órgãos analisados, a saber, cérebro, coração, fígado e rim (Figuras 26 – 29). Já na dose de 50mg/Kg houve aparecimento de alterações histopatológicas no rim, com colabamento de glomérulos e retração do Espaço de Bowman (Figura 33). As mesmas alterações foram observadas na dose de 100mg/Kg (Figura 38). Além disso, nessa última concentração observamos alterações no parênquima hepático com o aparecimento de trabéculas e também condensação de cromatina do hepatócito (Figura 37).

Esses achados sugerem que o rim pode ser um órgão mais susceptível à toxicidade provocada por 18-MC. As alterações observadas, como o colabamento dos glomérulos, podem comprometer o processo de filtração glomerular e a detoxicação/excreção do fármaco e seus metabólitos. Em 1976, Munson *et al.*, já apontava os glomérulos renais como possível alvo de toxicidade da combinação Vincristina + LPS (lipopolissacarídeo de bactérias), cujas lesões levariam ao óbito dos animais tratados em poucos dias. Da mesma forma, as possíveis lesões hepáticas na maior dose administradas podem estar relacionada ao aparecimento de metabólitos mais tóxicos, uma vez que o metabolismo do fármaco é mediado pelo sistema Citocromo P450 (ZHANG *et al.*, 2002).

Mesmo sendo encontradas alterações histopatológicas que sugerem alguma toxicidade do fármaco estudado, tais alterações carecem de melhor avaliação, com cortes histológicos seriados, aumento da amostra de animais avaliados, testes em camundongos fêmeas, além disso, essa possível toxicidade só é observável em doses, pelo menos, 5 vezes maior que a utilizada para o efeito farmacológico estudado.

Por fim, na tentativa de começar a delinear as possíveis alterações bioquímicas induzidas pelo tratamento com 18-MC em dose terapêutica, submetemos Ratos Wistar ao tratamento agudo com 10mg/Kg de 18-Mc pelas vias endovenosa e oral e coletamos amostra de sangue a cada trinta minutos para acompanhamento das possíveis alterações no perfil bioquímico dos animais tratados. Para tal avaliação os animais foram submetidos a uma cirurgia para colocação de cateter na veia e artéria femurais, de forma a possibilitar a administração do fármaco (venoso) e a coleta de sangue (arterial), que foi posteriormente processado e o soro submetido às avaliações bioquímicas de níveis de glicose, colesterol, triglicérides, AST e ALT.

Nossos resultados sugerem que, em dose terapêutica, tanto o tratamento endovenoso quanto o tratamento oral induzem o mesmo perfil bioquímico, e não apresentam alterações que possam ser consideradas tóxicas ao longo do tempo observacional, fato este comprovado pela curva de AST (Figuras 53 e 55) e ALT (Figuras 57 e 59).

Por outro lado foram observadas algumas alterações consideradas desejáveis como a possível redução de triglicérides e colesterol tanto no tratamento por via oral quando por via endovenosa (Figuras 41, 43, 45 e 47). MacCallum e colaboradores (2011) estudando o papel do tratamento de 18-MC em Ratos com aumento de

ingesta de glicose induzida por Grelina, não observaram uma redução estatisticamente significativa de triglicérides e colesterol. Entretanto, de posse desses nossos resultados, o grupo do Dr. Stanley Glick e o nosso grupo têm trabalhado juntos para melhor compreensão do papel de 18-MC na possível redução de colesterol e triglicérides, o que é altamente desejável.

Em nosso sistema experimental, a única alteração que se revelou potencialmente indesejável foi o aumento dos níveis de glicose no tratamento por via oral no tempo de 15 e 30 minutos. Entretanto, como os níveis retornaram ao iniciais após 90 minutos, tal alteração não foi considerada tóxica. Taraschenko *et al.* (2008) observou a redução dos níveis de glicose após o tratamento crônico com 18-MC.

Nossos resultados *in vivo* apontaram uma grande atividade leishmanicida contra *L. amazonensis*, em infecções crônicas, com um tratamento de curtíssima duração (no máximo 10 dias) quando comparado com outros tratamentos experimentais e extensamente discutido nos parágrafos anteriores. Além disso, a possível toxicidade observada aparece em concentrações muito superiores à administrada para avaliações de eficácia. Esse conjunto de fatores nos levou a submeter à ANVISA, em dezembro de 2011, o pedido de anuência prévia do estudo clínico intitulado “ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO, DE FASE I DO ALCALÓIDE INDÓLICO IBOGAÍNICO 18-METOXICORONARIDINA, COM ESCALONAMENTO DE DOSE”, patrocinado pela **Hebron Farmacêutica**, empresa genuinamente brasileira e terá o monitoramento externo da SAVANT HWP, Inc. O presente estudo foi aprovado e os primeiros voluntários deverão iniciar o tratamento em março de 2013.

Como mencionado no título, esse estudo clínico será de fase I, em que procuraremos avaliar a segurança e tolerabilidade do fármaco em voluntários sadios.

Além disso, serão realizados estudos farmacocinéticos, acompanhando também o perfil bioquímico dos pacientes ao longo do tempo. Todos os voluntários estarão internados e monitorados exaustivamente para garantir a segurança do protocolo.

Sem risco de cometer uma injustiça, esse protocolo clínico com 18-MC será o primeiro estudo de fase I iniciado exclusivamente no Brasil, sem a utilização de dados clínicos oriundos de outros estudos realizados no exterior uma vez que essa será a primeira vez, no mundo, em que 18-MC será avaliado clinicamente. Esse, sem dúvida, poderá ser considerado um dos raros momentos em que deixaremos de ser coadjuvantes do processo de inovação, tornando-nos protagonistas do processo de transformação da humanidade, de forma que garanta melhor qualidade de vida para todos os indivíduos.

Dessa forma, os dados aqui apresentados, que suportam o estudo clínico são de altíssima relevância. Outras informações que não fazem parte do escopo do referido estudo clínico serão explorados no futuro, como a ação de 18-EC *in vivo*, bem como sua toxicidade aguda e subaguda.

7 CONCLUSÃO

A atividade antiparasitária de alcaloides vem sendo extensamente estudada nos últimos anos (OSORIO, 2008; MISHRA, 2009). Desse grupo, os alcaloides indólicos possuem atividade preponderante, despontando como novos potenciais fármacos para o tratamento das parasitoses, especialmente Leishmaniose.

Moléculas da classe de alcaloides indólicos derivados da ibogaína receberam especial atenção desde o final da última década do século XX uma vez que apresentaram potencial de serem utilizadas para a reversão da dependência química a múltiplas drogas (GLICK *et al.*, 2000). Em paralelo, avaliamos o potencial leishmanicida do alcaloide natural Coronaridina. Logo após o contato com o grupo do Dr. Kuehne e do Dr. Glick recebemos amostras do derivado semissintético 18-metoxicoronaridina e mais recentemente, recebemos amostras de outro derivado, a 18-etoxicoronaridina.

Embora os estudos iniciais para síntese desses derivados não tenham seguido um planejamento racional baseado em avaliações de QSAR, atualmente, Dr. Kuehne tem trabalhado no aprimoramento da rota sintética e no preparo de outros fármacos submetidos a análises prévias de QSAR, tanto em alvos “anti-vício” quando em alvos de espécies de *Leishmania*.

Os estudos *in silico* realizados por nosso grupo no Brasil sugeriram que, com os parâmetros analisados, não é possível estabelecer uma correlação entre a atividade leishmanicida observada para 18-MC e 18-EC e o *drug-score* de ambos e nem foi possível determinar os ganhos que a introdução da metoxila (18-MC) e etoxila (18-EC) trouxeram para a molécula de COR.

Nossos estudos de atividade leishmanicida, *in vitro*, evidenciaram que 18-EC possui atividade superior que 18-MC tanto em promastigotas quanto em amastigotas, sendo sugestivo que o enlogamento do radical em C-18 possa contribuir com o aumento da eficácia sítio-alvo do parasito. Tal atividade foi observada nas duas espécies avaliadas, *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Por outro lado, do ponto de vista da inibição das desidrogenases mitocondriais de macrófagos peritoneais de camundongos, inibição essa, indicativa de citotoxicidade, não houve diferença estatística entre 18-MC e 18-EC, sugerindo uma ação específica e direta no parasito. Os fármacos inibiram pouco mais que 20% a atividade mitocondrial dos macrófagos tratados. Dessa forma, não é possível estabelecer uma ordem de citotoxicidade, uma vez que ambos apresentaram citotoxicidade semelhante.

Devido a disponibilidade do fármaco (síntese em maior escala), o longo tempo de estudo e o interesse da indústria farmacêutica, submetemos 18-MC a avaliações *in vivo*. Os resultados revelaram alta atividade leishmanicida contra Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *L. amazonensis*. O alcaloide foi capaz de reduzir em mais de 99% a carga parasitária de animais infectados cronicamente, com tratamento de curtíssima duração (5 ou 10 dias) e com uma dose baixa do fármaco (10mg/Kg).

Uma das principais etapas da avaliação pré-clínica de fármacos é a determinação de seu potencial tóxico. Essa etapa é revestida de caráter legal, uma vez que se trata de atender às exigências de agências regulatórias (como a ANVISA, FDA e EMEA) para a liberação de estudos clínicos.

Sendo assim, a toxicidade de 18-MC foi avaliada e é possível sugerir que esse alcaloide é considerado seguro nos modelos de avaliação de toxicidade aguda

e subaguda utilizados. Nesse sentido, é possível determinar a categoria GSH (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures* - Sistema de Classificação Mundial Harmonizado de Substâncias Químicas e Misturas) 3, em uma escala de 0 – 5, em que 0 significa nada seguro e 5 significa ser sem qualquer sinal de toxicidade.

As avaliações de toxicidade a que foi submetida 18-MC foram a determinação de parâmetros clínicos, DL₅₀, avaliações histopatológicas e bioquímicas. Em todas, o fármaco foi considerado potencialmente seguro e, portanto, foi submetido para avaliação clínica.

A política de parcerias entre a academia e a indústria ainda é algo novo no Brasil. A academia olha com ressalvas o ambiente industrial, como se fosse o vilão do desenvolvimento científico, uma vez que os resultados precisem estar por um tempo protegidos pelas patentes, é necessário trabalhar com o máximo de sigilo e as divulgações científicas ficam limitadas. Por outro lado, a indústria enxerga o cientista como um indivíduo pouco prático, dado a devaneios teóricos que podem levar a não cumprimentos dos prazos estabelecidos e aumentar o custo do desenvolvimento de fármacos inovadores.

A realidade exposta acima precisa mudar se queremos colocar o Brasil na vanguarda do desenvolvimento científico e de inovação mundial. Há muito tempo as agências de fomento não possuem recurso suficiente para alavancar a demanda para a produção científica de nosso país. As parcerias focadas na inovação são extremamente bem vindas.

O presente estudo é o resultado promissor de uma parceria entre a academia (a Universidade Presbiteriana Mackenzie) e a indústria farmacêutica (Hebron Farmacêutica). Obviamente, diversas adaptações ao modelo tradicional de estudo

científico foram adotadas, como a normatização de procedimentos, a elaboração de relatórios periódicos (quinzenais) e o estrito atendimento dos prazos estabelecidos no planejamento anual e semestral. Todos esses fatores auxiliam no atendimento das exigências legais solicitadas pela ANVISA para a produção de um futuro medicamento.

A 18-MC é um fármaco que poderá fazer história se os resultados clínicos de fase I (em processo de inicialização da seleção de pacientes) e de fase II (em fase de seleção de centros de estudos e elaboração do protocolo) seguirem a mesma linha dos estudos pré-clínicos. Outros resultados que não foram aqui apresentados referem-se a dados em fase de finalização, como os estudos de toxicocinética e toxicidade de 30 dias (subcrônica).

Em paralelo, os resultados com 18-EC nos estimulam a avançar para a realização de estudos de eficácia *in vivo* e toxicológicos também com esse alcaloide, bem como no aprofundamento dos estudos de QSAR e *docking* com ambos os fármacos na tentativa de melhor compreendermos o papel das modificações em C-18 da coronaridina, uma vez que demos apenas os primeiros passos nesse tipo de estudo.

Entendemos que as análises teóricas prévias são poderosas ferramentas no desenvolvimento de novos fármacos, favorecendo o trabalho de investigação tradicional, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, permitindo o entendimento das interações das moléculas em seus respectivos alvos, propondo melhoria dos compostos líderes e amplificando a velocidade do longo caminho a ser percorrido entre a pesquisa do fármaco e a transformação desse em medicamento acessível à população em geral.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2010). Guia para a condução de Estudos Não-Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Accessed in January 20th 2011.
- ALBUQUERQUE, P.L.; SILVA JUNIOR, G.B.; FREIRE, C.C. et al. (2009). Urbanization of Visceral Leishmaniasis (Kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Publ.* 26(4):330-3.
- ARTHUR, G. & BITTMAN, R. (1998). The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem Biophys. Acta.* 1390: 85-102.
- BANDARAGE, U. K.; KUHENE, M. E.; GLICK, S. D. (1999). Total Synthesis of Racemic Albifloranine and its Anti-Addictive congeners, including 18-Methoxycoronaridine. *Tetrahedron:* 9405-9404.
- BANDUWARDENE, R.; MULLEN, A.B. & CARTER, K.C. (1997) Immune responses of *Leishmania donovani* infected BALB/c mice following treatment with free and vesicular sodium stibogluconate formulations. *Int J Immunopharmacol.*, 19(4):195-203.
- BARBOSA-FILHO, J. M. (1994). In Minicurso: "Produtos Naturais Bioativos". XLV Congresso Nacional de Botânica, São Leopoldo, RS, Brasil.
- BERMAN J. (2005). Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs.* 14(11):1337-46.
- BERMAN, J. D. (1998). Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr. Opin. Inf. Dis.*, 11: 707-710.
- BERMAN, J.D. (1988). Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies., *Rev. Infect. Dis.* 10 (3): 560-586.
- BERMAN, J.D. (1997). Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years., *Clin. Infect. Dis.* 24: 684-703.
- BHATTACHARYA, S. K. et al., (2007). Phase 4 Trial of Miltefosine for the treatment of Indian Visceral Leishmaniasis.
- BLAAUBOER, B. J. (2003). Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Alternatives to laboratory animals.* v.31 n. 3, p. 277-281.
- BOTELHO, A. C.; NATAL, D. First Epidemiological description of visceral Leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009, 42(5): 503- 508.

BOU-HABIB, D. C.; RODERIQUEZ, G.; ORAVECZ, T.; BERMAN, P. W.; LUSSO, P. & NORCROSS, M. A. (1994). Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J. Virol.* 68: 6006-6013.

BRODERICK PA, PHELAN FT, ENG F, WECHSLER RT. Ibogaine modulates cocaine responses which are altered due to environmental habituation: in vivo microvoltammetric and behavioral studies. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994 Nov;49(3):711-28.

CAPPENDIJK SL, DZOLJIC MR. Inhibitory effects of ibogaine on cocaine self-administration in rats. *Eur J Pharmacol.* 1993 Sep 14;241(2-3):261-5.

CARVALHO, R.B. (1986). Benzileugenol., *Ciência Hoje.* 4 (23): 10.

CHAKRABORTY, A. K. & MAJUMDER, H. K. (1988). Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 605-612.

COECKE, S., *et al.*, (2005). Toxicokinetics and metabolism. *Alternatives to laboratory animals.* suppl 1, p. 147-175.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K & YARDLEY, V. (2006). Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res,* 123: 399-410.

DA CUNHA-JÚNIOR EF *et al.* (2011) Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* Jul;66(7):1555-9.

DA SILVA *et al.* (2007). Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 15:7553-7560.

Da SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S. & ROSSI-BERGMANN, B. (1999). The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. *Parasitol.* 118: 575-582.

De LUCA, V. Enzymology of indole alkaloids biosynthesis. *In: Methods in Plant Biochemistry. Enzymes of Secondary Metabolism,* P. J. Lea, ed. (London: Academic Press): 345-368, 1993.

DEBRABANT A *et al.* (2003) Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol.* Mar;33(3):257-67

DEECHER DC, TEITLER M, SODERLUND DM, BORNMANN WG, KUEHNE ME, GLICK SD. Mechanisms of action of ibogaine and harmaline congeners based on radioligand binding studies. *Brain Res.* 1992 Feb 7;571(2):242-7.

DELORENZI JC, FREIRE-DE-LIMA L, GATTASS CR, DE ANDRADE COSTA D, HE L, KUEHNE ME, SARAIVA EM. In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jul;46(7):2111-5.

DELORENZI, J. C. M. O. B. Estudo fitofarmacológico de *Peschiera australis* e sua ação sobre *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 1998, 103 p.

DELORENZI, J. C. M. O. B. Quimioterapia na Leishmaniose cutânea: Atividade de Alcalóides Indólicos. Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2002, 116 p.

DELORENZI, J. C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R. *et al* (2001). Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloids from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45 (5): 1349-1354.

DEVEREUX M, POPELIER PL. (2010) In silico techniques for the identification of bioisosteric replacements for drug design. *Curr Top Med Chem*. 10(6):657-68.

DIAS L. R. S. *et al.*, (2007). Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15:211-219.

EUE, I.; ZEISING, R. & ARNDT, D. (1995). Alkylphosphocoline-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 121: 350-356.

FEIXIONG C *et al.* (2012). admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, 52(11): 3099-3105.

FERNANDEZ, J. W. *Bwiti* – an ethnography of religious imagination in Africa. Princeton Press, NJ, 1982.

FERREIRA C *et al.* (2011) Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*. Dec;72(17):2155-64.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. (2011). Reactive Oxygen Species production and Mitochondrial disfunction contribute to Quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PlosOne*. 6(2):1-7.

GANTT, K. R.; *et al.*, (2001). Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol*. 167: 893-901.

GASSER Jr. *et al.*, (1994). Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis., *Clin. Infect. Dis*. 18: 83-90.

GLICK, S.D; KUEHNE, M. E. (2001). Ibogamine Congeners. Patent U.S. # 6.211.360.

GLICK, S.D.; KUEHNE, M. E.; MAISONNEUVE, I. M. et al. (1996a). 18-methoxycoronaridine, a non-toxic iboga alkaloid congener: effects on morphine and cocaine self-administration and on mesolimbic dopamine release in rats., *Brain Res.* 719: 29-35.

GLICK, S.D.; KUEHNE, M. E.; RAUCCI, J. et al (1994). Effects of iboga alkaloids on morphine and cocaine self-administration in rats: relationship to tremorigenic effects and to dopamine release in nucleus accumbens and striatum. *Brain Research.* 657: 14-22.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I. M. & PEARL, S. M. (1997). Evidence for roles of kappa opioid and NMDA receptors in the mechanism of action of ibogaine. *Brain Res.* 749: 340-343.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I. M. & SZUMLINSKI, K. K. (2000b). 18-Methoxycoronaridine (18-MC) and ibogaine: comparison of anti-addictive efficacy, toxicity and mechanisms of action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 914: 369-386.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I. M. (1998). Mechanisms of anti-addictive actions of ibogaine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844: 214-226.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I. M. (2000a). Development of novel medications for drug addiction: the legacy of an African shrub. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 914: 88-103.

GLICK, S.D.; MAISONNEUVE, I. M.; HOUGH, L. B.; KUEHNE, M. E. & BANDERAGE, U. K. (1999). (+)-18-Methoxycoronaridine: A novel iboga alkaloid congener having potential anti-addictive efficacy. *CNS Drug Rev.* 5: 27-42.

GLICK, S.D.; PEARL, S. M.; CAI, Z. & MAISONNEUVE, I. M. (1996b). Ibogaine-like effects of nor-ibogaine in rats. *Brain Res.* 713: 294-297.

GLICK, S.D.; ROSSMAN, K.; RAO, N. C.; MAISONNEUVE I. M. & CARLSON, J. N. (1992). Effects of ibogaine on acute signs of morphine withdrawal in rats: Independence from tremor. *Neuropharmacol.* 31: 497-500.

GLICK, S.D.; ROSSMAN, K.; STEINDORF, S. & CARLSON, J. N. (1991). Effects and after effects of ibogaine on morphine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 195: 341-345.

GLICK SD, SELL EM, MAISONNEUVE IM. (2008). Brain regions mediating $\alpha 3\beta 4$ nicotinic antagonist effects of 18-MC on methamphetamine and sucrose self-administration. *Eur J Pharmacol.* Dec 3;599(1-3):91-5.

GLICK SD, SELL EM, MCCALLUM SE, MAISONNEUVE IM. (2011) Brain regions mediating $\alpha 3\beta 4$ nicotinic antagonist effects of 18-MC on nicotine self-administration.

GOLDIM J. R. (2007). A Avaliação Ética da Investigação Científica de novas Drogas: A importância da caracterização adequada das Fases da Pesquisa. *Rev HCPA*;27(1)

GOODWIN, L. C. (1995). Pentostan® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 339-341.

GOODWIN, L. G. & PAGE, J. E. (1943). A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.* 22: 236-240.

GOTO, H; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert. Rev. Infec. Ther.* 2010, 8(4): 419-433.

GRIEWANK, K *et al.* Miltefosine efficiently eliminates *L. major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 2010, 54(2):652-659.

GROGL M, THOMASON T.N., FRANKE E.D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Jul;47(1):117-26.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. (2010). Alkaloids in Marine Algae. *Marine Drugs.* 8:269-284.

HADIGHI, R; BOUCHER, P; KHAMESIPOUR, A *et al.* (2007). Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmania drugs. *Parasitol Res.* 101(5):1319-22.

HANDMAN E. (2001) Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 14(2):229-43.

HOUSE, R.V.; THOMAS, P.T. & BHAGAVA, H.N. (1995). Comparison of the hallucinogenic indole alkaloids ibogaine and harmaline for potential immunomodulatory activity., *Pharmacol.* 51: 56-65.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; & SCHUSTER, B.G. (1994). Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis., *Parasitol. Today* 10 (2): 65-68.

JIANG W *et al.* (2011)The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation. *Int J Pharm.* 2011 Oct 14;418(2):151-60. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.024. Epub 2011 Jul 23.

KHAN I.A. *et al.*, Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2):810-2

KUEHNE ME *et al.* (2003a) Syntheses and biological evaluation of vinblastine congeners. *Org Biomol Chem.*;1(12):2120-36.

KUEHNE ME *et al.* (2003b) Synthesis and biological evaluation of 18-methoxycoronaridine congeners. Potential antiaddiction agents. *J Med Chem.* Jun 19;46(13):2716-30.

KUHLENCORD, A.; MONIERA, T.; EIBL, H. & UNGER, C. (1992). Hexadecylphosphocoline: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (8): 1630-1634.

LAINSON, R. New World Leishmaniasis. In: F.E.G. COX, Ed. In: The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases. The Wellcome Trust (Publisher). 1996: 219-230.

LAYER RT, SKOLNICK P, BERTHA CM, BANDARAGE UK, KUEHNE ME, POPIK P. Structurally modified ibogaine analogs exhibit differing affinities for NMDA receptors. *Eur J Pharmacol.* 1996 Aug 8;309(2):159-65.

Le FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B. *et al* (1998). Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (3): 654-658.

LEON, L.; VASCONCELLOS, M.E.; LEON, W.; CRUZ, F.S.; DOCAMPO, R. & DE SOUZA, W. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Effect of olivacine on macromolecular synthesis, ultrastructure and respiration of epimastigotes., *Exp. Parasitol.* 45: 151-159.

LIMA, H. C.; BLEYENBARG, J. A.; TITUS, R. G. (1997). A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. *Parasitology Today.* 13(2):80-82.

LIÑARES GE, RAVASCHINO EL, RODRIGUEZ JB. (2006) Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem.* 13(3):335-60.

LIPINSKI C. *et al.* (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 46:3-26.

LIPNICK, R.L. *et al.*(1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.

LIRA R, SUNDAR S, MAKHARIA A, KENNEY R, GAM A, SARAIVA E, SACKS D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):564-7.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V. & SARAIVA, N. G. (1998). Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (8): 1990-1995.

LUX, H.; HART, D. T.; PARKER, P. J. & KLENNER, T. (1996). Ether-lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkylphospholipid analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416: 201-211.

LUX, H.; HEISE, N; KLENNER, T.; HART, D. & OPPERDOES, F. R. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogs in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111: 1-14.

MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2003) Anti-addictive actions of an iboga alkaloid congener: a novel mechanism for a novel treatment. *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;75(3):607-18.

MAISONNEUVE IM, VISKER KE, MANN GL, BANDARAGE UK, KUEHNE ME, GLICK SD. Time-dependent interactions between iboga agents and cocaine. *Eur J Pharmacol.* 1997 Oct 8;336(2-3):123-6.

MARGONARI C, FREITAS CR, RIBEIRO RC, MOURA AC, TIMBÓ M, GRIPP AH, PESSANHA JE, DIAS ES. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Feb;101(1):31-8. Epub 2006 May 12.

MARSDEN, P.D.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; LAGO, E.L.; CUBA, C.C.; BARRETO, A.C.; COSTA, J.M. & JONES, T.C. (1984). Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil. An area of *L. b. braziliensis* transmission III. Mucosal disease presentation and initial evolution., *Rev. Soc. Med. Trop.* 17: 179-186.

MASH DC, STALEY JK, PABLO JP, HOLOHEAN AM, HACKMAN JC, DAVIDOFF RA. Properties of ibogaine and its principal metabolite (12-hydroxyibogamine) at the MK-801 binding site of the NMDA receptor complex. *Neurosci Lett.* 1995 Jun 2;192(1):53-6.

MAUEL, J & RANSIJN, A. (1997). *Leishmania* spp. Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Exp. Parasitol.* 87(2): 98-111.

MCCALLUM SE et al. (2011) Effects of 18-methoxycoronaridine on ghrelin-induced increases in sucrose intake and accumbal dopamine overflow in female rats.

MIGUEL DC, YOKOYAMA-YASUNAKA JK, ULIANA SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Jun 11;2(6):e249.

MISHRA, B. B. et al. (2009). Fighting against Leishmaniasis: Search of Alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry.* 9:107-123.

MOLINARI HH, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. Ibogaine neurotoxicity: a re-evaluation. *Brain Res.* 1996 Oct 21;737(1-2):255-62.

MONTEIRO WM, NEITZKE HC, LONARDONI MV, SILVEIRA TG, FERREIRA ME, TEODORO U. Geographic distribution and epidemiological features of American tegumentary leishmaniasis in old rural settlements in Paraná State, Southern Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008 Jun;24(6):1291-303.

MUNSON AE, DRUMMOND DC, ADAMS AC, BRADLEY SG.(1976) Enhanced toxicity for mice of combinations of bacterial lipopolysaccharide and vincristine. *Antimicrob Agents Chemother.* May;9(5):840-7.

NEGHINA, R & NEGHINA, A. M. (2010). Leishmaniasis: A Global Concern for Travel Medicine. *Scand J Infect Dis.* 42(8):563-70

NEUSS, N. Indole Alkaloids. In: Pelletier, S.W., ed. *Chemistry of the Alkaloids.* Van Nostrand Reinhold Company (Publishers). 1970: 213-266.

NEVES, D. B. *et al.* Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop. Med. Int. Health,* 2009, 14(12):1515-1522.

O'HEARN, E. & MOLLIVER, M. E. (1993b). Degeneration of Purkinje cells in parasagittal of the cerebellar vermis after ibogaine or harmaline. *Neuroscience.* 55: 303-310.

OATES, J.A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: Hardman, J.G.; Gilman, A.G. & Limbird, L.E., ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics - 9th edition.* McGraw-Hill Companies, Inc. (Publishers). 1996: 780-808.

OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

OKUYAMA, E.; GAO, L.H.; YAMAZAKI, M. (1992). Analgesic components from bornean medicinal plants, *Tabernaemontana pauciflora* Blume and *Tabernaemontana pandacaqui* Poir., *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 40 (8): 2075-2079.

OLLIARO, P. L. & BRYCESON, A. D. M. (1993). Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today.* 9 (9): 323-328.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (2000). Les Leishmanioses et les co-infections *Leishmania*/HIV. Aide-Mémoire OMS. 116. Bureau du Port-Parole de IÓMS, Genève.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (2008). Les Leishmanioses et les co-infections *Leishmania*/HIV. Aide-Mémoire OMS. 116. Bureau du Port-Parole de IÓMS, Genève.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. (2008). Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Acute Toxic Classic Method. (2001).

OSORIO, E.; ROBLEDO, S; BASTIDA, J. (2008). Alkaloids with Antiprotozoan Activity. In: Geoffrey A. Cordell, editor: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Vol 66, The Netherlands: Academic Press, 113 – 190.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. (2004). Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistances Updates*. 7:257-266.

PADRÓN-NIEVES, M; DÍAZ, E; MACHUCA, C et al. (2009). Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. *Exp Parasitol*. 121(4):331-7.

PALUMBO E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. *Braz J Infect Dis*. 2008 Feb;12(1):2-4.

PEIXOTO A. L.; MORIN, M. P. (2003). Coleções Botânicas: Documentação da Biodiversidade Brasileira. *Revista da Biodiversidade*. 21-24.

PÉREZ NM, TORRICO FB, MORALES A. (2012) Acute toxicity, antinociceptive activity and indole alkaloids of aqueous extract from bark of *Aspidosperma cuspa* (Kunth) Blake. *J ETHNOPHARMACOL*. Sep 28;143(2):599-603.

PETERS, N.C. & SACKS, D.L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*. 11(9):1290-6.

PETERSON AT, PEREIRA RS, NEVES VF. (2004). Using epidemiological survey data to infer geographic distributions of leishmaniasis vector species. *Rev Soc Bras Med Trop*.;37(1):10-4.

PICADA, J.N.; da SILVA, V.C.L.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, A.T. & HENRIQUES, J. A.P. (1997). Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids., *Mutat. Res*. 379: 135-149.

PIMENTA, P.F.P.; SARAIVA, E.M.B.; ROWTON, E.; MODI, G.B.; GARRAWAY, L.A.; BEVERLEY, S.M.; TURCO, S.J. & SACKS, D.L. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan., *Prod. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 9155-9159.

PINHEIRO, L. C. S. et al. (2012). Searching for new antileishmanial lead drug candidates: Synthesis, biological and theoretical evaluations of promising thienol [2,3-b] pyridine derivatives. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 41(1):32-39

POPIK P, LAYER RT, SKOLNICK P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol Rev*. 1995 Jun;47(2):235-53. Review. No abstract available.

POPIK, P & SKOLNICK, P. (1999). Pharmacology of ibogaine and ibogaine-related alkaloids. *The Alkaloids*, 52: 197-231.

PRIETO, P. *et al.*, (2006). The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Alternatives to laboratory animals*. v. 34, n. 3, p.315-41.

PURCHASE IF *et al.* (1998). Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicol Sci*. Jun;43(2):86-101.

RANDHAWA MA . (2009) Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. Jul-Sep;21(3):184-5

RASAKHAM K, LIU-CHEN LY. (2011). Sex differences in kappa opioid pharmacology. *Life Sci*; 88:2-16.

RATES, S.M.K.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SOUZA, I.A.; & HENRIQUES, A.T. (1993). Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*., *Int. J. Pharmacog*. 31 (4): 288-294

REZVANI AH *et al.* (1997) Attenuation of alcohol consumption by a novel nontoxic ibogaine analogue (18-methoxycoronaridine) in alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav*. Oct;58(2):615-9.

ROBERTS, W.L.; McMURRAY, W.J. & RAINEY, P.M. (1998). Characterization of the antimonial antileishmanial agent Meglumine Antimoniate (Glucantime)., *Antimicrob. Ag. Chemother*. 42 (5): 1076-1082.

ROUX, S.; SABLÉ,E.; PORSOLT, R. D. (2004). Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function. *Current Protocols in Pharmacology*. 10.10.1-10.10.23.

SAFA, O.; PARTIN, S.; MATHEW, A. M. & BIBBY, M. C. (1997). Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. *Anticancer Res*. 17: 37-43.

SAHA, A.K.; MUKHERJEE, J. & BHADURI, A. (1986). Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes., *Mol. Biochem. Parasitol*. 19: 195-200.

SANDER T. *et al.* (2009). OSIRIS, an Entirely in-House Developed Drug Discovery Informatics System. *Journal Chemical Informatics Model*. 49:232-246.

SANDERS-BUSH, E. & MAYER, S.E. 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) receptor agonists and antagonists. In: Hardman, J.G.; Gilman, A.G. & Limbird, L.E., ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics - 9th edition*. McGraw-Hill Companies, Inc. (Publishers). 1996: 249-263.

SANTOS, J.M; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R. *et al.* (2010). Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 43(1):41-5.

SÃO THIAGO, P. T. & GUIDA, U. (1990). Leishmaniose tegumentar no oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 23 (4):201-203.

SARAIVA, E.M.B.; PIMENTA, P.F.P; BRODIN, T.N.; ROWTON, E.; MODI, G.B. & SACKS, D.L. (1995). Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*., *Parasitol.* 111: 275-287.

SCHMIDT TJ et al. (2012) The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr Med Chem.* 19(14):2176-228

SEIFERT K. (2011) Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med Chem J.* 5:31-9.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUKI, K.; MAQUAIRE, S.; QUAISSI, A. & LEMESRE, J. L. (1998). Axenically grown amastigote of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (12): 3097-3102.

SERENO, D; HOZMULLER, P.; MANGOT, I.; CURRY, G.; QUAISSI, A. & LEMESRE, J. P. (2001). Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (7): 2064-2069.

SERSHEN H, HARSING LG JR, HASHIM A, LAJTHA A. Ibogaine reduces amphetamine-induced locomotor stimulation in C57BL/6By mice, but stimulates locomotor activity in rats. *Life Sci.* 1992;51(13):1003-11.

SHARMA, P. & CORDELL, G. A. (1988). Heyneanine hidroxyindolenine, a new indole alkaloid from *Ervatamia coronaria* var. *plena*., *J. Nat. Prod.* 51 (3): 528-531.

SHEPPARD, S. G. (1994). A preliminary investigation of ibogaine: case reports and recommendations for further study. *J. Subst. Abuse Treat.* 11 (4): 379-385.

SILVA EM, CIRNE-SANTOS CC, FRUGULHETTI IC, GALVÃO-CASTRO B, SARAIVA EM, KUEHNE ME, BOU-HABIB DC. Anti-HIV-1 activity of the Iboga alkaloid congener 18-methoxycoronaridine. *Planta Med.* 2004 Sep;70(9):808-12.

SINGH UK, PRASAD R, KUMAR R, JAISWAL BP.(2006) Miltefosine in children with visceral leishmaniasis. *Indian Pediatr.* Dec;43(12):1076-80.

SINGODIA, D. *et al.* Development and performance evaluation of Anphotericim B transferosomes against resistant and sensitive clinical isolates of visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2010, 6(3):293-302.

SOARES DC, ANDRADE AL, DELORENZI JC, SILVA JR, FREIRE-DE-LIMA L, FALCÃO CA, PINTO AC, ROSSI-BERGMANN B, SARAIVA EM. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Int.* 2010 Jun;59(2):173-7. Epub 2010 Jan 20.

SOTO, J et al., (2008) Short report: Efficacy of Miltefosine for Bolivian cutaneous Leishmaniasis.. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 78(2):210-211.

STANDDAERT, D.G. & YOUNG, AB. Treatment of central nervous system degeneration disorders. In: Hardman, J.G.; Gilman, A.G. & Limbird, L.E., ed. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics - 9th edition. McGraw-Hill Companies, Inc. (Publishers). 1996: 503-519.

St-PIERRE, B.; VAZQUEZ-FLOTA, F. A. & De LUCA, V. (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloids biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*. 11: 887-900.

SUNDAR, S et al., (2006). Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Dec;100 Suppl 1:S26-33.

SUNDAR, S; SINGH, A; AGARWAL, D et al. (2009). Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 80(5):700-3.

SZUMLINSKI KK, BALOGUN MY, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2000a). Interactions between iboga agents and methamphetamine sensitization: studies of locomotion and stereotypy in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. Aug;151(2-3):234-41.

SZUMLINSKI KK, MCCAFFERTY CA, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2000b) Interactions between 18-methoxycoronaridine (18-MC) and cocaine: dissociation of behavioural and neurochemical sensitization. *Brain Res*. Jul 21;871(2):245-58.

TAESOTIKUL, T. *Tabernaemontana pandacaqui* Poir., a traditional Thai medicinal plant. Pharmacological activities and alkaloid contents. Proefschrift Rijksuniversiteit Leiden, 1997: 9-138.

TAESOTIKUL, T.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; VERPOORT, R. & SCHEFFER, J. J. (1998). Neuropharmacological activities of the crude alkaloidal fraction from stems of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *J. Ethnopharmacol*. 62(3): 229-234.

TARASCENKO OD et al. (2008) 18-methoxycoronaridine: a potential new treatment for obesity in rats? *Psychopharmacology (Berl)*. Dec;201(3):339-50.

TARASCENKO OD, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2010) 18-Methoxycoronaridine, a potential anti-obesity agent, does not produce a conditioned taste aversion in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. Sep;96(3):247-50.

TARASCENKO OD, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2011) Resistance of male Sprague-Dawley rats to sucrose-induced obesity: effects of 18-methoxycoronaridine.

TARASCENKO OD, MAISONNEUVE IM, GLICK SD. (2011) Sex differences in high fat-induced obesity in rats: Effects of 18-methoxycoronaridine. *Physiol Behav*. Jun 1;103(3-4):308-14.

TITUS RG et al. (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol.* Sep;7(5):545-55

TRACY, J.W. & WEBSTER Jr., L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infections. In: Hardman, J.G.; Gilman, A.G. & Limbird, L.E., ed. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* - 9th edition. McGraw-Hill Companies, Inc. (Publishers). 1996: 987-1008.

TUON FF et al. (2008) Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* Feb;47(2):109-24.

UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E. A.; KIM, D. J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G. & EIBL, H. (1989). Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. *Acta Oncol.* 28: 213-217.

URBINA, J. (1997). Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites., *Parasitol.* 114: S91-S99.

VALERIO LG JR. (2011) In silico toxicology models and databases as FDA Critical Path Initiative toolkits. *Hum Genomics.* Mar;5(3):200-7.

van BEEK, T. A. & van GESSEL, M. A. J. T. (1984). Alkaloids of *Tabernaemontana* species. p. 76-226. In *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. Pelletier, SW ed. Willey & Sons, New York, vol 6.

VAN DER HEIJDEN R, JACOBS DI, SNOEIJER W, HALLARD D, VERPOORTE R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem.* 2004, 11(5):607-28.

VELEZ I. *et al.* Efficacy of Miltefosine for the treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *Am. Trop. Med. Hyg.*, 2010, 83(2):351-356.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V; BARREIRO, E. J. (2006). Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova.* 29(2):326-337.

WERNECK G.L. (2010). Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* 26(4):644-5.

YI J et al. (2013) Safety evaluation of main alkaloids from *Rhizoma Coptidis*. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jan 9;145(1):303-10.

ZHANG W, RAMAMOORTHY Y, TYNDALE RF, GLICK SD, MAISONNEUVE IM, KUEHNE ME, SELLERS EM. (2002). Metabolism of 18-methoxycoronaridine, an ibogaine analog, to 18-hydroxycoronaridine by genetically variable CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* 2002 Jun;30(6):663-9.