



Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e
Medicina Tropical

Rafaella Rodrigues Costa

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ACARBOSE CONTRA A
ESPÉCIE *LEISHMANIA INFANTUM* E USO COMO AGENTE TERAPÊUTICO
CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

Belo Horizonte

2020

Rafaella Rodrigues Costa

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ACARBOSE CONTRA A
ESPÉCIE *LEISHMANIA INFANTUM* E USO COMO AGENTE TERAPÊUTICO
CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre junto ao referido Programa.

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Coorientadora

Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares

Belo Horizonte

2020

C837a	Costa, Rafaela Rodrigues. Atividade antileishmanial In Vitro e In Vivo da acarbose contra a espécie <i>leishmania infantum</i> e uso como agente terapêutico contra a leishmaniose visceral [recursos eletrônicos]. / Rafaela Rodrigues Costa. - - Belo Horizonte: 2023. 82 f.: il. Formato: PDF. Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions. Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Coorientador (a): Grasielle de Sousa Vieira Tavares. Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical. Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. 1. Leishmaniose Visceral/terapia. 2. Leishmaniose Visceral/tratamento farmacológico. 3. Reposicionamento de Medicamentos. 4. Toxicidade. 5. Acarbose. 6. <i>Leishmania infantum</i>. 7. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Tavares, Grasielle de Sousa Vieira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
-------	---

NLM: WC 715



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA DE MEDICINA TROPICAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

RAFAELLA RODRIGUES COSTA

Às 14:00 horas do dia 28 de outubro de 2020, transmissão por videoconferência pela plataforma LIFESIZE (<https://youtu.be/3-cY2lfyglc>), da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a 378ª defesa de dissertação de RAFAELLA RODRIGUES COSTA, número de registro 2019715397, graduada no curso de MEDICINA, com requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador (UFMG), Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares - Coorientadora (UFMG), Profa. Sandra Lyon (FHEMIG), Dr. Vinício Tadeu da Silva Coelho (UFMG). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada: "ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL IN VITRO E IN VIVO DA ACARBOSE CONTRA A ESPÉCIE LEISHMANIA INFANTUM E USO COMO AGENTE TERAPÊUTICO CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de outubro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 28/10/2020, às 18:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Grasielle de Sousa Vieira Tavares, Usuário Externo, em 28/10/2020, às 20:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Sandra Lyon, Usuário Externo, em 11/11/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Vinício Tadeu da Silva Coelho, Usuário Externo, em 19/11/2020, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0327931 e o código CRC 3733F374.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Fábio Alves da Silva Júnior

PRÓ-REITORA DE PESQUISA: Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Humberto José Alves

VICE-DIRETOR: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

COORDENADOR: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADOR: Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO:

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Unaí Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior

Representante discente: João Augusto Oliveira da Silva

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, no Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho e coorientação da professora Dra. Grasielle de Souza Vieira Tavares, ambos da UFMG.

COLABORADORES

Profa. Dra. Luciana Maria Ribeiro Antinarelli¹

Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra¹

Prof. Dr. Miguel Angel Chávez-Fumagalli²

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt³

Prof. Dr. Rory Cristiane Fortes Brito³

¹ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

² Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Perú

³ Insituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

SUPORTE FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Nano-Biofarmacêutica
- COLTEC/UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças e colocar em meu caminho pessoas tão dedicadas, solícitas, especiais e indispensáveis durante esse processo.

Agradeço aos meus familiares, em especial meus pais, minhas irmãs e melhores amigas: Ju e Rê, ao Frederico e sua família que se tornou minha, e à Vivi por terem me apoiado tanto e por confiarem e se orgulharem tanto de mim, muitas vezes até mais que eu mesma.

Agradeço à Dra. Sandra Lyon, minha eterna Mestre e exemplo, a quem, visando seguir seus admiráveis passos, decidi tomar o caminho da Dermatologia, da docência e da pesquisa. Igualmente, agradeço à Dra Ana Cláudia Lyon por ser também exemplo claro de dedicação ao estudo e por ter depositado sua confiança em mim.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, por ter depositado em mim sua confiança, por toda a ajuda, paciência e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, que tanto me ensinaram e que tornaram todo esse processo muito mais leve e divertido, em especial à minha amiga-mãe Grasielle, que tanto me apoiou num momento de muita dificuldade e também à Camila e à Débora que foram surpresas maravilhosas nesse caminho.

E, por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente nesse trabalho, as quais eu não citei, mas que foram essenciais para essa conquista.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

O tratamento contra a leishmaniose visceral (LV) apresenta problemas principalmente relacionados à toxicidade dos fármacos, o regime prolongado de tratamento e/ou custo elevado. Nesse contexto, a identificação de novos agentes antileishmaniais se faz urgente. A acarbose (ACA) é um inibidor específico da enzima glucosidase e é usada no tratamento do diabetes. Estudos preliminares desenvolvidos por nosso grupo identificaram uma atividade antileishmanial da ACA contra a espécie *Leishmania infantum*, principal espécie causadora de LV nas Américas. No presente estudo, a ACA foi avaliada por meio de diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* contra essa espécie do parasito *Leishmania*. Resultados mostraram uma ação direta *in vitro* da ACA contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e baixa toxicidade em células de mamíferos. O mecanismo de ação foi baseado em alterações da mitocôndria dos parasitos. Estudos *in vivo* mostraram que a ACA livre e principalmente quando incorporada em um sistema de micelas poliméricas baseadas em Pluronic® F127 (ACA/Mic) foram eficazes no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*. Os animais tratados apresentaram reduções significativas na carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos drenantes, quando comparados aos grupos controle. Uma resposta humoral e celular antileishmanial do tipo Th1 foi encontrada nos animais tratados, sendo baseada em níveis elevados de IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, nitrito e anticorpos antileishmaniais do isotipo IgG2a. Uma baixa toxicidade orgânica foi também encontrada. O tratamento com ACA/Mic apresentou melhores resultados, quando comparados ao uso da ACA livre ou miltefosina, testada como droga controle. Em conclusão, os dados sugerem que ACA/Mic poderia ser considerada em estudos futuros para o tratamento contra a LV.

Palavras-chave: tratamento; leishmaniose visceral; reposicionamento de medicamentos; toxicidade; acarbose; miltefosina.

ABSTRACT

Treatment against visceral leishmaniasis (VL) is mainly hampered by drug toxicity, long treatment regimens and/or high costs. Thus, the identification of novel and low-cost antileishmanial agents is urgent. Acarbose (ACA) is a specific inhibitor of glucosidase-like proteins, which has been used for treating diabetes. In the present study, we show that this molecule also presents *in vitro* and *in vivo* specific antileishmanial activity against *Leishmania infantum*. Results showed an *in vitro* direct action against *L. infantum* promastigotes and amastigotes, and low toxicity to mammalian cells. In addition, *in vivo* experiments performed using free ACA or incorporated in a Pluronic® F127-based polymeric micelle system called ACA/Mic proved effective for the treatment of *L. infantum*-infected BALB/c mice. Treated animals presented significant reductions in the parasite load in their spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes when compared to the controls, as well as development of antileishmanial Th1-type humoral and cellular responses based on high levels of IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, nitrite and IgG2a isotype antibodies. In addition, ACA-treated animals suffered from no or low organ toxicity. Treatment with ACA/Mic outperformed treatments using either Miltefosine or free ACA based on parasitological and immunological evaluations performed one- and 15-days post-therapy. In conclusion, data suggest that the ACA/Mic is a potential therapeutic agent against *L. infantum* and merits further consideration for VL treatment.

Keywords: treatment; drug repositioning; acarbose; visceral leishmaniasis; miltefosine; *Leishmania infantum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência mundial da leishmaniose visceral em 2016.....	18
Figura 2 - Número de casos e incidência de leishmaniose visceral.....	19
Figura 3 - Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i>	21
Figura 4 - Estrutura química da acarbose.....	29
Figura 5 – Representação esquemática de uma micela.....	31
Figura 6 – Estrutura química do Polaxâmero 407.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
ACA	Acarbose
ACA/Mic	Acarbose micelar
ALT	Alanina aminotransferase
AmpB	Anfotericina B
ANOVA	One-way analysis of variance
AST	Aspartato aminotransferase
B/Mic	Micelas vazias
BSA	Albumina sérica bovina
BM	Medula óssea
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC ₅₀	Inibição da viabilidade de 50% de macrófagos
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
CK-MB	Fração cérebro-muscular da enzima creatina kinase
DAT	Teste de aglutinação direta
dLN	Linfonodo drenante
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBS	Soro fetal bovino
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócita e monocítica
H ₂ DCFDA	Cell permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IC ₅₀	Inibição da viabilidade de 50% de <i>Leishmania</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Microlitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PF127	Pluronic F-127®
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	PBS com 0.05% de Tween 20
qPCR	PCR quantitativo
RBC₅₀	Inibição de 50% de células vermelhas
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPMI	Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute”
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLA	Extrato solúvel antigênico de <i>Leishmania</i>

RT-PCR	PCR em tempo real
TGF-β	Fator de transformação de crescimento tipo beta
Th	T helper
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Epidemiologia das leishmanioses.....	18
2.2 Etiologia e ciclo biológico de Leishmania.....	19
2.3 Manifestações clínicas das Leishmanioses	21
2.4 Imunologia das leishmanioses.....	23
2.5 Diagnóstico das leishmanioses.....	24
2.6 Tratamento das leishmanioses	25
3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS.....	28
3.1 Acarbose.....	28
4 NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIA	30
4.1 Micelas.....	30
4.2 Poloxâmero P407 (Pluronic F-127®)	31
5 Objetivos	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos	36
6 METODOLOGIA E RESULTADOS	37
6.1 Artigo 1	37
7 CONCLUSÃO.....	71
8 PERSPECTIVAS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de evolução aguda ou crônica, causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo endêmicas em 98 países no mundo. Devido à magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica, elas são consideradas um importante problema de saúde pública (GREVELINK e LERNER, 1996; NAKAMURA *et al.*, 2006). Ainda, as leishmanioses são consideradas como uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes na atualidade. (WHO, 2010).

A doença pode-se apresentar de várias formas clínicas, embora a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) sejam os grandes grupos desse complexo de doenças. Na apresentação clínica da LT, a doença pode-se apresentar das seguintes formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) ou cutâneo-mucosa, leishmaniose disseminada, leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose recidiva cútis (WHO, 2014). Já a forma visceral é a forma clínica mais grave da doença, devido às frequentes complicações sistêmicas incluindo dano hepático, esplênico, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e potencial de evolução letal, quando aguda e não tratada (OMS, 2018; KEVRIC *et al.*, 2015).

O tratamento para as leishmanioses possui limitações que reduzem a adesão e a continuidade do mesmo por parte dos pacientes, tais como o longo tempo de duração, as vias de administração dos medicamentos e a toxicidade observada pelos fármacos de primeira escolha (OSORIO *et al.*, 2007). Frente a essas dificuldades, o abandono ou a interrupção do tratamento por parte dos pacientes é comum, o que leva ao aumento da resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (CROFT e COOMBS, 2003; VÉLEZ *et al.*, 2009). Além disso, cresce o número de relatos do aumento do número de casos de recidiva à doença, que vem sendo observado em diversas regiões do mundo (VÉLEZ *et al.*, 2009). Devido a isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a busca por novos produtos e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo para se tratar as leishmanioses.

A investigação de moléculas sintéticas que apresentam ações biológicas outras, que não antileishmanial, isto é, o reposicionamento de fármacos, pode ser efetuada para avaliar seu potencial contra o parasito *Leishmania*, sendo considerado

um campo de pesquisa inovador para pesquisa por novos produtos farmacêuticos (Cheuka *et al.*, 2016). Outra estratégia adotada é o emprego de *delivery* de fármacos, como a formulação de sistemas micelares capazes de transportá-los de interesse aos principais órgãos acometidos pelo parasito. Visando a abordagem de reposicionamento de fármacos para o tratamento da LV, o presente estudo avaliou a molécula acarbose (ACA), um inibidor específico da enzima glucosidase que é utilizada no tratamento contra o diabetes mellitus tipo 2, como potencial agente antileishmanial em relação a espécie *Leishmania infantum*, quando aplicada em sua forma livre ou incorporada em um sistema de micelas composto por Poloxâmero P407 (V.V. Andrade-Neto *et al.*, 2018; K. He *et al.*, 2014). Assim, objetivamos o desenvolvimento de um produto efetivo contra os parasitos, mas seguro e com baixo custo e que já tenha ação aprovada pelo Ministério da Saúde para uso no homem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças endêmicas em mais de 98 países (ALVAR *et al.*, 2012), estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (OMS, 2017). Em 2017, 94% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Nas Américas, no período de 2001 a 2017 foram reportados pela OMS 940.396 casos novos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) e 59.769 casos de leishmaniose visceral (LV).

O Brasil é responsável por cerca de 90% dos casos registrados de LV em toda a América Latina (OMS, 2017), sendo a distribuição espacial destes casos demonstrada pela **Figura 1**.

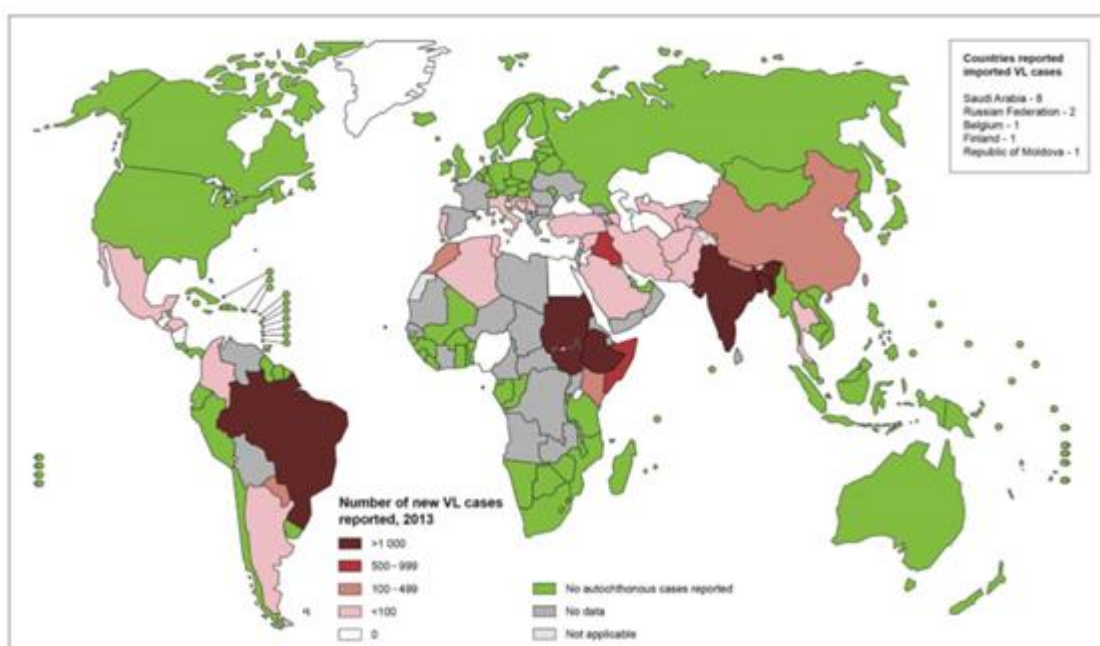


Figura 1: Incidência mundial da Leishmaniose visceral em 2016.

Fonte: WHO, 2018.

A LV pode ser antroponótica ou zoonótica, sendo a primeira causada por *L. donovani* e é encontrada no subcontinente indiano e africano, tendo o ser humano como o principal reservatório de transmissão. A LV zoonótica é causada por *L. infantum* e é encontrada no Mediterrâneo, Oriente Médio e no Brasil, sendo o cão doméstico o hospedeiro mais importante (DESJEUX, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

No Brasil, a LV se destaca nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, conforme apresentando na Figura 2. (OPAS, 2017)

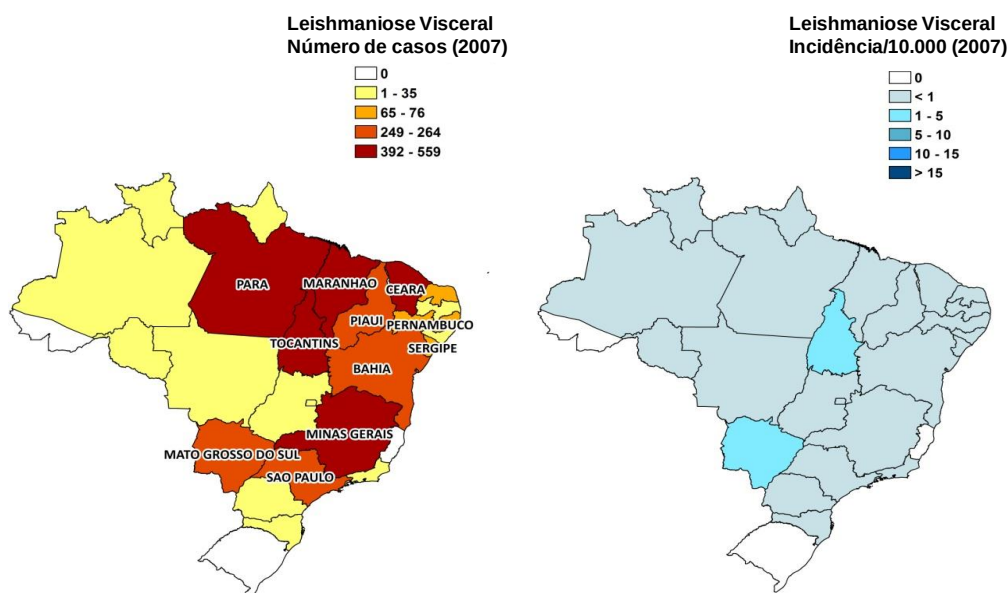


Figura 2 - Número de casos e Incidência de Leishmaniose Visceral.
Fonte: ALVAR *et al.*, 2012.

A LV acomete principalmente a população de menor classe econômica, estando também associada à desnutrição, ao deslocamento e migração, condições precárias de habitação, falta de recursos e também da condição do sistema imunológico dos pacientes. Sendo assim, conclui-se que a diferença na evolução da doença relaciona-se a espécie do parasito e à suscetibilidade do seu hospedeiro, podendo variar entre as distintas manifestações da doença e seus graus de acometimento. (ASHFORD, 2000)

2.2 Etiologia e ciclo biológico de Leishmania

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente ao Sub-Reino *Protozoa*, Filo *Sarcomastigophora*, Ordem *Kinetoplastida* e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor do parasito é um inseto da Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Sub-Família *Phlebotominae*, pertencente aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo. Já nas Américas a *Lutzomyia* é o principal vetor, com cerca de 2 a 3 mm de comprimento (GRIMALDI e TESH, 1993; SACKS e KAMHAWI, 2001; MOTA *et al.*, 2011;

STRAZZULLA et al., 2013; WHO, 2015). A hematofagia é restrita às fêmeas, sendo esse hábito de suma importância para maturação dos seus ovários (BARATA et al., 2005).

Cerca de 500 espécies de flebótomos são conhecidas, embora aproximadamente apenas 30 sejam capazes de transmitir os parasitos (WHO, 2015). Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular; e a forma amastigota, que é intracelular obrigatória, altamente infectiva, sem movimentos e são encontradas no interior de células fagocíticas, tais como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células de Langherans (GRIMALDI e TESH, 1993; ASHFORD, 2000; BASANO e CAMARGO, 2004). As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 µm, flagelo livre, com núcleo único e têm o cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo. As amastigotas têm um corpo de forma ovoidal, que mede entre 2,1 e 3,2 µm e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero (ASHFORD, 2000; BASANO e CAMARGO, 2004).

A transmissão do parasito para o inseto se dá quando a fêmea dele se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, na sua grande maioria os cães. Esse ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas do parasito, que em seu intestino vão se tornar promastigotas procíclicas e migram para o trato digestivo médio e anterior, onde se multiplicam e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, colonizando então as glândulas salivares do vetor. Quando o vetor regurgita o sangue, as formas promastigotas metacíclicas são depositadas na pele do homem. Então, as células do sistema fagocítico-mononuclear, principalmente os macrófagos migram para o local e fagocitam os parasitos (KAYE e SCOTT, 2011; RIBEIRO-GOMES e SACKS, 2012; 24 HANDLER et al., 2015). No interior dos macrófagos, o parasito transforma-se em amastigotas e replica-se por divisão binária, resultando no rompimento das células infectadas e na liberação dos parasitos, iniciando uma infecção no mamífero. A proliferação também pode ocorrer em outras células de diferentes tecidos, como nos linfonodos, baço e fígado (REITHINGER et al., 2007). A Figura 3 resume o ciclo biológico do agente infeccioso das leishmanioses.

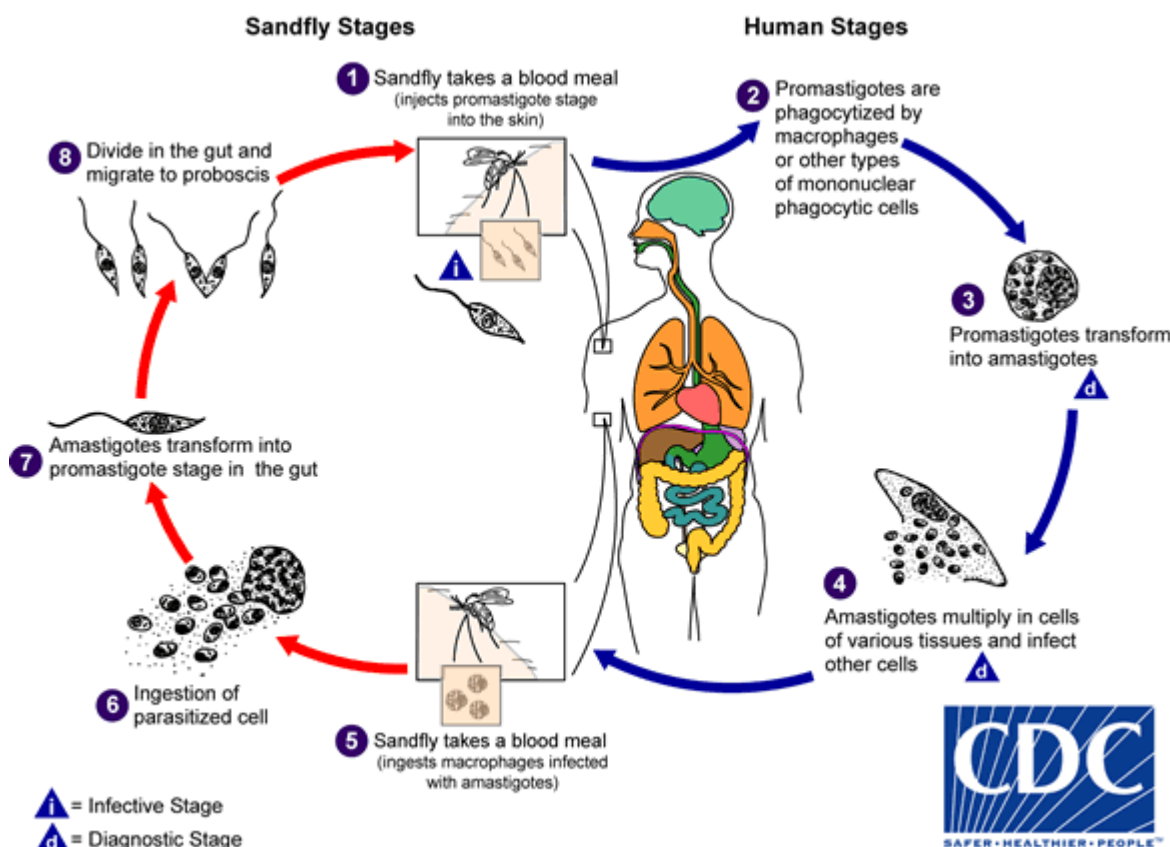


Figura 3: Ciclo biológico do parasito *Leishmania*.

Fonte: CDC, 2019.

2.3 Manifestações clínicas das Leishmanioses

A evolução das leishmanioses determina-se por fatores relacionados tanto ao hospedeiro devido a suas particularidades genéticas e imunológicas quanto por fatores relacionados ao parasito como sua virulência e a espécie do vetor (LOCKSLEY *et al.*, 1999; TRIPATHI e SINGH e NAIK, 2007). Com isso, essa interação pode levar desde o desenvolvimento de formas assintomáticas às formas letais e graves (KANE *et al.*, 2001). De modo geral, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos clínicos: LT e LV.

No grupo das LT, pode haver variadas formas e graus de acometimento cutâneo no hospedeiro. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum desse grupo, normalmente apresentando-se como uma úlcera cutânea oval, com bordas bem delimitadas, em moldura, elevadas, base indurada com fundo limpo e granuloso. Sua principal característica é o fato de ser indolor. Pode evoluir ou não

com resolução espontânea, deixando apenas cicatriz. Ainda, a forma cutânea pode apresentar recidivas com reaparecimento da doença nos sítios de lesões de LT previamente cicatrizadas, a forma chamada recidiva cútis (RC) (SCHUBACH *et al.*, 1998).

A forma disseminada da leishmaniose (LD) é caracterizada pelo aparecimento de lesões múltiplas e polimórficas em todo o tegumento, que são provavelmente causadas por disseminação hematogênica ou linfática dos parasitos. As lesões podem ser acneicfomes, ulceradas e papulosas, nodulares e de aspecto queiloideano, sendo a mucosa afetada em aproximadamente 29% dos casos (TURETZ; MACHADO; KO, 2002; GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose mucosa ou cutâneomucosa (LM) ocorre geralmente meses ou anos após a ocorrência da LC. Os sintomas podem abranger obstrução, epistaxe, rinorreia, que evolui para formação de crostas, e sangramento. Tais sintomas ocorrem devido a forma mucosa ser altamente destrutiva, ulcerativa e agressiva em vias aéreas superiores e, ocasionalmente, inferiores devido a hiperreativação da resposta Th1 do paciente. Isso culmina em destruição e atrofia da mucosa e até mesmo destruição e desabamento de septo nasal, dando ao paciente o característico nariz de Tapir. Raramente, as mucosas oculares, de órgãos genitais e ânus também podem ser atingidas (WEIGLE e SARAIVA, 1996).

A forma cutânea disseminada é menos comum e caracteriza-se por pápulas e/ou placas múltiplas que acometem o tegumento do indivíduo. O agente etiológico no Brasil é a espécie *L. amazonensis* e configura-se em uma forma clínica grave e resistente ao tratamento, piorando o seu prognóstico (Mendonça *et al.*, 2004).

Por fim, a LV é a forma clínica mais grave da doença, devido às frequentes complicações e potencial de evoluir para óbito, se não tratada (OMS, 2018). Pode-se apresentar de forma assintomática, aguda ou crônica. Os pacientes assintomáticos desenvolvem sintomas inespecíficos, como febre baixa, tosse seca, diarreia, sudorese e pode evoluir de forma espontânea para a cura ou pode manter sem evolução clínica durante a vida, embora esteja infectado. Na forma aguda, pode-se observar febre alta, palidez e hepatoesplenomegalia. Por fim, há a forma crônica, conhecido como Calazar, a qual é a forma clássica da doença, com evolução prolongada apresentando-se com febre intermitente, perda importante de peso progressiva, hepatoesplenomegalia importante, anasarca, dispneia devido a

compressão pulmonar pelos órgãos acometidos, cefaleia, mialgia, adnamia, dentre outros sintomas (ASHFORD, 2000).

2.4 Imunologia das leishmanioses

Os neutrófilos são as primeiras células que os parasitos têm contato no local da inoculação durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo e as células do sistema imune inato, incluindo as células *Natural killer*, têm sido reveladas de fundamental importância no curso da infecção (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Após driblar a resposta imune inata do paciente e se manter no indivíduo, as infecções por *Leishmania* irão levar a ativações específicas da resposta imune do hospedeiro. Há uma expansão clonal de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006).

A resposta imune de resistência à infecção por *Leishmania* é mediada principalmente por uma resposta do tipo celular, e o resultado clínico é dependente principalmente de linfócitos Th1, que é mediada principalmente por interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucinas 2 e 12 (IL-2 e IL-12, respectivamente). A produção dessas citocinas e interleucinas está então relacionada a uma boa evolução da doença e combate eficiente aos parasitos, como na forma LCL e até mesmo a cura espontânea.

Já uma resposta do tipo Th2 com de produção de interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10, respectivamente) e TGF- β confere susceptibilidade e progressão da doença no hospedeiro. Estas respostas imunes respondem pelo espectro clínico diversificado, principalmente das formas mais graves como a visceral, disseminada e difusa. Em outro aspecto, A LM demonstra uma resposta mista, mas com uma predominância do perfil Th1, que pode explicar tanto a sua atividade inflamatória agressiva e destrutiva como a sua cronicidade sendo atribuída a resposta Th2 (AFONSO; SCOTT, 1993).

Na resposta Th1, os macrófagos estimulados com IFN- γ e IL-12 vão passar a expressar níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e espécies reativas de oxigênio (ROS). A síntese de óxido nítrico (NO) por iNOS é essencial para a eliminação de parasitos de macrófagos (DIEFENBACH *et al.*, 1998). Já no

perfil de resposta Th2, os macrófagos serão estimulados com IL-4, IL-10 e TGF- β , e, com isso, expressarão altos níveis de arginase e são denominados como "alternativamente ativados" (DIEFENBACH *et al.*, 1998), desencadeando uma resposta não eficiente aos parasitos e fazendo uma autoregulação da resposta ativa Th1 contra os mesmos, desencadeando a perpetuação da infecção no indivíduo.

Um indicativo da geração da resposta imune do tipo Th1 ou Th2 em camundongos BALB/c, diz respeito à produção dos isotipos de imunoglobulinas (IgG's) IgG1 e IgG2a. Conclui-se então que os linfócitos T atuam sobre linfócitos B induzindo a mudança dos isotipos dos anticorpos IgG. Nesta linhagem de camundongos, a citocina IL-4, induz, preferencialmente, a produção de IgG1, enquanto que o IFN- γ induz à produção de IgG2a (DOHERTY *et al.*, 1993). Sendo assim, conclui-se que o controle da forma visceral da doença está associado ao padrão de resposta do tipo Th1, com produção das citocinas IFN- γ ou TNF- α que culmina na ativação dos macrófagos e matam o parasito das espécies *L. infantum* e *L. donovani* (PEARSON e STEIGBIGEL, 1981; MURRAY e RUBIN e ROTHERMEL, 1983).

2.5 Diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico das leishmanioses é clínico e apoiado em exames complementares que buscam a detecção dos parasitos por meio de exame de esfregaços corados ou biópsias das lesões da pele e cultura dos parasitos. Deve haver também a percepção epidemiológica, na qual se deve buscar relação entre os sinais e sintomas da doença com as áreas endêmicas, o que constitui uma ferramenta útil para confirmar o diagnóstico (Junqueira-Pedras *et al.*, 2003).

De modo geral, o diagnóstico clínico da mesma é um desafio, uma vez que a doença abrange um grande espectro de características clínicas (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A doença cutânea tem inúmeros diagnósticos diferenciais como as "PLECT"s, paracoccidioidomicose, esporotricose, cromoblastomicose, tuberculose cutânea e carcinoma espinocelular. Já como diagnóstico diferencial da forma visceral inclui-se a malária, esquistossomose, tripanossomose, tuberculose e kwashiorkor (SINGH, 2006).

O método parasitológico com a técnica de *imprinting* de raspado dérmico ou de material de biópsia é o padrão-ouro da forma cutânea e muito conclusivo, tendo

alta especificidade, porém é um método invasivo e sua sensibilidade é variável, pois depende da qualidade da amostra colhida e é um exame técnico dependente (SUNDAR e RAI, 2002; TAVARES *et al.*, 2003). Existem técnicas moleculares mais sensíveis para procurar o DNA do parasito como o PCR e o RT-PCR, mas tem o inconveniente de serem caros e exigirem equipamentos sofisticados, limitando assim seu alcance (SINGH e SUNDAR, 2015). Testes sorológicos são ideais para a detecção de anticorpos antileishmaniais em soros de pacientes infectados, devido à sua simplicidade e baixo custo, e são considerados menos invasivos (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

Como consequência, métodos como imunofluorescência indireta (IFI), teste de aglutinação direta (DAT), ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de aglutinação em látex e testes imunocromatográficos têm sido empregados com relativo sucesso (SCHWARZ, N.G. *et al.*, 2017) apesar de que seu desempenho por vezes é dificultado por sensibilidade e/ou especificidade variável, levando à ocorrência de falso-negativos ou falso-positivos (MATLASHEWSKI, G. *et al.* 2013).

2.6 Tratamento das leishmanioses

Apesar de as leishmanioses terem sido reconhecidas pela ciência médica há mais de um século, ainda há pouca disponibilidade de terapias eficazes e acessíveis, apesar dos esforços em curso e a enorme carga da doença nos países em desenvolvimento (KLING; KÖRNER, 2013). Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são os fármacos de primeira linha usados para tratar a leishmaniose tegumentar causada por diferentes espécies no Brasil. Eles foram introduzidos para esse fim pela primeira vez em 1945 e continuam a ser eficazes para algumas formas de leishmaniose. Infelizmente, um aumento na falha deste medicamento tem sido documentado em várias regiões do mundo. Este fármaco está disponível como uma das duas formulações: antimoniato de meglumina (GLUCANTIME[®]) e estibogluconato de sódio (PENTOSTAM[®]), o último não disponível no Brasil. Os principais efeitos colaterais dos antimoniais são artralgia e mialgia, porém, efeitos colaterais graves relacionados à cardiotoxicidade ou insuficiência renal podem ocorrer principalmente em pacientes idosos. O uso deste medicamento não é indicado durante a gravidez.

A eficácia dos Sb^v varia de acordo com a região geográfica, com a espécie de *Leishmania* envolvida e apresentação clínica da doença (GOTO; LINDOSO, 2010). Nas formas mais localizadas e menos graves, a infiltração intralesional na derme ou na base da lesão com antimoniais pentavalentes pode ser tentada. No entanto, o procedimento pode ser relativamente doloroso e necessita de ser feito a cada uma ou duas semanas, de três a oito vezes, a depender da evolução da úlcera. O índice de cura com esse procedimento é 75%. Se não efetivo, deve-se considerar a abordagem sistêmica (PISCOPO e AZZOPARDI, 2006).

Nos casos em que o tratamento preconizado com antimoniais pentavalentes não é efetivo ou não pode ser empregado, agentes de segunda escolha podem ser empregados, tais como a Anfotericina B (AmpB), que apesar de mais cara e de difícil acesso, apresenta melhores resultados (SANTOS *et al.*, 2008). Além disso, produzem inúmeros efeitos colaterais e suas formulações possuem preços elevados como é observado na AmpB e AmpB lipossomal. As reações adversas da AmpB, tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça, ocorrem frequentemente e estão relacionadas, principalmente, à infusão do fármaco. Alterações cardiovasculares, como hipotensão, hipertensão e arritmias cardíacas são observadas com menor frequência. Hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) são associados com administrações repetidas (FILIPPIN; SOUZA, 2008).

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, geralmente administrado por via intramuscular. Foi desenvolvida na década de 1960 como um agente leishmanicida, mas permaneceu negligenciada até a década de 1980, quando formulações tópicas contendo paramomicina (15%) mais cloreto de metilbenzetônio (12%) se mostraram eficazes para leishmaniose cutânea (CROFT; COOMBS, 2003). A dor leve no local da injeção é o evento adverso mais comum (55%). A ototoxicidade reversível ocorre em 2% dos pacientes. A toxicidade renal é rara. Alguns doentes podem desenvolver hepatotoxicidade, indicada por concentrações elevadas de enzimas hepáticas (WHO, 2010).

A pentamidina é administrada por via intramuscular ou, de preferência, por infusão intravenosa. Efeitos adversos graves como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal limitam a sua utilização (SANTOS *et al.*, 2008). Apesar de existirem 34 alternativas de tratamento tanto para LV, quanto para

LT, nenhum desses medicamentos foi desenvolvido com a finalidade exclusiva de eliminar o parasito do gênero *Leishmania*.

A miltefosina é um dos medicamentos de segunda escolha. Este medicamento é uma alquilfosfocolina que tem atividade contra células cancerígenas e várias espécies de parasitos, assim como bactérias e fungos. Foi originalmente desenvolvida como um fármaco anticancerígeno, tendo sido aprovado na Índia como o primeiro tratamento oral para as leishmanioses (PEYRON *et al.*, 2005; NAGLE *et al.*, 2014). Entretanto, apresenta eventos adversos que incluem problemas gastrointestinais, hepato e nefrotoxicidade. Outra limitação é a teratogenicidade da miltefosina, desta forma, mulheres em idade fértil precisam tomar contraceptivos de forma assistida e durante o tratamento, além de um adicional de três meses após, devido à meia-vida longa do mesmo (PANDEY *et al.*, 2009; DORLO *et al.*, 2012; NAGLE *et al.*, 2014). Outro problema enfrentado no tratamento com a miltefosina é o aparecimento de resistência de algumas espécies de *Leishmania* à sua ação farmacológica (DORLO *et al.*, 2012).

3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo medicamento é longo, caro e altamente regulamentado, já que cada produto deve-se apresentar seguro e eficaz, sendo que tais benefícios devem abranger todos os grupos raciais e étnicos, bem como diferentes faixas etárias para ser considerado um bom medicamento (EICHBORN *et al.*, 2011). Em um estudo publicado em novembro de 2014, realizado pelo Centro para o estudo e desenvolvimento de fármaco (Tufts Center for the Study of Drug Development), estimou que para trazer um único fármaco novo para o mercado, o custo médio é de US \$ 2,6 bilhões em um período de tempo de aproximadamente 15 anos (DiMASI, 2014). A investigação de moléculas purificadas que apresentam ações biológicas, que não a antileishmanial, isto é, o reposicionamento de fármacos, pode ser realizado para avaliar seu potencial uso contra a doença, sendo considerado um campo de pesquisa promissor para pesquisa por novos produtos farmacêuticos (Cheuka *et al.*, 2016).

3.1 Acarbose

A acarbose (ACA) (**Figura 4**) atua especificamente na diminuição pós-prandial da glicose, tendo como alvo principal a α -glucosidase no intestino delgado, onde ela cataboliza carboidratos complexos não absorvíveis em monossacarídeos absorvíveis. A ACA é um inibidor competitivo e reversível da glucosidase da borda da escova do intestino delgado, que bloqueia a degradação do amido e da sacarose e atrasa a absorção de glicose e frutose no intestino delgado superior (K. He *et al.*, 2014). Este composto reduz a hemoglobina glicada em 0,5-1% em pacientes com diabetes tipo 2, em monoterapia ou em combinação com outros antidiabéticos. Nos pacientes com diagnóstico de intolerância à glicose, o mesmo reduz a incidência de diabetes primodiagnóstico em 36,4%. Além disso, tem efeitos benéficos sobre o excesso de peso, reduz a pressão sanguínea e os triglicerídeos e regula negativamente biomarcadores de inflamação de baixo grau. No estudo de Hanefeld *et. al*, para prevenir o diabetes não insulínico, a ACA reduziu significativamente a progressão da doença, incidência de eventos cardiovasculares e hipertensão recém-diagnosticada.

A ACA é um medicamento seguro, embora em aproximadamente 30% dos pacientes, pode causar queixas gastrointestinais devido ao seu modo de ação, que na maioria das vezes desaparece em até um a 2 meses. Estudos clínicos e de vigilância revelaram que o tratamento com acarbose está associado a muitos poucos efeitos colaterais graves (Hanefeld *et al.*, 2008). Os efeitos colaterais mais comuns relatados até o momento são distúrbios gastrointestinais leves a moderados, como flatulência, distensão abdominal, diarreia e dispepsia, que surgem da fermentação de carboidratos não digeridos por bactérias colônicas no intestino grosso. Os distúrbios gastrointestinais são sempre transitórios e moderados se o tratamento for iniciado em doses baixas e aumentado gradualmente (K. He *et al.*, 2014).

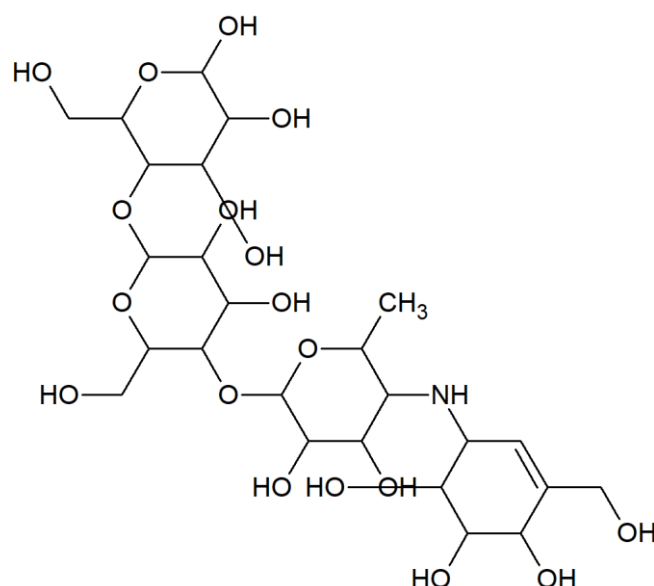


Figura 4: Estrutura química da acarbose.

4 NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIA

O uso da nanotecnologia aplicada à medicina tem mostrado avanços significativos no diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças. As aplicações utilizadas na medicina incluem a administração de fármacos, diagnósticos *in vitro* como *in vivo*, a formulação de nutracêuticos e a otimização de materiais biocompatíveis (DUNCAN, 2003; DE JONG; BORM, 2008). A aplicação da nanotecnologia para fins terapêuticos e diagnósticos foi denominada “Nanomedicina” pelo National Institute of Health nos Estados Unidos (WONG *et al.*, 2012).

Novos sistemas de *delivery*, isto é, de liberação controlada dos medicamentos, tais como lipossomas, nanopartículas e micelas proporcionam uma maior eficácia e segurança em relação aos efeitos colaterais. Quando os fármacos são armazenados e transportados em conjugação com tais veículos, eles podem reduzir a dose e as reações adversas das formulações convencionais (DE MENEZES *et al.*, 2015).

Ribeiro *et al.* produziram em 2014 nanopartículas de quitosana e condroitina contendo AmpB no tratamento *in vivo* de LT e concluiu-se que as nanopartículas poderiam ser aplicadas como um sistema de administração alternativo de AmpB, mantendo sua elevada atividade contra a *Leishmania*, mas reduzindo por níveis significativos a sua toxicidade, em comparação com quando é administrado numa forma livre. A composição de tais nanopartículas pode variar. Os materiais podem ser de origem biológica (fosfolípidos, lípidos, ácido láctico, dextrano e quitosano), ou apresentar características químicas (polímeros, carbono, sílica e metais) (DE JONG; BORM, 2008).

4.1 Micelas

Nanopartículas poliméricas são utilizadas para encapsular alguns fármacos ou substâncias. Tal método proporciona a liberação controlada e melhora da biodisponibilidade e eficaz diminuição da toxicidade do medicamento. Estas estruturas são em sua maioria mais biocompatíveis, menos imunogênica, atoxicidade e biodegradabilidade. Nessas composições, os medicamentos ou substâncias utilizadas podem estar envolvidas na matriz polimérica ou adsorvidas na superfície da micela (MENDES *et al.*, 2017).

As micelas (**Figura 5**) possuem uma estrutura do tipo “núcleo-casca” em que a parte hidrofóbica é localizada em sua porção interior e a parte hidrofílica está na porção da sua estrutura. Isso facilita a solubilização de moléculas insolúveis em água ou parcialmente solúveis. Ao mesmo tempo, esta estrutura as protege contra a degradação química e do metabolismo precoce das substâncias armazenadas por agentes biológicos (WEI *et al.*, 2006; HYUN *et al.*, 2008).

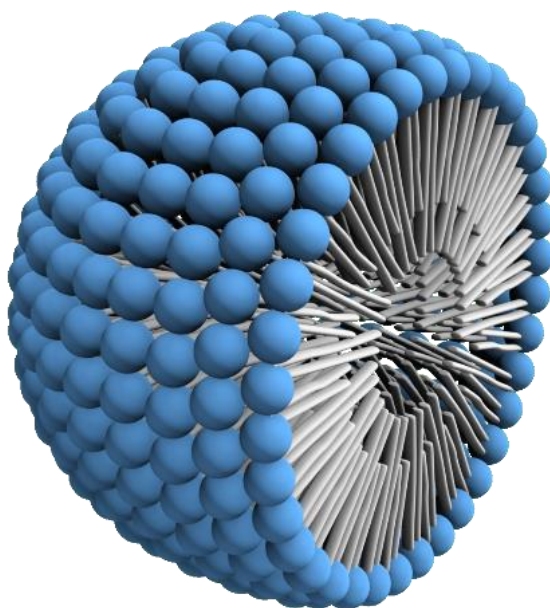


Figura 5: Representação esquemática de uma micela

4.2 Poloxâmero P407 (Pluronic F-127®)

O Pluronic F-127® (PF127) (**Figura 6**) é um copolímero de bloco que compreende segmentos de oxietileno e de oxipropileno (LERCHE W, 1972). Este polímero tem uma baixa toxicidade, excelente compatibilidade com produtos químicos e uma alta solubilidade. As concentrações de PF127 de 20% ou mais em solução aquosa exibem a propriedade única de tornar-se um gel reversível conforme a alteração térmica. Estas propriedades fazem do PF127 um veículo atrativo para liberação controlada (ZHANG *et al.*, 2002). Dentre os vários estudos já realizados com o PF127, podemos citar um sistema de libertação de fármaco para oftálmicos (BOCHOTA *et al.*, 1998; DESAI; BLANCHARD, 1998), parenteral (MORIKAWA *et al.*, 1987; PEC; WOUT; JOHNSTON, 1992; PAAVOLA *et al.*, 1995; BANGA; K., 1997)

e uso percutâneo (BARICHELO *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1994; SUH; MATTHEW, 2000).

Nosso grupo de pesquisa já utilizou o Pluronic F127 em sistemas micelares anteriormente no tratamento contra as leishmanioses. No estudo desenvolvido por Ribeiro *et al.* em 2014, um sistema de nanopartículas contendo quitosana e condroitina mais AmpB foi desenvolvido e utilizado para o tratamento contra a LT. Foi encontrado que o sistema diminuiu a toxicidade da AmpB, mas sem causar perda de sua ação antileishmanial. Dessa forma, foi proposto que tais nanopartículas poderiam ser aplicadas como um sistema de administração alternativo de AmpB, mantendo sua elevada atividade contra a *Leishmania*, mas reduzindo por níveis significativos a sua toxicidade, em comparação com a forma livre.

Mendonça *et al.* (2014) desenvolveram um sistema micelar formado por Polaxâmero 407 contendo AmpB para o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. O sistema mostrou eficácia contra a infecção, além de baixos níveis de danos celulares no hospedeiro, demonstrando a baixa toxicidade do sistema micelar usando o mesmo. Nesse estudo, comparou-se a AmpB em sistema micelar, AmpB em sua forma livre e solução salina como controle. Quando os três grupos tratados foram comparados, camundongos tratados com AmpB micelar apresentaram redução de 45% no tamanho médio das lesões em relação aos grupos tratados com AmpB livre, os quais reduziram 37% das lesões. A carga parasitária foi avaliada em fragmentos de tecido infectado, linfonodos drenantes, fígado e baço dos animais. Nos resultados, observou-se que todos os animais tratados apresentaram reduções na concentração de parasitos quando comparados aos grupos controle. Porém, quando os grupos tratados foram comparados, os camundongos tratados com a forma micelar de Polaxâmero 407 mais AmpB apresentaram melhor resposta terapêutica contra a infecção, quando comparados ao grupo AmpB livre.

Mendonça *et al.* (2019) testaram um derivado de quinolina denominado 2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-desoxi- β -l-galactopiranosiloxi) 1,4-naftoquinona ou Flau-A contra a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c. A quinolina foi incorporada ao Poloxâmero 407 e a eficácia terapêutica do composto foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, comparando com o uso de AmpB livre e em sua forma lipossomal. O percentual de redução do diâmetro da

lesão nos grupos AmpB, AmpB lipossomal, Flau-A e Flau-A micelar foi de 21%, 24%, 43% e 51%, respectivamente, quando comparados ao grupo salina, e de 18%, 21%, 41% e 49%, respectivamente, quando comparados ao grupo com micelas sozinhas. Os camundongos tratados com Flau-A e Flau-A micelar apresentaram as reduções mais significativas no diâmetro médio das lesões, da ordem de 28% e 37%, respectivamente, quando comparados ao grupo AmpB, e de 25% e 35%, respectivamente, quando comparados ao grupo AmpB lipossomal. Na avaliação da carga parasitária, os grupos de camundongos tratados com AmpB, AmpB lipossomal, Flau-A e Flau-A micelar também apresentaram reduções significativas no parasitismo tecidual e orgânico, quando comparados aos controles, sendo as reduções mais significativas encontradas nos grupos Flau-A e Flau-A micelar.

Mais estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que derivados de quinolinas apresentam atividade antileishmanial *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de importantes espécies de *Leishmania* encontradas no mundo (DUARTE, *et al.*, 2016). Além disso, quando foi incorporada a um sistema de *delivery* baseado em Poloxâmero 407, este produto mostrou-se eficaz no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ou *L. infantum* (DUARTE, *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016).

No estudo de Tavares *et al.* em 2019, a substância clioquinol foi incorporada em um sistema de micelas poliméricas baseadas em Poloxâmero 407, e sua atividade antileishmanial foi avaliada *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. O mesmo mostrou que a composição micelar foi eficaz na redução da carga parasitária nos animais. Nele, o clioquinol em sua forma micelar exibiu forte e seletiva atividade antileishmanial *in vitro* e *in vivo* contra promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Este efeito foi acompanhado por baixa toxicidade contra macrófagos murinos e hemáceas humanas, não sendo observados efeitos tóxicos em nenhuma das concentrações testadas. Além disso, o índice de seletividade do clioquinol foi maior que o da AmpB. O tratamento com esse composto induziu aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio em todas as concentrações testadas e alterou a integridade da membrana plasmática em *Leishmania*. Dessa forma, o sistema de micelas poliméricas formadas com base em Poloxâmero P407 poderia constituir em uma possível alternativa para a incorporação de moléculas antileishmaniais e melhoria das condições de tratamento contra as leishmanioses.

Em resumo, as quinonas são uma classe conhecida de moléculas exibindo atividades biológicas distintas, como funções antitumorais, moluscicidas, bactericidas, fungicidas e tripanocidas (REZENDE *et al.*, 2013). Estudos têm mostrado também o uso desta classe de moléculas contra *Leishmania*. No entanto, o desenvolvimento posterior desses compostos tem sido dificultado, devido à ausência de experimentos *in vivo* ou devido à sua baixa eficácia, quando são testados como terapêuticos em modelos de mamíferos.

Além disso, estudos de farmacocinética do clioquinol por via oral em humanos são escassos. Um estudo que administrou doses de 250 a 1500 mg de clioquinol pela via oral em 6 indivíduos sadios apresentou um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 11 a 14 horas e um pico de concentração em torno de 4 horas após a administração (JACK e RIESS, 1973). No homem, o clioquinol apresentou menor metabolização na formação dos conjugados (CHEN *et al.*, 1976). Por esse motivo, atualmente o clioquinol é utilizado em formulações tópicas como o Vioform®, Hidrocorte®, dentre muitos outros, que são antifúngicos tópicos.

Em contrapartida, a ACA, como dito anteriormente, é um medicamento de uso oral já utilizado e disponível no mercado como medicação hipoglicemiante e já tem sua segurança em humanos bem estabelecida pelos órgãos reguladores, com baixos índices de efeitos colaterais graves (Hanefeld *et al.*, 2008). Além disso, diferentemente das substâncias supracitadas, em um dos nossos estudos, a ACA, juntamente com o miglitol, outra medicação hipoglicemiante, foi testada *in silico*. O estudo demonstrou uma proteína hipotética do parasito, que foi funcionalmente semelhante a glucosidase-like, alvo de tais medicações. Essa proteína foi associada à rede metabólica da via de biossíntese do N-Glycan em *Leishmania* e a ACA foi considerada alvo potencial contra tal proteína (CHÁVEZ-FUMEGALLI *et al.*, 2019). Dessa maneira, tais fatos tornam a ACA uma opção segura para ser avaliada contra a infecção por *Leishmania*.

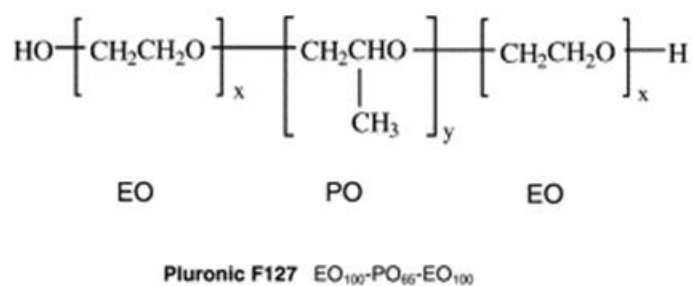


Figura 6: Estrutura química do Poloxâmero 407.
 Fonte: KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002

5 Objetivos

5.1 Objetivo geral

Avaliar a acarbose (ACA) incorporada em um sistema de micelas poliméricas formadas a partir de Poloxâmero P407 quanto à sua ação antileishmanial contra a espécie *Leishmania infantum*, como estratégia para o tratamento contra a leishmaniose visceral.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antileishmanial *in vitro* da ACA contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade utilizando macrófagos murinos e hemácias humanas;
- Avaliar o mecanismo de ação da ACA em *Leishmania infantum*;
- Preparar um sistema de micelas a partir do Poloxâmero P407 carregadas com ACA e tratar camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* com a ACA pura ou em sua forma micelar. Verificar a eficácia do tratamento por meio da avaliação da carga parasitária no baço, medula óssea, linfonodos drenantes e fígado dos animais;
- Avaliar a eficácia do tratamento por meio da resposta celular desenvolvida em dois períodos de tempo distintos após o tratamento, por meio da produção das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, GM-CSF e óxido nítrico pelos esplenócitos dos animais estimulados *in vitro*;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* da ACA e de sua forma micelar a partir da dosagem de CK-MB, ALT e AST nos soros dos animais.

6 METODOLOGIA E RESULTADOS

As seções de Metodologia e Resultados serão apresentadas sob a forma de artigo científico, que foi diretamente derivado do projeto; conforme permitido pela Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

6.1 Artigo 1

Title

Acarbose presents *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity against *Leishmania infantum* species and is a promising therapeutic agent against visceral leishmaniasis

Authors

Rafaella R. Costa^a, João A. Oliveira-da-Silva^a, Thiago A.R. Reis^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Débora V.C. Mendonça^a, Camila S. Freitas^a, Daniela P. Lage^a, Vívian T. Martins^a, Luciana M.R. Antinarelli^b, Amanda S. Machado^a, Raquel S. Bandeira^a, Fernanda Ludolf^a, Thaís T.O. Santos^a, Rory C.F. Brito^c, Maria V. Humbert^d, Daniel Menezes-Souza^{a,e}, Mariana C. Duarte^{a,e}, Miguel A. Chávez-Fumagalli^f, Bruno M. Roatt^c, Elaine S. Coimbra^b, Eduardo A.F. Coelho^{a,e,*}

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^b Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

^c Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

^d Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton, England, SO16 6YD

^e Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^f Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Perú.

***Corresponding author**

Address: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Phone and fax number: +55 31 3409 4983

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Abstract

Treatment against visceral leishmaniasis (VL) is mainly hampered by drug toxicity, long treatment regimens and/or high costs. Thus, the identification of novel and low-cost antileishmanial agents is urgent. Acarbose (ACA) is a specific inhibitor of glucosidase-like proteins, which has been used for treating diabetes. In the present study, we show that this molecule also presents *in vitro* and *in vivo* specific antileishmanial activity against *Leishmania infantum*. Results showed an *in vitro* direct action against *L. infantum* promastigotes and amastigotes, and low toxicity to mammalian cells. In addition, *in vivo* experiments performed using free ACA or incorporated in a Pluronic® F127-based polymeric micelle system called ACA/Mic proved effective for the treatment of *L. infantum*-infected BALB/c mice. Treated animals presented significant reductions in the parasite load in their spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes when compared to the controls, as well as development of antileishmanial Th1-type humoral and cellular responses based on high levels of IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, nitrite and IgG2a isotype antibodies. In addition, ACA-treated animals suffered from no or low organ toxicity. Treatment with ACA/Mic outperformed treatments using either Miltefosine or free ACA based on parasitological and immunological evaluations performed one- and 15-days post-therapy. In conclusion, data suggest that the ACA/Mic is a potential therapeutic agent against *L. infantum* and merits further consideration for VL treatment.

Keywords: Treatment; drug repositioning; acarbose; visceral leishmaniasis; miltefosine; *Leishmania infantum*.

1. Introduction

Leishmaniasis is a disease complex found in 98 countries in the world, where approximately 380 million people are susceptible to the infection by the *Leishmania* parasites, which are obligate intracellular pathogens able to invade phagocytic cells of the mammalian hosts (WHO, 2018). Approximately 20 parasite species cause disease in humans, and clinical manifestations include visceral and tegumentary leishmaniasis (Grimaldi and Tesh, 1993; Burza and Croft, 2018). Visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania infantum* and *L. donovani* species, being fever, anemia, wasting, hepatosplenomegaly and patient's immune suppression the clinical manifestations of active disease. VL is almost always fatal, if acute and left untreated (Araújo *et al.*, 2012).

Treatment against VL relies on the use of pentavalent antimonials. However, drug toxicity, parenteral administration and long therapy regimens represent significant hindrances to effective treatment. In addition, parasite resistance has been reported, being this a main cause for relapse of infections in affected patients (Sundar and Singh, 2018; Chakravarty and Sundar, 2019). Alternatively to pentavalent antimony compounds, Amphotericin B (AmpB) has been extensively used to treat VL. However, although it is highly effective against parasites, it is also toxic to the patient, causing nephrotoxicity, hypokalemia and myocarditis, among others (Mohamed-Ahmed *et al.*, 2012). AmpB-based liposomal formulations have minimized the side effects caused by treatment with the free drug, but its high cost prevents it from becoming a widespread therapeutic agent (Sundar *et al.*, 2019). Paromomycin has also been used against *Leishmania* infection; however, this drug targets a relatively restricted range of *Leishmania* species and parasite resistance has been reported (Rahman *et al.*, 2017). Moreover, Miltefosine, which was originally described as an anti-tumor agent, presents antileishmanial potential against distinct parasite species by inhibiting the biosynthesis of the glycosyl-phosphatidyl-inositol receptor, a key molecule for *Leishmania* intracellular survival (Zhang *et al.*, 2018; Mbui *et al.*, 2019; Pipers *et al.*, 2019). However, Miltefosine causes teratogenicity and parasitic resistance to this drug has also been described, thus limiting its clinical application (Sundar and Singh, 2018).

In this context, the identification of new antileishmanial agents is a challenge that remains to be overcome. Since drug discovery is a long and expensive process, drug repositioning could be considered and evaluations using compounds with other

known biological functions should be performed (Andrade-Neto *et al.*, 2018). The immunity for VL has been studied and resistance against infection involves the induction of the T-helper 1 (Th1) cell response based on the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, with concomitant production of cytokines such as IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, among others. On the other hand, susceptibility to infection is related to the production of Th2-type profile cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-10, among others (Kedzierski and Evans, 2014; Dayakar *et al.*, 2019). Based on this understanding about the immunological mechanisms of leishmaniasis, distinct agents have been evaluated regarding their antileishmanial immunity; however, little progress has been made beyond experimental stage (Wang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2017).

Acarbose (ACA) is a specific inhibitor of glucosidase-like proteins. Administration of ACA causes significant decrease in the plasma glucose levels of patients and thus, this drug has been used effectively to treat type-2-diabetes (Hanefeld and Schaper, 2008; He *et al.*, 2014). In the present study, ACA was evaluated *in vitro* and *in vivo* against *L. infantum* species. The molecule was incorporated into a Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelle system (ACA/Mic) and used to treat *L. infantum* infected mice, in comparison to treatment with free ACA. Miltefosine was used as a control drug. Parasitological and immunological evaluations were performed one and 15 days post-treatment. Results showed that treatment using the ACA/Mic composition induced to a polarized and specific antileishmanial Th1-type immune response, which was reflected by significant reductions in the parasite load in the spleen, liver, bone marrow (BM) and draining lymph nodes (dLNs) of the treated animals.

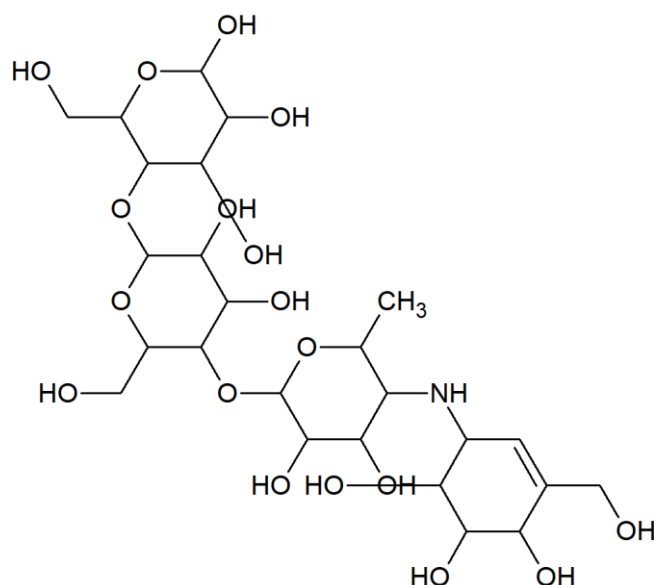


Fig. 1: Chemical structure of the acarbose.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, parasite and animals

Miltefosine ($C_{21}H_{46}NO_4P$), Acarbose (ACA, $C_{25}H_{43}NO_{18}$), Amphotericin B (AmpB, $C_{47}H_{73}NO_{17}$) and Poloxamer 407 (Pluronic® F127) were purchased from Sigma-Aldrich (catalog numbers: 58066-85-6, 56180-94-0, 1397-89-3 and 16758, respectively; St. Louis, USA). *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) was grown in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, USA), supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA) and 20 mM L-glutamine pH 7.4 at 24°C (Coelho *et al.*, 2003). Female BALB/c mice (8 weeks old) were purchased from the Institute of Biological Sciences of Federal University of Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), and kept under specific pathogen-free conditions. The study was approved by the Committee for the Ethical Handling of Research Animals of UFMG (protocol number 085/2017).

2.2. *In vitro* antileishmanial activity

The 50% *Leishmania* inhibitory concentration (IC_{50}) was evaluated by incubating *L. infantum* stationary promastigotes in the absence or presence of ACA (0 to 100.0 μ g/mL) or AmpB (0 to 10.0 μ g/mL), which was used as a control, in 96-well culture plates (Nunc, Nunclon, Roskilde, Denmark) for 48 h at 24°C. Cell viability was

assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, USA) method. The optical density (OD) values were read in a microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, San Jose, CA, USA) at 570 nm. Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and IC₅₀ values were calculated by sigmoidal regression of the dose-response curves (Tavares *et al.*, 2018).

2.3. Cytotoxicity assay

ACA cytotoxicity to murine macrophages (CC₅₀) and red blood cells (RBC₅₀) was evaluated by determining the compound's concentration required for 50% reduction of cell viability. In brief, murine macrophages (5×10^5 cells) or a 5% (v/v) human red blood cells suspension were incubated in the absence or presence of ACA (0 to 100.0 µg/mL) or AmpB (0 to 10.0 µg/mL) for 48 h (macrophages) or 1 h (red cells) at 37°C in 5% CO₂. Macrophage viability was assessed by MTT method. The human red blood cells suspension was centrifuged for 10 min at 1,000 × *g* and lysis percentage was determined spectrophotometrically at 570 nm. The absence of (blank) or 100% hemolysis were determined by replacing ACA or AmpB with an equal volume of phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) or distilled water, respectively. CC₅₀ and RBC₅₀ values were calculated by sigmoidal regression of dose-response curves with Microsoft Excel software (version 10.0) (Mendonça *et al.*, 2019).

2.4. Treatment of infected macrophages

ACA efficacy for treatment of infected macrophages was evaluated *in vitro* by incubating cells (5×10^5) in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 20 mM L-glutamine, pH 7.4, for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Parasites were then added to the wells and cultures (10 parasites per one macrophage) were incubated for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Free parasites were removed by extensive washing with medium and infected macrophages were left untreated or treated with ACA (0, 2.5, 5.0 and 10.0 µg/mL) or AmpB (0, 0.25, 0.5 and 1.0 µg/mL) for 48 h at 24°C in 5% CO₂. After fixation with 4% (w/v) paraformaldehyde, cells were washed and stained with Giemsa. Percentage of infected macrophages, infectiveness reduction and number of amastigotes per macrophage were determined by counting 200 cells, in triplicate, using an optical microscope (Mendonça *et al.*, 2019).

2.5. Inhibition of infection by pre-treatment of *L. infantum* parasites

Stationary promastigotes (5×10^6 cells) were incubated in the absence or presence of ACA (0, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) or AmpB (0, 0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$), for 4 h at 24°C. Parasites were washed three times in RPMI 1640, quantified and used to infect macrophages at a ratio of 10 parasites per one macrophage for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . After fixation with 4% (w/v) paraformaldehyde, cells were washed and stained with Giemsa. Percentage of infected macrophages, reduction of infection and number of amastigotes per macrophage were determined by counting 200 cells, in triplicate, using an optical microscope (Tavares *et al.*, 2020).

2.6. Evaluation of mitochondrial membrane potential

Stationary promastigotes (10^7 cells) were cultured in the absence or presence of ACA (0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to one and two times the IC_{50} values, respectively) for 24 h at 25°C. Parasites were washed in PBS and incubated with 500 nM MitoTracker Red CM-H2XROS (Invitrogen, USA) for 30 min in the dark and at room temperature. After washing twice with PBS, samples were added to a black 96-well plate and fluorescence intensity was measured using a fluorometer (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with excitation and emission wavelengths of 528 nm and 600 nm, respectively. Parasites incubated with carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP; 5.0 μM , Sigma-Aldrich, USA) for 10 min were used as control (Tavares *et al.*, 2020).

1.1. Production of reactive oxygen species (ROS)

Stationary promastigotes (10^7 cells) were cultured in the absence or presence of ACA (0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to one and two times the IC_{50} values, respectively) for 24 h at 25°C. Parasites were incubated with 20 μM cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA ; Sigma-Aldrich, USA) for 30 min in the dark and at room temperature. Fluorescence intensity was measured in a spectrofluorometer (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, USA) with excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. H_2O_2 -treated parasites (4.0 mM) were used as control (Tavares *et al.*, 2020).

1.2. Evaluation of lipid accumulation in the parasites

Stationary promastigotes (10^7 cells) were cultured in the absence or presence of ACA (0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to one and two times the IC_{50} values, respectively) for 24 h at 25°C . Parasites were incubated with Nile Red (1.0 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich, USA) for 30 min in the dark and at room temperature. Fluorescence intensity was measured in a spectrofluorometer (Varioskan® Flash, Thermo Scientific, USA), with excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively (Antinarelli *et al.*, 2018).

2.9. Preparation of ACA-containing micelles

ACA-containing micelles (ACA/Mic) were prepared as described previously (Mendonça *et al.*, 2019). Briefly, Poloxamer 407 (18% w/w) was diluted in PBS under magnetic agitation for 18 h at 4°C . 8 mg of ACA were added to 500 μL of dichloromethane and solubilized using a vortex. The mixture was then added to the Poloxamer solution under vigorous magnetic agitation in an ice bath, until a viscous emulsion was obtained. The dichloromethane was evaporated using rotary evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland) and the ACA-containing micelles were obtained as a transparent yellow gel at room temperature. Empty micelles were similarly prepared using 18% w/w Poloxamer 407 without the addition of ACA.

1.3. Infection and treatment

Mice ($n=12$ per group) were infected subcutaneously with 10^7 *L. infantum* stationary promastigotes. 60 days post-infection, infected mice were administered with saline alone (50 μL , PBS); empty micelles (50 μL , B/Mic: 10 mg/kg body weight); Miltefosine (50 μL , 2 mg/kg body weight); free ACA (50 μL , 5 mg/kg body weight); or ACA-containing micelles (50 μL , ACA/Mic: 5 mg/kg body weight). Except for Miltefosine which was administered by oral route, all other compounds were administered subcutaneously, every two days for a period of 10 days. Half of the animals were euthanized one and 15 days post-treatment, after which parasitological and immunological evaluations were performed.

2.11. Evaluation of murine humoral response

Anti-parasite IgG1 and IgG2a isotype antibody levels were evaluated by ELISA assay in sera samples from infected and treated mice collected one and 15 days post-treatment. Briefly, *L. infantum* Soluble *Leishmania* Antigen (SLA) was used as the coating antigen (1.0 µg/well) and sera samples were diluted 1:100 in PBS-T (PBS plus 0.05% (v/v) Tween 20). Anti-mouse IgG1 and IgG2a horseradish-peroxidase conjugated antibodies (Sigma-Aldrich, USA) were used both at a 1:10,000 dilution in PBS-T. Reactions were developed in the presence of H₂O₂, ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer pH 5.0 for 30 min and in the dark. Next, reactions were stopped by addition of 2 N H₂SO₄, after which OD values were measured at 492 nm in an ELISA microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada).

2.12. Analysis of the cellular profile

Spleens of infected and treated mice were collected one and 15 days post-treatment, when splenocytes were plated in 24-well plates (Nunc) and incubated in DMEM supplemented with 20% FBS and 20 mM L-glutamine at a pH 7.4. Cells (5 x 10⁶/mL) were non-stimulated (medium) or stimulated with *L. infantum* SLA (50 µg/mL) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12p70 and GM-CSF levels were measured in the culture supernatants by capture ELISA assay (BD Pharmingen®, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Nitrite production was also evaluated in the same cellular supernatants by Griess reaction. The source of IFN-γ production was evaluated in Miltefosine-, ACA- or ACA/Mic-treated mice. For this, stimulated splenocytes were cultured in the absence or presence of anti-CD4 (GK 1.5) or anti-CD8 (53-6.7) monoclonal antibodies (5 µg each; Pharmingen®, USA), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Cell supernatants were then collected and used to quantify IFN-γ cytokine. Appropriate isotype-matched controls [rat IgG2a (R35-95) and rat IgG2b (95-1)] were used (Mendonça et al., 2019). IFN-γ, TNF-α and IL-10-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cell profiles were evaluated in Miltefosine-, ACA- or ACA/Mic-treated mice by flow cytometry technique using the animals' spleens collected 15 days post-treatment. Briefly, spleen cells (5 x 10⁶/mL) were cultured in RPMI 1640 medium and then either stimulated with SLA (50 µg/mL) or left untreated for 48 h at 37°C in 5% CO₂.

2.13. Immunophenotyping of spleen cell subsets and intracellular cytokines

IFN- γ , TNF- α and IL-10 cytokines were also evaluated in the spleen cells of the infected animals by flow cytometry technique. For this, splenocytes were incubated in the presence of 200 μ L of RPMI medium in 96-well round-bottom culture plates at a concentration of 5×10^5 cells per well. Cells were non-stimulated (medium) or stimulated with *L. infantum* SLA (20.0 μ g/mL) for 48 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were incubated with phorbol myristate acetate (5.0 ng/mL), ionomycin (1.0 μ g/mL) or lipopolysaccharide (0.01 μ g/ μ L), diluted in complete RPMI medium. Afterwards, cells were treated with Brefeldin A (10.0 μ g/mL) for 4 h, and stained with Fixable Viability Stain 450 (BD Biosciences) for 15 min at room temperature, followed by anti-mouse CD3 FITC (clone 145.2C11), anti-mouse CD4 BV605 (clone RM4-5) or anti-mouse CD8 α PerCP Cy5.5 (clone 53-6.7) (BD Biosciences Bioscience, USA), for 30 min at room temperature (Brito et al., 2020). Next, fixation (FACS fixing solution), washing and permeabilization were performed. Permeabilized cells were then stained with anti-mouse IFN- γ AF700 (clone XMG1.2), anti-mouse TNF- α PE-Cy7 (clone LG.3A10) or anti-mouse IL-10 APC (JES5-16E) (BD Biosciences Bioscience, USA). Cells were acquired (100,000 events) on LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) using FACSDiva software. For analysis in FlowJo software, dead cells were excluded after FVS450 stain and viable cells were gated for stained CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells and intracellular cytokine production. Results were expressed as percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the SLA-stimulated cultures.

2.14. Estimation of parasite load

Parasite load was estimated in spleen, liver, bone marrow (BM) and draining lymph nodes (dLN) of infected and treated animals, one- and 15-days post-treatment. Briefly, organs were macerated in a glass tissue grinder using sterile PBS, and tissue debris was removed by centrifugation at $150 \times g$. Cells were then concentrated by centrifugation at $2,000 \times g$, pellets were resuspended in 1 mL of complete Schneider's medium and serially diluted using the same medium (10^{-1} to 10^{-12} dilutions). Each sample was plated in triplicate and analyzed after 7 days of having set up the cultures, at 24°C. Results were expressed as the negative log of the titer (the dilution corresponding to the last positive well) adjusted per milligram of organ. The parasitism in the animals' spleens was evaluated also by quantitative PCR

(qPCR) technique (Antonia et al., 2018). Briefly, spleen DNA was extracted using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation) and resuspended in milli-Q water. The parasite load was estimated using specific primers to amplify *L. infantum* kDNA: *Forward* (5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3') and *Reverse* (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'). Mouse gene encoding for β -actin (*Forward*: 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3'; *Reverse*: 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3') was used as a control. Standard curves for kDNA and β -actin were obtained from DNA extracted from 1×10^8 parasites and 1×10^8 peritoneal macrophages, respectively, under the same experimental conditions used to extract the samples. Reactions were processed and analyzed in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (96 wells-plate; Applied Biosystems) using 2x SYBRTM Select Master Mix (5 μ L; Applied Biosystems), with 2 mM of each primer (1 μ L) and 4 μ L of DNA (25 ng/ μ L). Samples were incubated at 95°C for 10 min, and submitted to 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. For each cycle, fluorescence data were collected. Results were calculated by interpolation from a calibration curve, which was run in parallel to the samples, performed in duplicate and expressed as the number of *L. infantum* organisms per total DNA.

2.15. *In vivo* toxicity

ACA toxicity was evaluated *in vivo* in the infected and treated mice, by means of dosage of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes, which were used as hepatic damage markers, and of creatine kinase muscle brain fraction (CK-MB), which was used as a cardiac damage marker. The analyses were performed using commercial kits (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte) according to the manufacturer's instructions.

2.16. Statistical analysis

IC₅₀, CC₅₀ and RBC₅₀ values were calculated by dose-response curves using Microsoft Excel software (version 10.0) and plotted in GraphPad Prism 5.03. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test for comparison between the groups. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation for each group. Two independent experiments were performed and similar results were observed. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *In vitro* biological assays

ACA antileishmanial activity was evaluated *in vitro* against *L. infantum* species. AmpB was used as a control drug. Results showed IC₅₀ values of 0.47±0.1 and 0.11±0.03 µg/mL, when ACA and AmpB were used, respectively (Table 1). CC₅₀ and RBC₅₀ values were 265.4±16.5 µg/mL and 454.6±13.4 µg/mL for ACA, and 0.92±0.13 µg/mL and 12.2±1.6 µg/mL for AmpB, respectively, with corresponding Selectivity Index values of 564.7 and 8.4. Treatment of infected macrophages showed infectiveness reduction of 87.4% and 67.5%, when ACA and AmpB were used at concentrations of 10.0 and 1.0 µg/mL, respectively (Table 2). Inhibition of infection using pre-treated parasites showed similar infectiveness reduction levels of 87.7% (ACA) and 73.3% (AmpB) (Table 3).

Compound	IC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	SI	RBC ₅₀ (µg/mL)
Acarbose	0.47±0.1	265.4±16.5	564.7	454.6±13.4
Amphotericin B	0.11±0.03	0.92±0.13	8.4	12.2±1.6

Table 1. *In vitro* biological activity. *L. infantum* stationary promastigotes were incubated with ACA (0 to 100 µg/mL) or AmpB (0 to 10.0 µg/mL) for 48 h at 24°C. Cell viability was analyzed by MTT method and 50% *Leishmania* inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by sigmoidal regression of the corresponding dose-response curve. Similarly, murine macrophages were incubated with ACA (0 to 100 µg/mL) or AmpB (0 to 10.0 µg/mL), and 50% macrophage inhibitory concentration (CC₅₀) was determined by sigmoidal regression of the corresponding dose-response curve. Selectivity index (SI) was calculated as the ratio between CC₅₀ and IC₅₀ values. 50% inhibition of human red cells (RBC₅₀) viability was calculated by incubating a 5% red cells suspension with ACA (0 to 100.0 µg/mL) or AmpB (0 to 10.0 µg/mL) for 1 h at 37°C in 5% CO₂. Lysis percentage was evaluated spectrophotometrically, and the absence (blank) or 100% of hemolysis were determined by replacing ACA for an equal volume of PBS or distilled water, respectively. Results are expressed as mean ± standard deviation.

Products	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Percentage of infected macrophages after Treatment	Infectiveness reduction (%)	Number of amastigotes per macrophage
Acarbose	10.0	9.4 $\pm$ 0.7	87.4	0.1 $\pm$ 0
	5.0	19.8 $\pm$ 2.6	73.4	0.5 $\pm$ 0.2
	2.5	33.4 $\pm$ 5.4	55.1	1.4 $\pm$ 0.3
	0	74.4 $\pm$ 5.5	(-)	3.3 $\pm$ 0.6
Amphotericin B	1.0	24.2 $\pm$ 3.0	67.5	1.1 $\pm$ 0.2
	0.50	33.6 $\pm$ 4.0	54.8	1.8 $\pm$ 0.3
	0.25	49.9 $\pm$ 3.5	32.9	2.6 $\pm$ 0.6
	0	74.4 $\pm$ 5.5	(-)	3.3 $\pm$ 0.6

Table 2. Treatment of infected macrophages. Murine macrophages (5×10^5 cells) were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 20 mM L-glutamine at pH 7.4, for 24 h at 37°C in 5% CO₂. *L. infantum* stationary promastigotes were used to infect the macrophages (at a ratio of 10 parasites per one macrophage) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Free parasites were removed by extensive washing with medium and infected macrophages were treated with ACA (0, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) or AmpB (0, 0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 24°C in 5% CO₂. Percentage of infected macrophages, infectiveness reduction and the number of recovered amastigotes per cell were determined by counting 200 macrophages, in triplicate. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Products	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Infection percentage using pre-treated parasites	Infectiveness reduction (%)	Number of amastigotes per macrophage
Acarbose	10.0	8.7 $\pm$ 1.0	87.7	0.2 $\pm$ 0
	5.0	16.6 $\pm$ 3.0	76.6	0.6 $\pm$ 0.3
	2.5	30.1 $\pm$ 4.0	57.5	1.3 $\pm$ 0.4
	0	70.8 $\pm$ 4.2	(-)	3.4 $\pm$ 0.4
Amphotericin B	1.0	18.9 $\pm$ 2.6	73.3	0.9 $\pm$ 0.4
	0.50	28.9 $\pm$ 3.6	59.2	1.3 $\pm$ 0.4
	0.25	44.5 $\pm$ 4.0	37.1	2.3 $\pm$ 0.5
	0	70.8 $\pm$ 4.2	(-)	3.4 $\pm$ 0.4

Table 3. Inhibition of infection by pre-treatment of parasites. *L. infantum* stationary promastigotes (5×10^6 cells) were pre-treated with ACA (0, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) or AmpB (0, 0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$) for 4 h at 24°C. Pre-treated parasites were washed in RPMI 1640 and used to infect murine macrophages (at a ratio of 10 parasites per one macrophage) for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Percentage of infected macrophages, infectiveness reduction and the number of recovered amastigotes per cell were determined by counting 200 macrophages, in triplicate. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

The proof of concept for the mechanism of action of ACA as an inhibitory drug was evaluated in *L. infantum*. Results showed that the molecule induced 36.9% and 33.6% reduction in the parasite mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) when used at concentrations of 0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 2A). FCCP-treated parasites used as control presented 47.7% reduction. Induction of oxidative stress was also observed in ACA-treated parasites, which was reflected by a 92.9% and 124.1% increase in reactive oxygen species (ROS) production when ACA was used at concentrations of 0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Fig. 2B). H₂O₂-treated parasites, used as a positive control, showed an increase in ROS production of 145.6%. Furthermore, treatment with ACA (0.35 and 0.70 $\mu\text{g/mL}$) induced a significant increase in the accumulation of lipid bodies in the order of 55.9% and 87.0%, respectively (Fig. 3).

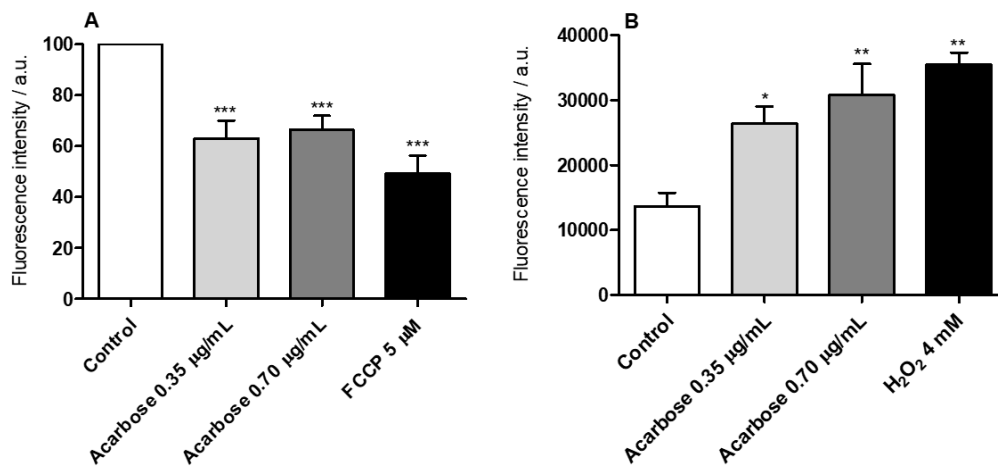


Fig. 2. Evaluation of *Leishmania* mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS production. *L. infantum* stationary promastigotes (10^7 cells) were cultured in the absence (control) or presence of ACA (0.35 $\mu\text{g/mL}$ and 0.70 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to one and two times the IC_{50} value, respectively) for 24 h at 25°C. Cells were incubated for 30 min in the dark with 500 nM MitoTracker to evaluate $\Delta\Psi_m$ or with 20 μM cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) to evaluate ROS production. In both cases, after having washed twice with PBS, treated promastigotes were transferred to a black 96-well plate and fluorescence intensity was measured using a fluorometer. FCCP (5.0 μM) and H₂O₂ (4.0 mM) were used as positive controls, respectively. Percentage reduction of $\Delta\Psi_m$ after treatment, compared to non-treated parasites (control, considered as 100%) (A). ROS production values after treatment, compared to non-treated parasites as control (B). Results are expressed as arbitrary units (a.u.) of fluorescence intensity and correspond to the mean of three independent experiments. (*), (**) and (***) indicate statistically significant difference in relation to the non-treated control ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively).

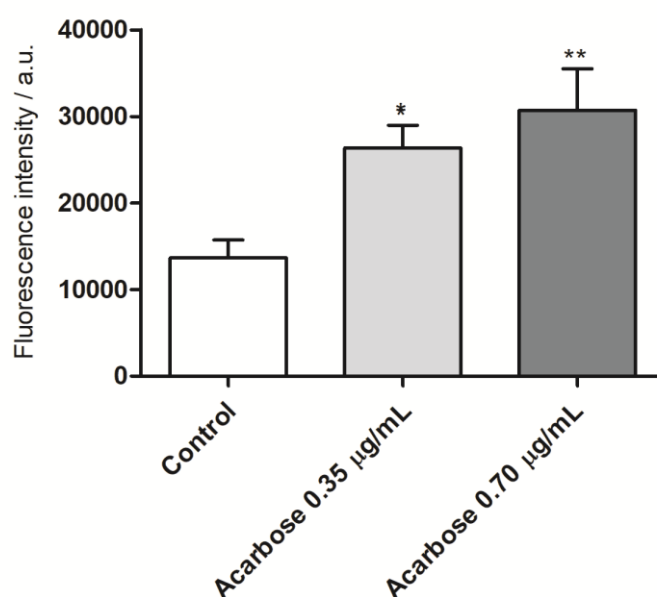


Fig. 3. Accumulation of lipid bodies in *L. infantum* promastigotes. *L. infantum* stationary promastigotes (10^7 cells) were cultured in the absence or presence of ACA (0.35 and 0.70 µg/mL, corresponding to one and two times the IC_{50} values, respectively) for 24 h at 25°C. Parasites were incubated with Nile Red (1.0 µg/mL) for 30 min in the dark and at room temperature. Fluorescence intensity was measured in a spectrofluorometer, with excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. (*) and (**) indicate statistically significant difference in relation to the non-treated control ($P < 0.1$ and $P < 0.01$, respectively).

3.2. Analysis of murine humoral responses developed after infection and treatment

Anti-*Leishmania* humoral response of infected and treated mice was evaluated one and 15 days post-therapy. Results showed that Miltefosine, ACA or ACA/Mic-treated mice presented significantly higher levels of anti-parasite IgG2a antibody, when compared to IgG1 levels. On the contrary, saline- and B/Mic-treated groups produced significantly higher levels of antileishmanial IgG1 antibody (Fig. 4). Similar results were observed one and 15 days post-therapy, suggesting development of a sustained humoral response profile after treatment of infection.

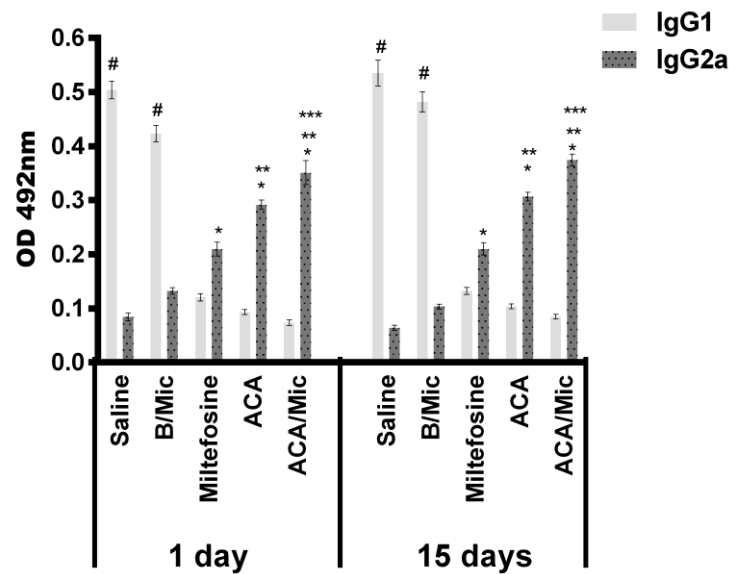


Fig. 4. Evaluation of antibody response by indirect ELISA technique. Sera samples were collected from *L. infantum*-infected and treated mice, one and 15 days post-therapy. Levels of antileishmanial IgG1 and IgG2a isotype antibodies were measured by ELISA assay. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$). (#) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine, ACA and ACA/Mic groups ($P < 0.05$).

3.3. Analysis of cellular response after treatment

Cellular response of infected and treated mice was evaluated one and 15 days post-treatment by means of dosage of Th1 and Th2-type profile cytokines. Results obtained one day after treatment showed that spleen cells from Miltefosine, ACA or ACA/Mic-treated mice produced significantly higher levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, as well as low IL-4 and IL-10 levels. On the other hand, saline- and B/Mic-treated mice groups produced significantly higher levels of antileishmanial IL-4 and IL-10 cytokines (Fig. 5). Nitrite production was also evaluated in the cell supernatant, and results showed that treatment with Miltefosine, ACA or ACA/Mic induced increased levels of this molecule, when compared to the control groups (Fig. 6). To evaluate the origin of IFN- γ production, anti-CD4 or anti-CD8 antibody was added to the cultures. Significant reduction in the levels of this cytokine suggested that both T cell subtypes were important for the immunological response developed after

treatment (Fig. 7). A flow cytometry assay showed also that Miltefosine-, ACA- or ACA/Mic-treated mice presented significantly higher levels of IFN- γ - and TNF- α -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells, when compared to the controls. Conversely, mice groups receiving saline or B/Mic presented significantly higher IL-10-producing CD4⁺ T cell levels (Fig. 8).

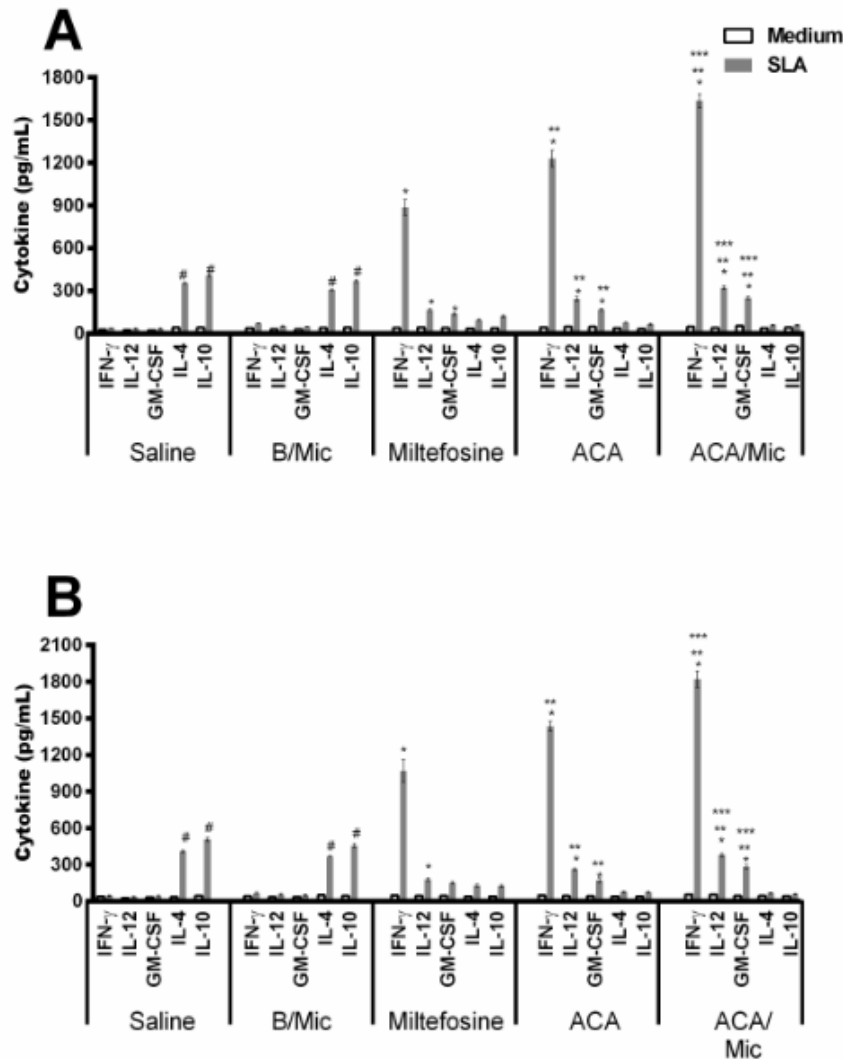


Fig. 5. Analysis of cytokine production by capture ELISA technique. *L. infantum*-infected mice (n=12 per group) were treated with saline, B/Mic, Miltefosine, ACA or ACA/Mic and their spleens removed, one and 15 days post-therapy. Spleen cells were non-stimulated (medium) or stimulated with *L. infantum* SLA (50 μ g/mL), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p70 and GM-CSF levels were measured in the cell supernatants by capture ELISA, one (A) and 15 (B) days post-treatment. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group

($P < 0.05$). (#) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine, ACA and ACA/Mic groups ($P < 0.05$).

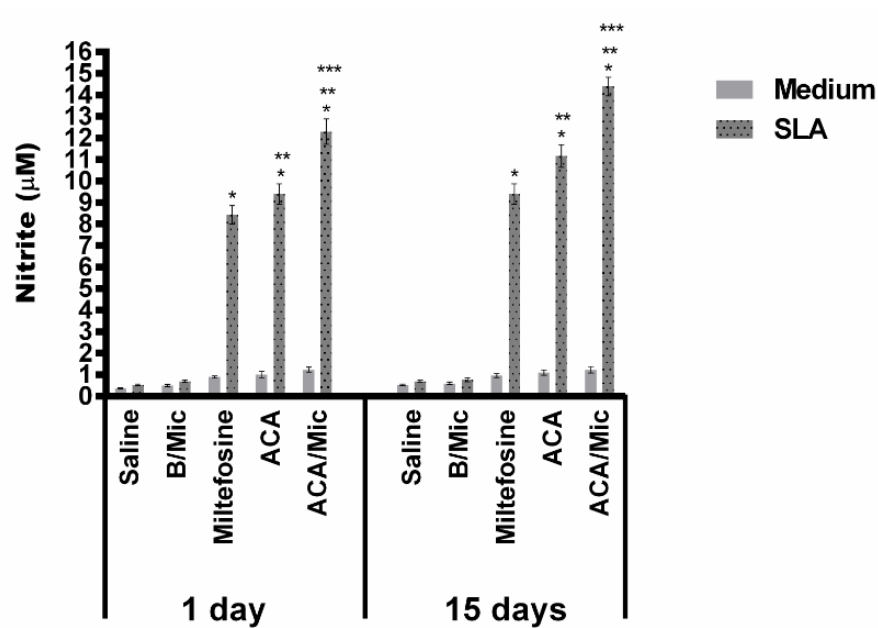


Fig. 6. Evaluation of nitrite secretion by Griess reaction. The cellular supernatants used to quantify cytokines (Fig. 5) were also employed to evaluate nitrite production. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$).

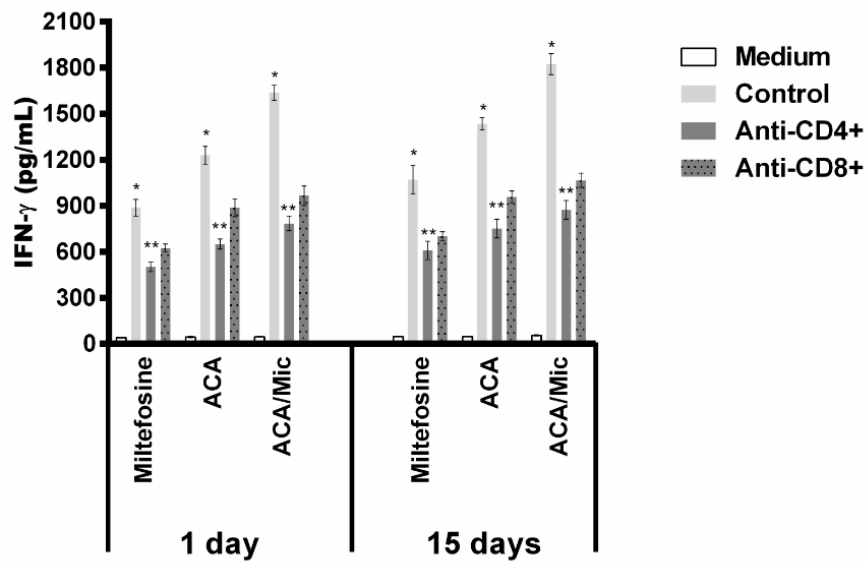


Fig. 7. Evaluation of IFN- γ production by T-cell subtypes. Splenocytes of the infected and treated (Miltefosine, ACA or ACA/Mic) mice were cultured in DMEM (medium) or stimulated with SLA (50 μ g/mL) in the presence of anti-CD4 or anti-CD8 antibody, for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN- γ levels were measured in the cell supernatants by capture ELISA. (*) indicate statistically significant difference in comparison to the use of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in comparison to the use of anti-CD8 monoclonal antibody ($P < 0.05$).

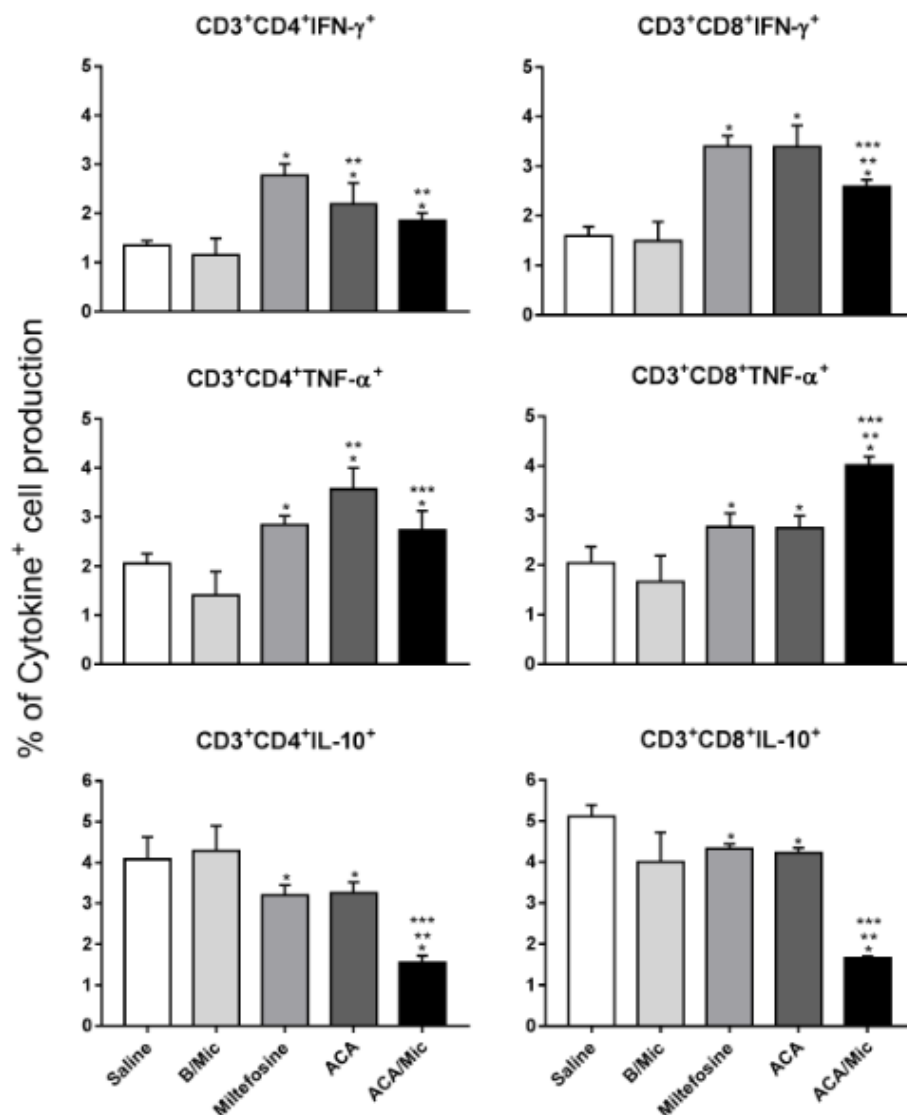


Fig. 8. Evaluation of intracytoplasmic cytokine-producing T-cells by flow cytometry technique. *L. infantum*-infected mice were treated, euthanized 15 days post-therapy and their spleen cells collected. Spleen cells were left unstimulated (medium) or stimulated with *L. infantum* SLA. IFN- γ , TNF- α and IL-10-producing T cell levels were evaluated in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations. Results were calculated as the ratio between CD4⁺ and CD8⁺ T-cell percentages in the stimulated and unstimulated cultures. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$).

3.4. Evaluation of parasite load

To evaluate parasitological efficacy of therapeutics, the parasite load in infected and treated animals was analyzed one and 15 days post-treatment. Results showed that Miltefosine-, ACA- or ACA/Mic-treated mice presented significant reductions in the parasitism in their livers, spleens, BMs and dLNs, when compared to the controls (Fig. 9). One day post-therapy, mice groups receiving Miltefosine, ACA or ACA/Mic presented with parasitism reductions of 4.0, 4.3 and 5.3-log, respectively, in their spleens; of 2.0, 2.3 and 3.7-log, respectively, in their livers; of 4.0, 4.7 and 5.7-log, respectively, in their dLNs; and of 1.7, 2.0 and 3.0-log, respectively, in their BMs, when compared to the saline control group. Fifteen days post-treatment, reductions in the parasitism levels in Miltefosine-, ACA- and ACA/Mic-treated mice were of 4.0, 4.7 and 5.7-log, respectively, in their spleens; of 2.3, 2.6 and 4.0-log, respectively, in their livers; of 3.7, 5.0 and 5.7-log, respectively, in their dLNs; and of 2.0, 2.3 and 3.0-log, respectively, in their BMs, when compared to the saline control group. The splenic parasite load was also evaluated by qPCR technique, with similar results showing that treatment with Miltefosine, ACA and ACA/Mic significantly reduced the parasitism levels in this organ, when compared to the controls (Fig. 10). Importantly, ACA/Mic-treated group showed the highest reductions in parasite load in all evaluated organs, when compared to all other groups.

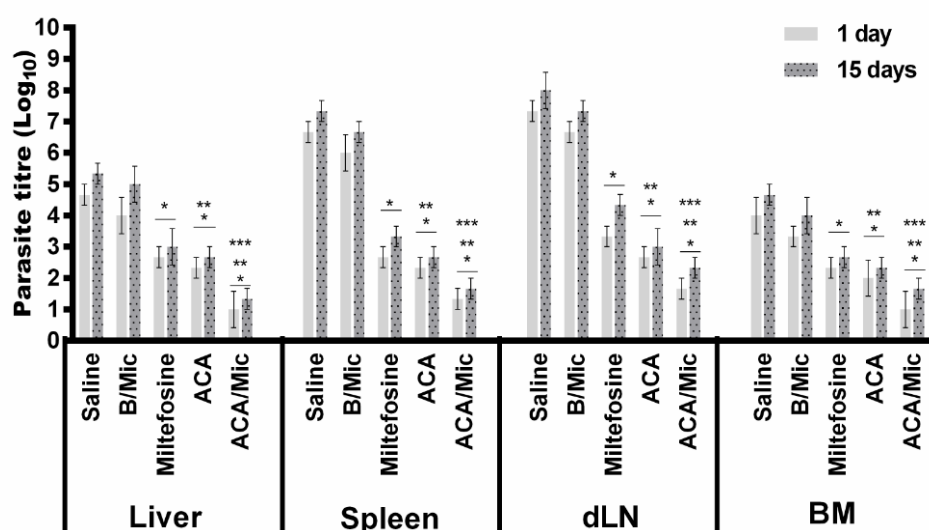


Fig. 9. Analysis of parasite load by limiting dilution technique. *L. infantum*-infected mice (n=12 per group) were treated and, one and 15 days post-therapy, n=6 per group were euthanized and their livers, spleens, bone marrows (BM) and draining lymph nodes (dLN) were collected for further parasite load quantification by a limiting dilution technique. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant

difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (*) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$).

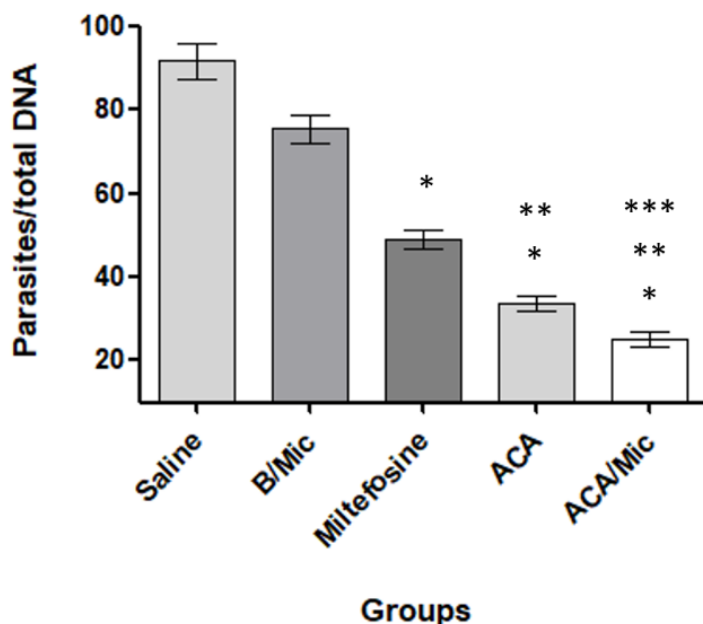


Fig. 10. Evaluation of splenic parasite load by quantitative PCR (qPCR) technique. *L. infantum*-infected BALB/c mice (n=12 per group) were treated and, 15 days post-treatment, animals (n=6 per group) were euthanized, their spleen collected and the parasite load was estimated by qPCR technique. Results are expressed as the number of parasites per total DNA. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$).

3.5. Evaluation of toxicity *in vivo*

Renal, hepatic and cardiac toxicity was evaluated after treatment. Results showed higher levels of these markers in the control groups. By comparison of the distinct treatment schedules, Miltefosine-treated mice presented a slight increase in AST, ALT and CK-MB enzymes levels, when compared to mice groups treated with ACA or ACA/Mic (Fig. 11).

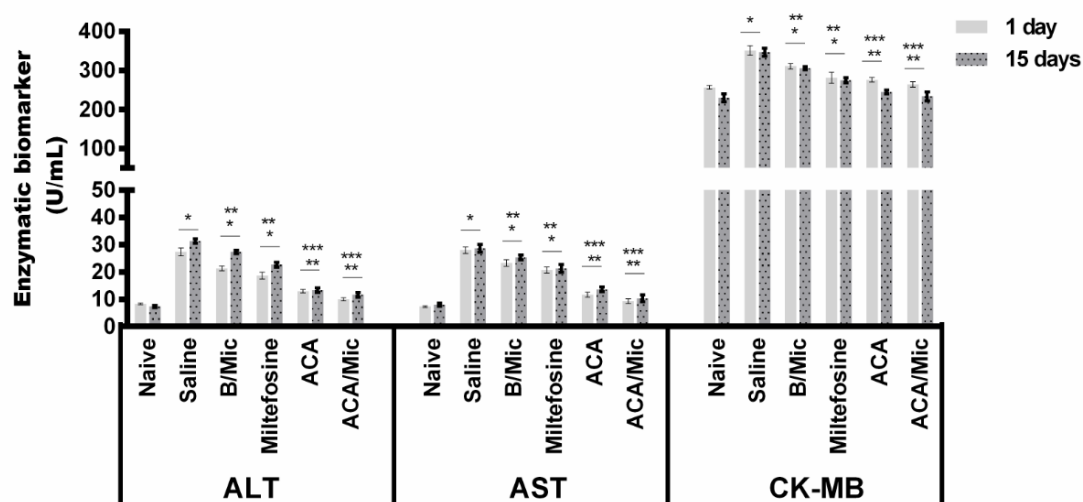


Fig. 11. Evaluation of toxicity *in vivo*. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase muscle brain fraction (CK-MB) were measured in sera samples collected from treated and infected mice, one and 15 days post-therapy. Sera samples of naive (non-infected and non-treated) mice were used as control. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (*) indicate statistically significant difference in relation to the saline and B/Mic groups ($P < 0.05$). (**) indicate statistically significant difference in relation to the Miltefosine group ($P < 0.05$). (***) indicate statistically significant difference in relation to the ACA group ($P < 0.05$).

4. Discussion

Treatment against VL is toxic, expensive, lengthy and its efficacy is not warranted. In addition, parasite resistance to commonly used antileishmanial drugs has also been reported (Chakravarty and Sundar, 2019). Thus, there is an urgent need to identify new antileishmanial targets. Discovery of new compounds is a long and expensive task; hence, drug repositioning or repurposing should be considered (Andrade-Neto *et al.*, 2018). In the present study, we evaluated potential antileishmanial activity of Acarbose, an approved drug for treating type-2-diabetes (He *et al.*, 2014), against *L. infantum* species, mainly responsible for most VL cases in the Americas (Pratlong *et al.*, 2013).

Recently, a *Leishmania* proteome mining strategy was performed to select new drug targets against the parasites. Good drug candidates should be relevant for *Leishmania* survival within its mammalian hosts, but should present low homology to human proteins (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2019). In that study, a hypothetical protein,

which was functionally annotated as a glucosidase-like protein and associated with *Leishmania* N-Glycan biosynthesis metabolic pathway, came up as a promising candidate. This parasite protein was also predicted to be potential target of two specific inhibitors, Acarbose and Miglitol. The authors tested Miglitol against *L. amazonensis* and *L. infantum*, proving its effectiveness against both *Leishmania* species. Treatment with Miglitol significantly reduced the percentage of infection and number of recovered amastigotes from infected macrophages. Therefore, the authors recommended the use of Miglitol as a potential candidate to treat VL (Chávez-Fumagalli et al., 2019). To the best of our knowledge, there are no reports on the antileishmanial activity of Acarbose. In the present study, we analyze both *in vitro* and *in vivo* the possibility of repurposing Acarbose as a potential therapeutic agent against VL. In our study, Miltefosine was used as a positive control drug for the experiments *in vivo*. This compound has long been effectively utilized as an orally administered drug for VL treatment (Monge-Maillo and López-Vélez, 2015; Sundar et al., 2015). However, disease relapses and parasite resistance have been reported, mainly due to prolonged therapy durations and the drug presenting with a long half-life (Pérez-Victoria et al., 2006; Sundar et al., 2012; Rijal et al., 2013; Pandey et al., 2016). In the present study, therapeutic action of Miltefosine was found to be satisfactory. However, treatment of *L. infantum*-infected mice with ACA, administered either in its free format or incorporated into a micelle delivery system, resulted in significantly lower parasite loads in spleen, liver, BM and dLN than when treating with Miltefosine, tested both by limiting dilution technique and qPCR. The lowest parasitism values were found when infected animals received ACA incorporated into the polymeric micelle system; suggesting this composition should be considered in further studies for its clinical application to treat VL.

Higher efficacy has been observed with antileishmanial agents, such as well-characterized AmpB or newer candidates, such as quinolines, flavonoids, among others, when administered within a delivery system (Yousuf et al., 2015; Cunha-Júnior et al., 2016; Sousa et al., 2019). In this report, and in agreement with other studies, incorporation of ACA into a Poloxamer 407-based micelle system resulted in a significantly better immunological and parasitological response than when using the free molecule. Similarly, Espuelas et al. (2000) tested AmpB-coated polymeric micelles against *L. donovani* species, reporting a synergic action between the drug and the micellar composition, with increases in anti-parasite activity of up to 100

times, when compared to the use of the drug in its free form. In a more recent study, Singh *et al.* (2017) used an AmpB-containing chitosan-coated Poloxamer 407 micelle system, and found that drug delivery within the micelles presented better antileishmanial activity and lower toxicity, in comparison to the use of the free drug. The authors reported development of a more polarized Th1-type immune response, as well as higher reductions in parasite burden in *L. donovani*-infected and treated hamsters, when compared to treatment with the free drug.

In the present study, Miltefosine-, ACA- or ACA/Mic-treated mice developed a Th1-type immune response profile, characterized by significantly higher levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, as well as low IL-4 and IL-10 levels, than the corresponding controls. An *in vitro* assay using monoclonal antibodies to block T cell subtypes showed that both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes were responsible for IFN- γ production after treatment. This Th1-type response was related also to the induction of nitrite production by stimulated spleen cells of infected and treated animals, suggesting activation of host macrophages to kill the parasite. Others have likewise shown development of similar immune profiles in response to treatment of *Leishmania*-infected mice with antileishmanial molecules, evidencing their relevance for the mammalian host to combat the infection (Chouhan *et al.*, 2015; Gogulamudi *et al.*, 2019; Reguera *et al.*, 2019).

With the aim to select novel, non-toxic antileishmanial agents, ACA toxicity was evaluated *in vivo* by means of biochemical dosage of hepatic, renal and cardiac damage markers in sera samples collected from infected and treated animals. Results showed a slight increase in the levels of hepatic and renal damage markers in Miltefosine-treated mice, and no significant alterations in the levels of these enzymatic markers in those treated with ACA or ACA/Mic, in comparison to non-infected and non-treated control mice. In a similar fashion, other studies have showed limitations to prolonged usage of Miltefosine related to gastric and renal side-effects (Bhattacharya *et al.*, 2007; Sundar and Olliaro, 2007; Georgiadou *et al.*, 2015). Our results showed that treatment with ACA-containing micelles are no toxic to the host and thus, suggest ACA/Mic formulation as a promising replacement for a safer treatment against VL.

Leishmania mitochondria is a primary target for therapeutic candidates, since it is intimately related to the parasite's metabolism and signaling pathways, such as ATP production, regulation of antioxidant machinery, maintenance of ionic

homeostasis and special sterol composition (Fidalgo and Gille, 2011). In our study, treatment with ACA resulted in impairment of *L. infantum* mitochondrial function, causing disturbance in the mitochondrial membrane potential and significant increase in ROS production. In addition, ACA caused also formation and accumulation of lipid bodies in the parasites. Since lipid droplets are related to organelles that regulate the storage of neutral lipids, composed by triacylglycerols and sterol esters (Miranda *et al.*, 2017), this observation could imply cellular stress (Macedo-Silva *et al.*, 2015; Rebello *et al.*, 2018; Sangenito *et al.*, 2018). Concordantly, treatment with ACA significantly increased the levels of neutral lipids, suggesting occurrence of cell disorders followed by parasite death. Despite the fact that preliminary results imply ACA targets the *Leishmania* mitochondria, additional studies are certainly necessary to confirm its mechanism of action.

Limitations of this study include the absence of evaluation of therapeutic efficacy at different time points after treatment, as well as the lack of comparison of different dose schedules. Nevertheless, the data here presented demonstrate both *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of ACA against *L. infantum* infection, mainly when administered within Pluronic® F127-based polymeric micelles. Results clearly showed specific production of Th1-type cytokines, with consequential significant reduction of parasitism in distinct organs, based on a NO-induced mechanism and without causing toxicity to the mammalian host. In conclusion, ACA/Mic is a promising candidate drug which merits further consideration in future studies for VL treatment advancement.

Acknowledgments

This work was supported by grant MR/R005850/1 from the Medical Research Council (Vaccine development for complex Intracellular neglected pAThogens - VALIDATE), UK, and grant APQ-408675/2018-7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the student scholarships.

Conflict of interest

The authors confirm that they have no conflicts of interest in relation to this work.

References

- Andrade-Neto VV, Cunha-Junior EF, Faioes VS, Pereira TM, Silva RL, Leon LL, Torres-Santos EC. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci.* 23 (2018) 967-996.
- Antinarelli LMR, Souza IO, Capriles PVZ, Gameiro J, Britta EA, Nakamura CV, Lima WP, Silva AD, Coimbra ES. Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 195 (2018) 78-86.
- Antonia AL, Wang L, Ko DC. A real-time PCR assay for quantification of parasite burden in murine models of leishmaniasis. *Peer J.* 6 (2018) e5905.
- Araújo VE, Morais MH, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (2012) e1511.
- Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, Das VR, Kumar N, Lal C, Verma N, Singh VP, Ranjan A, Verma RB, Anders G, Sindermann H, Ganguly NK. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 196 (2007) 591-598.
- Brito RCF, Ruiz JC, Cardoso JMO, Ostolin T, Reis LES, Mathias FAS, Aguiar-Soares RDO, Roatt BM, Corrêa-Oliveira R, Resende DM, Reis AB. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccines (Basel).* 8 (2020) e252.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 392 (2018) 951-970.
- Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 20 (2019) 1251-1265.
- Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Tavares GSV, Mendonça DVC, Dias DS, Ribeiro PAF, Ludolf F, Costa LE, Coelho VTS, Coelho EAF. In silico Leishmania proteome mining applied to identify drug target potential to be used to treat

- against visceral and tegumentary leishmaniasis. *J Mol Graph Model.* 87 (2019) 89-97.
- Chouhan G, Islamuddin M, Want MY, Ozbak HA, Hemeg HA, Sahal D, Afrin F. Leishmanicidal activity of *Piper nigrum* bioactive fractions is interceded via apoptosis in vitro and substantiated by Th1 immunostimulatory potential in vivo. *Front Microbiol.* 6 (2015) 1368.
- Coelho EAF, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun.* 71 (2003) 3988-3994.
- Cunha-Júnior EF, Martins TM, Canto-Cavalheiro MM, Marques PR, Portari EA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC, Torres-Santos EC. Preclinical studies evaluating subacute toxicity and therapeutic efficacy of LQB-118 in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 60 (2016) 3794-3801.
- Dayakar A, Chandrasekaran S, Kuchipudi SV, Kalangi SK. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. *Front. Immunol.* 10 (2019) 670.
- Espuelas S, Legrand P, Loiseau PM, Bories C, Barratt G, Irache JM. In vitro reversion of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* by Poloxamer 188. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 (2000) 2190-2192.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res.* 28 (2011) 2758-2770.
- Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med.* 3 (2015) 43-50.
- Gogulamudi VR, Dubey ML, Kaul D, Hubert DJ, Kandimalla R, Sehgal R. Vitamins (A&D) and isoprenoid (Chenodeoxycholic acid) molecules are accompanied by Th1 immunostimulatory response and therapeutic cure in vivo: possible antileishmanial drugs. *Sci Rep.* 9 (2019) 8531.
- Grimaldi GJr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 6 (1993) 230-250.

- Hanefeld M, Schaper F. Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 6 (2008) 153-163.
- He K, Shi JC, Mao XM. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients. *Ther Clin Risk Manag.* 10 (2014) 505-511.
- Kedzierski L, Evans KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 30 (2014) 1-19.
- Macedo-Silva ST, Visbal G, Urbina JA, Souza W, Rodrigues JC. Potent in vitro antiproliferative synergism of combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (2015) 6402-6418.
- Mbui J, Olobo J, Omollo R, Solomos A, Kip AE, Kirigi G, Sagaki P, Kimutai R, Were L, Omollo T, Egondi TW, Wasunna M, Alvar J, Dorlo TPC, Alves F. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of an allometric miltefosine regimen for the treatment of visceral leishmaniasis in Eastern African children: an open-label, phase II clinical trial. *Clin Infect Dis.* 68 (2019) 1530-1538.
- Mendonça DVC, Tavares GSV, Lage DP, Soyer TG, Carvalho LM, Dias DS, Ribeiro PAF, Ottoni FM, Antinarelli LMR, Vale DL, Ludolf F, Duarte MC, Coimbra ES, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Barichello JM, Alves RJ, Coelho EAF. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. *Biomed Pharmacother.* 109 (2019) 779-787.
- Miranda N, Volpato H, Rodrigues JHS, Caetano W, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. The photodynamic action of pheophorbide a induces cell death through oxidative stress in *Leishmania amazonensis*. *J Photochem Photobiol.* 174 (2017) 342-354.
- Mohamed-Ahmed AH, Brocchini S, Croft SL. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 25 (2012) 695-702.
- Monge-Maillo B, López-Vélez R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin Infect Dis.* 60 (2015) 1398-1404.
- Pandey K, Ravidas V, Siddiqui NA, Sinha SK, Verma RB, Singh TP, Dhariwal AC, Gupta RK, Das P. Pharmacovigilance of miltefosine in treatment of

- visceral leishmaniasis in endemic areas of Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg.* 95 (2016) 1100-1105.
- Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarro F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. *Drug Resist Updat.* 9 (2006) 26-39.
- Pijpers J, den Boer ML, Essink DR, Ritmeijer K. The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia - A review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 13 (2019) e0007173.
- Pratlong F, Lami PP, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, Baidouri FE, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology.* 140 (2013) 423-434.
- Rahman R, Goyal V, Haque R, Jamil K, Faiz A, Samad R, Ellis S, Balasegaram M, Boer MD, Rijal S, Strub-Wourgaft N, Alves F, Alvar J, Sharma B. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome®, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 (2017) e0005635.
- Raja MRC, Velappan AB, Chellappan D, Debnath J, Mahapatra SK. Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis. *Eur J Med Chem.* 139 (2017) 503-518.
- Rebello KM, Andrade-Neto VV, Zuma AA, Motta MCM, Gomes CRB, Souza MVN, Atella GC, Branquinha MH, Santos ALS, Torres-Santos EC, d'Avila-Levy CM. Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology.* 145 (2018) 1304-1310.
- Reguera RM, Álvarez-Velilla R, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Balaña-Fouce R, Cushman M, Pérez-Pertejo Y. Antiparasitic effect of synthetic aromathecins on *Leishmania infantum*. *BMC Vet Res.* 15 (2019) 405.
- Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo T, Beijnen JH, Vanaerschot M, Decuypere S, Dhakal SS, Das ML, Karki P, Singh R, Boelaert M, Dujardin JC. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin Infect Dis.* 56 (2013) 1530-1538.

- Sangenito LS, Menna-Barreto RFS, Oliveira AC, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. Primary evidence of the mechanisms of action of HIV aspartyl peptidase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Int J Antimicrob Agents*. 52 (2018) 185-194.
- Singh PK, Pawar VK, Jaiswal AK, Singh Y, Srikanth CH, Chaurasia M, Bora HK, Raval K, Meher JG, Gayen JR, Dube A, Chourasia MK. Chitosan coated Pluronic F127 micelles for effective delivery of amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Biol Macromol*. 105 (2017) 1220-1231.
- Sousa JKT, Antinarelli LMR, Mendonça DVC, Lage DP, Tavares GSV, Dias DS, Ribeiro PAF, Ludolf F, Coelho VTS, Oliveira-da-Silva JA, Perin L, Oliveira BA, Alvarenga DF, Chávez-Fumagalli MA, Brandão GC, Nobre V, Pereira GR, Coimbra ES, Coelho EAF. A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*. 73 (2019) 101966.
- Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis. Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag*. 3 (2007) 733-740.
- Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin JC, Chakravarty J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis*. 55 (2012) 543-550.
- Sundar S, Singh A, Chakravarty J, Rai M. Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Scient.World J*. 2015 (2015) 414378.
- Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology*. 145 (2018) 481-489.
- Sundar S, Singh A, Agrawal N, Chakravarty J. Effectiveness of single-dose liposomal amphotericin B in visceral leishmaniasis in Bihar. *Am J Trop Med Hyg*. 101 (2019) 795-798.
- Tavares GSV, Mendonça DVC, Lage DP, Granato JDT, Ottoni FM, Ludolf F, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Tavares CAP, Alves RJ, Coimbra ES, Coelho EAF. Antileishmanial activity, cytotoxicity and mechanism of action of clioquinol against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. *Bas Clin Pharm Tox*. 123 (2018) 236-246.
- Tavares GSV, Mendonça DVC, Pereira IAG, Oliveira-da-Silva JA, Ramos FF, Lage DP, Machado AS, Carvalho LM, Reis TAR, Perin L, Carvalho AMRS, Ottoni FM,

- Ludolf F, Freitas CS, Bandeira RS, Silva AM, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Menezes-Souza D, Alves RJ, Roatt BM, Coelho EAF. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. *Parasite*. 27 (2020) 29.
- Wang MZ, Zhu X, Srivastava A, Liu Q, Sweat JM, Pandharkar T, Stephens CE, Riccio E, Parman T, Munde M, Mandal S, Madhubala R, Tidwell RR, Wilson WD, Boykin DW, Hall JE, Kyle DE, Werbovetz KA. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 54 (2010) 2507-2516.
- World Health Organization. Leishmaniasis, <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>, 2018, Accessed data: 2 June 2018.
- Yousuf M, Mukherjee D, Pal A, Dey S, Mandal S, Pal C, Adhikari S. Synthesis and biological evaluation of ferrocenylquinoline as a potential antileishmanial agent. *Chem Med Chem*. 10 (2015) 546-554.
- Zhang N, Prasad S, Despointes CEH, Young J, Kima PE. Leishmania parasitophorous vacuole membranes display phosphoinositides that create conditions for continuous Akt activation and a target for miltefosine in Leishmania infections. *Cell Microbiol*. 20 (2018) e12889.
- Zhu X, Farahat AA, Mattamana M, Joice A, Pandharkar T, Holt E, Banerjee M, Gragg JL, Hu L, Kumar A, Yang S, Wang MZ, Boykin DW, Werbovetz KA. Synthesis and pharmacological evaluation of mono-arylimidamides as antileishmanial agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 26 (2016) 2551-2556.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a acarbose (ACA) possui seletiva e específica ação antileishmanial *in vitro* e *in vivo* contra a espécie *L. infantum* e indica que a formulação micelar contendo a molécula poderia ser testada em estudos futuros para o tratamento contra a LV.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos utilizando a Acarbose (ACA) e sua formulação micelar contra espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar.
- Realizar estudos *in vivo* avaliando a ACA e sua formulação micelar contra a leishmaniose visceral em outros modelos de mamíferos, tais como hamster.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952–9, 1993.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ANDRADE-NETO, V. Valter; CUNHA-JUNIOR, F. Edezio; FAIOES, Viviane dos Santos; MARTINS, Thaís Pereira; SILVA, Raphaela Lopes; LEON, Leonor Laura; TORRES-SANTOS, Eduardo Caio. Leishmaniasis treatment update of possibilities for drug repurposing. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 967-996, 2018.
- ANTINARELLI, Luciana Maria Ribeiro; SOUZA, Isabela de Oliveira; CAPRILES, Priscila Vanessa Zabala; GAMEIRO, Jacy; BRITTA, Elizandra Aparecida; NAKAMURA, Celso Vataru; LIMA, Wallace Pacienza; SILVA, Adilson David da; COIMBRA, Elaine Soares. Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 195, p. 78-86, dez. 2018.
- ANTONIA, Alejandro L.; WANG, Liuyang; KO, Dennis C.. A real-time PCR assay for quantification of parasite burden in murine models of leishmaniasis. **Peerj**, [S.L.], v. 6, p. 5905-5905, 9 nov. 2018.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 328-337, 2004.
- BARICHELO, J. M. et al. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 184, n. 2, p. 189–198, 1999.
- BHATTACHARYA, Sujit Kumar; SINHA, Prabhat Kumar; SUNDAR, Shyam; THAKUR, Chandreshwar Prasad; JHA, Tara Kant; PANDEY, Krishna; DAS, Vidyanand Rabi; KUMAR, Naveen; LAL, Chandrasekhar; VERMA, Neena. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 196, n. 4, p. 591-598, 15 ago. 2007.
- BOCHOTA, A. et al. Comparison of the Ocular Distribution of a Model Oligonucleotide after Topical Instillation in Rabbits of Conventional and New Dosage Forms. **Journal of Drug Targeting**, v. 6, n. 4, p. 309–313, 1998.
- BRITO, Rory Cristiane Fortes de; RUIZ, Jeronimo Conceição; CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira; OSTOLIN, Thais Lopes Valentim di Paschoale; REIS, Levi Eduardo Soares; MATHIAS, Fernando Augusto Siqueira; AGUIAR-SOARES,

Rodrigo Dian de Oliveira; ROATT, Bruno Mendes; CORRÊA-OLIVEIRA, Rodrigo; RESENDE, Daniela de Melo. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 252-252, 27 maio 2020.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018. ARAËJO, Valdelaine Etelvina Miranda de; MORAIS, Maria Helena Franco; REIS, Ilka Afonso; RABELLO, Ana; CARNEIRO, Mariângela. Early Clinical Manifestations Associated with Death from Visceral Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 1511-1511, 7 fev. 2012.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 7 maio 2019.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nature reviews*. **Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873– 82, 2007.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel A.; LAGE, Daniela P.; TAVARES, Grasiela S.V.; MENDONÇA, Débora V.C.; DIAS, Daniel S.; RIBEIRO, Patrícia A.F.; LUDOLF, Fernanda; COSTA, Lourena E.; COELHO, Vinicio T.s.; COELHO, Eduardo A.F.. In silico Leishmania proteome mining applied to identify drug target potential to be used to treat against visceral and tegumentary leishmaniasis. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [S.L.], v. 87, p. 89-97, mar. 2019.

CHEUKA, P.M., Mayoka, G., Mutai, P., Chibale, K., 2016. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**. 22, E58.

CHOUHAN, Garima; ISLAMUDDIN, Mohammad; WANT, Muzamil Y.; OZBAK, Hani A.; HEMEG, Hassan A.; SAHAL, Dinkar; AFRIN, Farhat. Leishmanicidal Activity of Piper nigrum Bioactive Fractions is Interceded via Apoptosis In Vitro and Substantiated by Th1 Immunostimulatory Potential In Vivo. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, p. 1368-1368, 8 dez. 2015.

COELHO, Eduardo Antonio Ferraz; TAVARES, Carlos Alberto Pereira; CARVALHO, Fernando Aécio Amorim; CHAVES, Karina Figueiredo; TEIXEIRA, Kadima Nayara; RODRIGUES, Rafaela Chitarra; CHAREST, Hugues; MATLASHEWSKI, Greg; GAZZINELLI, Ricardo Tostes; FERNANDES, Ana Paula. Immune Responses Induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis Infection. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 71, n. 7, p. 3988-3994, jul. 2003.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

CUNHA-JÚNIOR, Edézio Ferreira; MARTINS, Thiago Martino; CANTO-CAVALHEIRO, Marilene Marcuzzo; MARQUES, Paulo Roberto; PORTARI, Elyzabeth Avvad; COELHO, Marsen Garcia Pinto; NETTO, Chaquip Daher; COSTA, Paulo Roberto Ribeiro; SABINO, Katia Costa de Carvalho; TORRES-SANTOS, Eduardo Caio. Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 3794-3801, 11 abr. 2016.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in public health**, v. 2, n. September, p. 165, 2014.

DAYAKAR, Alti; CHANDRASEKARAN, Sambamurthy; KUCHIPUDI, Suresh V.; KALANGI, Suresh K.. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 670, 5 abr. 2019.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **International journal of nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2015.

DESAI, S. D.; BLANCHARD, J. Evaluation of Pluronic F127-Based Sustained-Release Ocular Delivery Systems for Pilocarpine using the Albino Rabbit Eye Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 10, p. 1190–1195, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DiMASI, H. G. G. Cost to Develop and Win Marketing Approval for a New Drug Is \$ 2.6 Billion. **Tufts Center for the Study of Drug Development**, 2014.

DIEFENBACH, A. *et al.* Type 1 interferon (IFN α /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 77–87, 1998.

DOHERTY, T. *et al.* Modulation of murine macrophage function by IL-13. **Journal of immunology**, v. 151, n. 12, p. 7151–7160, 1993.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n.11, p. 2576– 2597, 2012.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 5, p. 347–60, 2003.

ESPUELAS, S.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BARRATT, G.; IRACHE, J. M.. In Vitro Reversion of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* by Poloxamer 188. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 44, n. 8, p. 2190-2192, 1 ago. 2000.

FIDALGO, Lianet Monzote; GILLE, Lars. Mitochondria and Trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 21 set. 2011.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and in vitro antifungal activity. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 591–594, 2008.

FUMEGALLI, A.C; LAGE, D. P; TAVARES, G.S.V; MENDONÇA, D.V.C; DIAS, D.S; LUDOLF, F.; COSTA, L.E.; COELHO, V.T.S.; COELHO, E.A.F. *In silico* *Leishmania* proteome mining applied to identify drug target potential to be used to treat against visceral and tegumentary leishmaniasis. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 87, p. 89-97, 2019.

GEORGIADOU, Sarah P.; MAKARITSIS, Konstantinos P.; DALEKOS, George N. Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal Of Translational Internal Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 43-50, 30 jun. 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World : Current Concepts and Implications for Future Research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GREVELINK, S.A., LERNER, E.A. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol** 34: 257-272 Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199, 1996.

GOGULAMUDI, Venkateswara Reddy; DUBEY, Mohan Lal; KAUL, Deepak; HUBERT, Donfack Jean; KANDIMALLA, Ramesh; SEHGAL, Rakesh. Vitamins (A&D) and Isoprenoid (Chenodeoxycholic acid) molecules are accompanied by Th1 immunostimulatory response and therapeutic cure in vivo: possible antileishmanial drugs. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 8531-8531, 12 jun. 2019.

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

HANEFELD, Markolf; SCHAPER, Frank. Acarbose: oral antidiabetes drug with additional cardiovascular benefits. **Expert Review Of Cardiovascular Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 153-163, fev. 2008.

JUNQUEIRA-PEDRAS, M., ORSINI, M., CASTRO, M., PASSOS, V.M., RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 47, p. 477-485, 2003.

KANE, M. M. MOSSER, D M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **J Immunol**, v. 2, n.166, p.1141-1147, 2001.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEDZIERSKI, Lukasz; EVANS, Krystal J.. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, [S.L.], v. 141, n. 12, p. 1544-1562, 30 jul. 2014.

KEVRIC, I., Cappel, M. A., Keeling, J. H., 2015. New World and Old World *Leishmania* 501 Infections: A Practical Review. **Dermatol. Clin.** 33, 579-593.

KLING, J. C.; KÖRNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 6, p. 417–425, 2013.

LEE, J. W. et al. Pharmacokinetics and safety of a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmpBisome) in rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 713–718, 1994.

LERCHE W, S. B. No The effect of 5-ethyl-2-deoxyuridine (EDU) on the fine structure of rabbit corneal epithelium in herpetic keratitis. **Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.**, v. 184, n. 3, p. 193–201, 1972.

LOCKSLEY, R. M.; PINGEL, S.; LACY, D.; WAKIL, A.E.; BIX, M.; FOWELL, D.J. Susceptibility to Infectious Diseases : *Leishmania* as a Paradigm. **J Infect Dis** v. 179, n. 2, p. 305–308, 1999.

MACEDO-SILVA, S. T. de; VISBAL, G.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. de; RODRIGUES, J. C. F.. Potent In Vitro Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 6402-6418, 3 ago. 2015.

MAO, Xiao-Ming; HE, Ke; SHI, Jun-Cheng. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients. **Therapeutics And Clinical Risk Management**, [S.L.], p. 505-505, jun. 2014.

MBUI, Jane; OLOBO, Joseph; OMOLLO, Raymond; SOLOMOS, Alexandra; KIP, Anke e; KIRIGI, George; SAGAKI, Patrick; KIMUTAI, Robert; WERE, Lilian; OMOLLO, Truphosa. Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of an Allometric Miltefosine Regimen for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Eastern African Children: an open-label, phase ii clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 68, p. 1530-1538, 5 set. 2018.

MENDONÇA, Débora V.C.; TAVARES, Grasielle S.V.; LAGE, Daniela P.; SOYER, Tauane G.; CARVALHO, Lívia M.; DIAS, Daniel S.; RIBEIRO, Patrícia A.F.; OTTONI, Flaviano M.; ANTINARELLI, Luciana M.R.; VALE, Danniele L.. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 109, p. 779-787, jan. 2019.

MOHAMED-AHMED, Abeer H.A.; BROCCINI, Stephen; CROFT, Simon L.. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 695-702, dez. 2012.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R.. Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. 1398-1404, 18 jan. 2015.

MORIKAWA, K. et al. Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle, pluronic gel. *Cancer research*, v. 47, n. 1, p. 37–41, 1987.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R.R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 15, p. 376-381, 2011.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of Intracellular *Leishmania donovani* by Lymphokine-stimulated Human Mononuclear Phagocytes. **J Clin Invest**, v. 72, n. 4, p. 1506–1510, 1983.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C.J.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F.S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chem Rev**, v. 112, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NAKAMURA, C.V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck ev. **Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** 16(1):jan/mar. 2006.

OPAS. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. [s.l: s.n.].

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630–635, 2007.

PAAVOLA, A. et al. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharm Res.**, v. 12, n. 12, p. 1997–2002, 1995.

PANDEY, Krishna; SINHA, Sanjay K.; VERMA, Rakesh B.; GUPTA, R. K. das; RAVIDAS, Vidyanand; DAS, Pradeep; SIDDIQUI, Niyamat A.; SINGH, Tripurari P.; DHARIWAL, A. C.. Pharmacovigilance of Miltefosine in Treatment of Visceral

Leishmaniasis in Endemic Areas of Bihar, India. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 95, n. 5, p. 1100-1105, 2 nov. 2016.

PANDEY, K. *et al.* Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis-current scenario. **Clinical Medicine: Pathology**, v. 2, p. 1-4, 2009.

PEARSON RD, STEIGBIGEL RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol**, v.127, n.4, p.1438-1443, 1981.

PEC, E. A.; WOUT, Z. G.; JOHNSTON, T. P. Biological activity of urease formulated in Poloxâmoro 407 after intraperitoneal injection in the rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 7, p. 626–630, 1992.

PEREZ-VICTORIA, F; SANCHEZCANETE, M; SEIFERT, K; CROFT, S; SUNDAR, S; CASTANY, S; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resistance Updates**, [S.L.], v. 9, n. 1-2, p. 26-39, fev. 2006.

PEYRON, C.; BENHIDA, R.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M. Synthesis and in vitro antileishmanial activity of 5-substituted-2 J -deoxyuridine derivatives. **Bioorg Chem**, v. 33, p. 439–447, 2005.

PIJPERS, Joyce; BOER, Margriet L. Den; ESSINK, Dirk R.; RITMEIJER, Koert. The safety and efficacy of miltefosine in the long-term treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in South Asia – A review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 0007173-0007173, 11 fev. 2019.

PRATLONG, Francine; LAMI, Patrick; RAVEL, Christophe; BALARD, Yves; DEREURE, Jacques; SERRES, Ghislaine; BAIDOURI, Fouad El; DEDET, Jean-Pierre. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. **Parasitology**, [S.L.], v. 140, n. 4, p. 423-434, 12 nov. 2012.

RAHMAN, Ridwanur; GOYAL, Vishal; HAQUE, Rashidul; JAMIL, Kazi; FAIZ, Abul; SAMAD, Rasheda; ELLIS, Sally; BALASEGARAM, Manica; BOER, Margriet Den; RIJAL, Suman. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 0005635-0005635, 30 maio 2017.

RAJA, Mamilla R. Charan; VELAPPAN, Anand Babu; CHELLAPPAN, Davidraj; DEBNATH, Joy; MAHAPATRA, Santanu Kar. Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 139, p. 503-518, out. 2017.

REBELLO, Karina M.; ANDRADE-NETO, Valter V.; ZUMA, Aline A.; MOTTA, Maria Cristina M.; GOMES, Claudia Regina B.; SOUZA, Marcus Vinícius N. de; ATELLA, Geórgia C.; BRANQUINHA, Marta H.; SANTOS, André L. S.; TORRES-SANTOS, Eduardo Caio. Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid

metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, [S.L.], v. 145, n. 10, p. 1304-1310, 28 maio 2018.

REGUERA, Rosa M.; ÁLVAREZ-VELILLA, Raquel; DOMÍNGUEZ-ASENJO, Bárbara; GUTIÉRREZ-CORBO, Camino; BALAÑA-FOUCE, Rafael; CUSHMAN, Mark; PÉREZ-PERTEJO, Yolanda. Antiparasitic effect of synthetic aromathecins on *Leishmania infantum*. **Bmc Veterinary Research**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 405-405, 9 nov. 2019.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. The Lancet. **Infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

REZENDE, L.C.; FUMEGALLI, M.S.; BORTOLIN, M.G.; DE OLIVEIRA, M.H.; DE PAULA, V.F.; DE ANDRADE NETO, EMERY, F da S. *In vivo* antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.23, p. 4583-4586, 2013.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, n. 59, p. 1–8, 2012.

RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 60–68, 2014.

RIJAL, Suman; OSTYN, Bart; URANW, Surendra; RAI, Keshav; BHATTARAI, Narayan Raj; DORLO, Thomas P. C.; BEIJNEN, Jos H.; VANAERSCHOT, Manu; DECUYPERE, Saskia; DHAKAL, Subodh S.. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 56, n. 11, p. 1530-1538, 20 fev. 2013.

SACKS, D.; KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SANGENITO, Leandro S.; MENNA-BARRETO, Rubem F.s.; OLIVEIRA, Ana Carolina; D'AVILA-LEVY, Claudia M.; BRANQUINHA, Marta H.; SANTOS, André L.s.. Primary evidence of the mechanisms of action of HIV aspartyl peptidase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 185-194, ago. 2018.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008.

SCHUBACH, A. et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, p. 911–914, 1998.

SINGH, Pankaj K.; PAWAR, Vivek K.; JAISWAL, Anil K.; SINGH, Yuvraj; SRIKANTH, Cheruvu Hanumanth; CHAURASIA, Mohini; BORA, Himangsu K.; RAVAL, Kavita; MEHER, Jaya Gopal; GAYEN, Jiaur R.. Chitosan coated PluronicF127 micelles for

effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 105, p. 1220-1231, dez. 2017.

STRAZZULLA, A.; COCUZZA, S.; PINZONE, M. R.; POSTORINO, M. C.; COSENTINO, S.; SERRA, A.; BRUNO CACOPARDO, B.; NUNNARI, G. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2013.

SUH, J. K.; MATTHEW, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589–2598, 2000.

SUNDAR, Shyam; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; AGRAWAL, N.; VAILLANT, Michel; OLLIARO, Piero; MURRAY, Henry W.. New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: single :dose liposomal amphotericin b followed by short :course oral miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 1000-1006, 15 out. 2008.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup; CHAKRAVARTY, Jaya; RAI, Madhukar. Efficacy and Safety of Miltefosine in Treatment of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2015, p. 1-6, 2015.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 481-489, 7 dez. 2017.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup; AGRAWAL, Neha; CHAKRAVARTY, Jaya. Effectiveness of Single-Dose Liposomal Amphotericin B in Visceral Leishmaniasis in Bihar. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 101, n. 4, p. 795-798, 2 out. 2019.

TAVARES, Grasielle de Sousa Vieira; MENDONÇA, Débora Vasconcelos Costa; LAGE, Daniela Pagliara; GRANATO, Juliana da Trindade; OTTONI, Flaviano Melo; LUDOLF, Fernanda; CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel; DUARTE, Mariana Costa; TAVARES, Carlos Alberto Pereira; ALVES, Ricardo José. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 236-246, 6 abr. 2018.

TAVARES, Grasielle S.V.; MENDONÇA, Débora V.C.; PEREIRA, Isabela A.G.; OLIVEIRA-DA-SILVA, João A.; RAMOS, Fernanda F.; LAGE, Daniela P.; MACHADO, Amanda S.; CARVALHO, Lívia M.; REIS, Thiago A.R.; PERIN, Luísa. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. **Parasite**, [S.L.], v. 27, p. 29-29, 2020.

TAVARES, Grasielle S.V.; MENDONÇA, Débora V.C.; PEREIRA, Isabela A.G.; OLIVEIRA-DA-SILVA, João A.; RAMOS, Fernanda F.; LAGE, Daniela P.; MACHADO, Amanda S.; CARVALHO, Lívia M.; REIS, Thiago A.R.; PERIN, Luísa. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. **Parasite**, [S.L.], v. 27, p. 29, 2020.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania : paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, n.2, p. 229–242, 2007

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1829–1834, 2002.

VÉLEZ, I. D.; COLMENARES, L. M.; MUÑOZ, C. A. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 4, p. 231–236, 2009.

WEI, H. et al. Self-assembled thermoresponsive micelles of poly(N-isopropylacrylamide-b-methyl methacrylate). **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2028–2034, 2006.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433-50, 1996.

World Health Organization. Leishmaniasis.
<<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>, 2018. Acessado em 2 de junho de 2018.

WANG, Michael Zhuo; ZHU, Xiaohua; SRIVASTAVA, Anuradha; LIU, Qiang; SWEAT, J. Mark; PANDHARKAR, Trupti; STEPHENS, Chad E.; RICCIO, Ed; PARMAN, Toufan; MUNDE, Manoj. Novel Arylimidamides for Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 54, n. 6, p. 2507-2516, 5 abr. 2010.

YOUSUF, Md; MUKHERJEE, Debarati; PAL, Abhishek; DEY, Somaditya; MANDAL, Supratim; PAL, Chiranjib; ADHIKARI, Susanta. Synthesis and Biological Evaluation of Ferrocenylquinoline as a Potential Antileishmanial Agent. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 546-554, 23 jan. 2015.

ZHANG, L. et al. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxâmero 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1–3, p. 73–81, 2002.

ZHANG, Naixin; PRASAD, Samiksha; DESPOINTES, Charles-Eugene Huyghues; YOUNG, Jeffrey; KIMA, Peter E.. Leishmania parasitophorous vacuole membranes display phosphoinositides that create conditions for continuous Akt activation and a

target for miltefosine in Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 12889-12889, 31 jul. 2018.

ZHU, Xiaohua; FARAHAT, Abdelbasset A.; MATTAMANA, Meena; JOICE, April; PANDHARKAR, Trupti; HOLT, Elizabeth; BANERJEE, Moloy; GRAGG, Jamie L.; HU, Laixing; KUMAR, Arvind. Synthesis and pharmacological evaluation of mono-arylimidamides as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 26, n. 10, p. 2551-2556, maio 2016.