

Trabalho



Título em Português:	Investigação dos Efeitos Antiparasitários de Candidatos a Fármacos para a Leishmaniose Visceral
Título em Inglês:	Investigation of the Antiparasitic Effects of Drug Candidates for Visceral Leishmaniasis
Autor:	Danielle Mendes Silva
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Adriano Defini Andricopulo
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL

Danielle Mendes Silva, Analu Rocha Costa, João Victor Silva-Silva, Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo

daniellemendes@usp.br

Objetivos

(i) Avaliar o potencial antiparasitário dos compostos frente à forma amastigota de *Leishmania infantum*. (ii) Realizar predições *in silico* das propriedades farmacocinéticas dos compostos.

Métodos e Procedimentos

Para os ensaios de inibição parasitária, monócitos (THP-1) diferenciados com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) foram infectados com *L. infantum* e tratados com os compostos em diferentes concentrações (0,12–64 μM), onde a miltefosina foi usada como controle positivo. Após 120 h, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A inibição do crescimento (IC_{50}) foi expressa em relação ao controle negativo e obtida a partir das curvas dose-resposta. Para a avaliação de citotoxicidade monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos com PMA foram tratados com compostos em diferentes concentrações (0,12–64 μM), utilizando doxorrubicina como controle positivo. Após 120 h, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio com resazurina e a inibição do crescimento foi expressa em relação ao controle negativo. A concentração citotóxica (CC_{50}) foi determinada a partir das curvas dose-resposta. Os compostos também foram submetidos a análises farmacocinéticas *in silico* para predição de sua biodisponibilidade oral. Esta avaliação, incluiu os parâmetros de

absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e foi conduzida na plataforma SwissADME e baseada nas regras de Lipinski [1] e Veber [2].

Resultados

Os compostos apresentaram diferentes perfis de atividade antiparasitária e citotoxicidade em células THP-1 (Tabela 1). As duas primeiras estruturas exibiram valores de $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$. Como consequência disso esses compostos apresentaram baixos índices de seletividade, que é a razão do CC_{50} pelo IC_{50} . Já o composto 3 demonstrou melhor atividade antiparasitária, acompanhada de menor toxicidade para células THP-1, resultando em um melhor índice de seletividade.

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% dos parasitas (IC_{50}), concentração citotóxica (CC_{50}) e índice de seletividade dos compostos.

Composto	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	Índice de Seletividade
1	$32,36 \pm 4,5$	> 64	1,97
2	$36,29 \pm 7,19$	> 64	1,76
3	$2,41 \pm 0,31$	$24,98 \pm 0,24$	10,36
Miltefosina	$1,86 \pm 0,36$	-	-
Doxorrubicina	-	$0,55 \pm 0,22$	-

Para avaliar as propriedades farmacocinéticas preditas dos compostos, o gráfico que ilustra a biodisponibilidade oral presente na Figura 1 foi

elaborado. De acordo com o gráfico é possível observar que os três compostos estão posicionados dentro da região branca, que corresponde a área favorável de absorção no trato gastrointestinal e fora da área amarela que demonstra baixa penetração dos compostos na barreira hematoencefálica.

A análise dos radares de propriedades mostra que os compostos, apesar de terem um bom peso molecular ($< 500\text{g/mol}$), serem flexíveis (número de rotações livres < 9) e polares ($20 < \text{TPSA} < 130 \text{ \AA}^2$), não apresentam um bom perfil de biodisponibilidade, por estarem fora do intervalo ótimo de lipofilicidade (XLOGP3 entre $-0,7$ e $+5,0$), número de insaturações ($0,25 < \text{fração csp}_3 < 1$) e solubilidade em água ($\text{LogS} < 6$) [3].

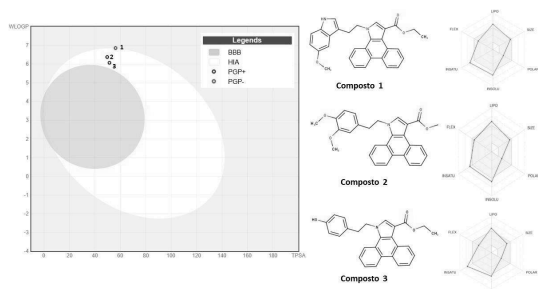


Figura 1. Gráfico Boiled-Egg para avaliação do potencial de absorção dos compostos nos sistemas nervoso central e gastrointestinal.

Conclusões

Entre as estruturas avaliadas, o composto 3 apresentou o melhor perfil nos ensaios *in vitro*, com um alto índice de seletividade ($\text{IS} = 10,36$). Contudo, as predições *in silico* indicaram que esse composto não se encontra integralmente dentro da região favorável de biodisponibilidade oral e não exibe boa conformidade com todos os parâmetros farmacocinéticos estudados. Esses resultados sugerem que o composto 3 deve passar por mais estudos futuros e então ser modificado

estruturalmente para ser otimizado. Assim, este poderá ser considerado um melhor candidato para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

D.M. realizou as predições computacionais e escrita do resumo. A.R.C. realizou os ensaios *in vitro* e participou da redação e revisão final do resumo. J.V.S.S. supervisionou os ensaios *in silico* e participou da redação e revisão final do resumo. A.D.A. concebeu e planejou o estudo, supervisionou as atividades e participou da redação e revisão final do resumo.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, ao Programa Unificado de Bolsas de Estudo pelo apoio financeiro, ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo pela orientação, à Analu Rocha Costa e ao João Victor Silva pela colaboração.

Referências

- 1) LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3–25, jan. 1997.
- 2) VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.
- 3) DAINA, A. et al. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

Investigation of the Antiparasitic Effects of Drug Candidates for Visceral Leishmaniasis

Danielle Mendes Silva, Analu Rocha Costa, João Victor Silva-Silva, Adriano Defini Andricopulo

Institute of Physics of São Carlos / University of São Paulo

daniellemendes@usp.br

Objectives

(i) To evaluate the antiparasitic potential of the compounds against the amastigote form of *Leishmania infantum*. (ii) To perform *in silico* predictions of the pharmacokinetic properties of the compounds.

The compounds were also subjected to *in silico* pharmacokinetic analyses to predict their oral bioavailability. This evaluation, which included absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) parameters, was carried out using the SwissADME platform and based on Lipinski's [1] and Veber's [2] rules.

Materials and Methods

For the parasitic inhibition assays, THP-1 monocytes differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were infected with *L. infantum* and treated with the compounds at different concentrations (0.12–64 μ M), with miltefosine used as a positive control. After 120 h, the cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. Growth inhibition (IC_{50}) was expressed relative to the negative control and determined from dose–response curves.

For the cytotoxicity evaluation, THP-1 monocytes differentiated into macrophages with PMA were treated with the compounds at different concentrations (0.12–64 μ M), using doxorubicin as a positive control. After 120 h, cell viability was assessed by a resazurin-based assay, and growth inhibition was expressed relative to the negative control. The cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined from dose–response curves.

Results

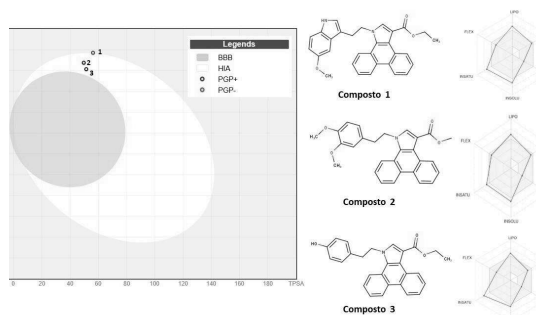
The compounds exhibited distinct profiles of antiparasitic activity and cytotoxicity in THP-1 cells (Table 1). The first two structures showed IC_{50} values greater than 30 μ M, which resulted in low selectivity indices, calculated as the ratio of CC_{50} to IC_{50} . In contrast, compound 3 demonstrated stronger antiparasitic activity, accompanied by lower toxicity toward THP-1 cells, leading to a higher selectivity index.

Table 1. Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) against parasites, cytotoxic concentration (CC_{50}), and selectivity index of the compounds.

Compound	IC_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)	Selectivity Index
1	32.36 $\pm$ 4.50	> 64	1.97
2	36.29 $\pm$ 7.19	> 64	1.76
3	2.41 $\pm$ 0.31	24.98 $\pm$ 0.24	10.36
Miltefosine	1.86 $\pm$ 0.36	-	-
Doxorubicin	-	0.55 $\pm$ 0.22	-

To evaluate the predicted pharmacokinetic properties of the compounds, the graph illustrating oral bioavailability shown in Figure 1 was prepared. According to the graph, it is possible to observe that all three compounds are located within the white region, which corresponds to the favorable area for gastrointestinal absorption, and outside the yellow region, which indicates low penetration of compounds across the blood–brain barrier.

The radar chart analysis of the properties shows that, although the compounds present favorable molecular weight (< 500 g/mol), flexibility (number of rotatable bonds < 9), and polarity ($20 < \text{TPSA} < 130 \text{ \AA}^2$), they do not display an optimal bioavailability profile. This is due to their values falling outside the optimal range for lipophilicity (XLOGP3 between -0.7 and $+5.0$), degree of saturation ($0.25 < \text{fraction csp}^3 < 1$), and water solubility ($\text{LogS} < 6$) [3].



Picture 1: Boiled-Egg plot for the evaluation of the absorption potential of the compounds in the central nervous and gastrointestinal systems.

Conclusions

Among the evaluated structures, compound 3 exhibited the best profile in the *in vitro* assays, with a high selectivity index ($\text{SI} = 10.36$). However, the *in silico* predictions indicated that this compound does not fully fall within the favorable region of oral bioavailability and does

not show complete compliance with all the pharmacokinetic parameters studied. These results suggest that compound 3 should undergo further studies and then be structurally modified for optimization. Thus, it may be considered a stronger candidate for the development of new antiparasitic drugs.

The authors declare no conflict of interest.

D.M. carried out the computational predictions and drafted the abstract. A.R.C. performed the *in vitro* assays and contributed to the writing and final revision of the abstract. J.V.S.S. supervised the *in silico* analyses and contributed to the writing and final revision of the abstract. A.D.A. conceived and designed the study, supervised the activities, and contributed to the writing and final revision of the abstract.

Acknowledgements

To the University of São Paulo, the Unified Scholarship Program for financial support, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo for guidance, and Analu Rocha Costa and João Victor Silva Silva for their collaboration.

References

- 1) LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3–25, jan. 1997.
- 2) VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.
- 3) DAINA, A. et al. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.