

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

ALINE CAROLINE DA SILVA

**Análise *in vitro* do potencial imunomodulatório e leishmanicida de
derivados de tiossemicarbazona e ftalimida**

**Recife
2013**

ALINE CAROLINE DA SILVA

Análise *in vitro* do potencial leishmanicida e imunomodulatório de derivados de tiossemicarbazona e ftalimida

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Co-orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Recife
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Aline Caroline da
Análise *in vitro* do potencial imunomodulatório e
leishmanicida de derivados de tiosemicarbazona e ftalimida/
Aline Caroline da Silva– Recife: O Autor, 2013.

144 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Coorientadora: Regina Célia Queiroz de Figueiredo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

- 1. Leishmaniose cutânea 2. Quimioterapia 3. Toxicidade I. Pereira, Valéria**
Rêgo Alves (orientador) II. Figueiredo, Regina Célia Queiroz de
(coorientadora) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 258

ALINE CAROLINE DA SILVA

Título: Análise *in vitro* do potencial leishmanicida e imunomodulatório de derivados de tiossemicarbazona e ftalimida.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 30/07/2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira (Orientadora)

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta (Titular interno)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Titular externo)

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (Suplente externo)

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandez (Suplente interno)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a meus pais, Severino e Luzinete, fontes de inspiração e exemplos de esforço e dedicação, e ao meu noivo, Thiago, companheiro de todos (todos mesmo!) os momentos.

AGRADECIMENTOS

A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor;

A minha família, particularmente aos meus pais, que não mediram esforços pra que eu concluísse mais esta etapa da minha vida;

A meu noivo pelo companheirismo, incentivo, lealdade, cuidado e carinho em todo o tempo;

A minha orientadora, Valéria, pela confiança, amizade e verdadeira orientação;

A minha co-orientadora Regina Bressan, responsável pela minha formação inicial, pela liberdade que sempre me proporcionou;

A todos os amigos do Laboratório de Imunogenética (Amanda, Andresa, Beatriz, Lucas, Maria Carolina, Marina, Rafael, Thays e Thiago) pelas conversas, ajudas e bons momentos de convivência;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular que sempre me ajudaram quando precisei, em especial a Taciana, Keicyanne, Divar e Jana;

A Janaína Correia pelas conversas, risadas e muita ajuda nos experimentos;

A equipe do Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA/UFPE) coordenado pela professora Dra. Ana Cristina Lima Leite, e aos alunos Diogo Moreira e Paulo André pela síntese dos compostos;

Aos companheiros do mestrado, em especial a Flávia, Isabella, Bruno, Sérgio, Luana, pelos bons momentos;

A pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE pela oportunidade e apoio. Em especial ao secretário Paulo Germano pela ajuda sempre em tudo que estava ao seu alcance e a professora Suely Galdino (*in memoriam*) pelos muitos conselhos;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ter cedido sua estrutura, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Há ocasiões em que optamos por acreditar em algo que normalmente seria considerado absolutamente irracional. Isso não significa que seja mesmo irracional, mas certamente não é racional. Talvez exista a supra-racionalidade: a razão além das definições normais dos fatos ou da lógica baseada em dados. Algo que só faz sentido se você puder ver uma imagem maior da realidade. Talvez seja aí que a fé se encaixe.

William P. Young

RESUMO

A leishmaniose é uma infecção causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente não existe vacina disponível para infecções por *Leishmania* e os tratamentos convencionais são tóxicos para os pacientes. Por esse motivo, o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas é uma necessidade urgente. No presente trabalho foi avaliada a citotoxicidade, atividade leishmanicida, a produção de óxido nítrico (NO), a secreção das citocinas IL-12, IL-10 e TNF e a indução da morte celular sob a influência de 22 novos compostos sintéticos derivados da estrutura das Ftalil-Hidrazona-Tiazóis e Tiossemicarbazonas. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em macrófagos peritoniais através do método do MTT e o índice de seletividade foi determinado. Foi avaliado o efeito dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os compostos mais promissores foram avaliados sobre as formas amastigotas intracelulares. A produção de NO, bem como de citocinas por macrófagos infectados ou não e tratados ou não com os compostos foi avaliada pelo reagente de Griess e ELISA de captura, respectivamente. Foi avaliado o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos em promastigotas tratadas e controle marcadas com anexina –FITC e iodeto de propídio, com posterior análise por citometria de fluxo. Os dados mostram que todos os compostos inibiram o crescimento de formas promastigotas e amastigotas além de apresentarem baixa citotoxicidade em macrófagos. A presença de TS02, PM01, PM04 e PM10 na cultura de parasitas causou morte celular por apoptose. A TS02 também causou necrose. Quanto à produção de NO, esta foi detectada em macrófagos não infectados incubados com os compostos por 24 e 48h. Também foi dosada a produção de NO em macrófagos infectados, onde foi observada uma redução significativa dessa produção na presença do parasita. O tratamento com a TS11 das culturas infectadas restabeleceu a produção do NO pelos macrófagos. A presença da TS01 no tratamento das culturas infectadas causou aumento da produção de TNF. Na cultura não infectada, TS01, TS09, TS10, TS11 e PM01 causaram aumento significativo de TNF. Houve aumento significativo da produção de IL-12, nas culturas infectadas e tratadas com TS09, TS11, TS15 e PM01, e nas culturas não infectadas e tratadas com TS01, TS02, TS10, TS12, TS15, PM01 e PM04. O tratamento das culturas infectadas não interferiu com a produção de IL-10. Em culturas não infectadas houve aumento na produção de IL-10 após incubação com TS01, TS02, TS09, TS15 e PM01. A baixa toxicidade aos macrófagos, a atividade leishmanicida e a presença de citocinas de perfil Th1 apresentadas apontam para a utilização dos compostos TS01, TS11 e PM01 como agentes promissores para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Quimioterapia. Compostos sintéticos. Tiossemicarbazona.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infection caused by different species of protozoa of the *Leishmania* genus. Currently there is no vaccine available for Leishmania infections and conventional treatments are toxic to patients. For this reason, the development of new antileishmanial drugs is an urgent need. In the present study we evaluated the cytotoxicity, leishmanicidal activity, production of nitric oxide (NO), the secretion of IL-12, IL-10 and TNF and cell death induction under the influence of new synthetic compounds derived from the structure Phthalyl-hydrazone-thiazole and Thiosemicarbazones. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in peritoneal macrophages by the MTT method and the selectivity index was determined. The compounds effect on the growth of promastigotes of *L. amazonensis* was evaluated. The most promising compounds were evaluated on intracellular amastigotes. NO and macrophage cytokine production was evaluated in macrophage infected and not infected and treated or not with the compounds. We assessed the cell death mechanism induced by the compounds on treated promastigotes and on controls labeled with Annexin-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. The data show that all of the compounds inhibited the promastigotes and amastigotes growth besides having low cytotoxicity in macrophages. The presence of TS02, PM01, PM04 and PM10 in the parasites culture caused cell death by apoptosis. The TS02 also caused necrosis. Regarding the NO production, it was detected in macrophages incubated with the compounds for 24 and 48h. We also measured the production of NO in macrophages infected or not, where a significant reduction in production was observed in the presence of the parasite. Treatment of the cultures infected with TS11 restored the production of NO by macrophages. The presence of TS01 in the treatment of infected cultures caused increased production of TNF. In uninfected culture, TS01, TS09, TS10, TS11 and PM01 caused significant increase of TNF. A significant increase of IL-12 was observed in infected cultures treated with TS09, TS11, TS15 and PM01, and cultures not infected and treated with TS01, TS02, TS10, TS12, TS15, PM01 and PM04. The treatment of the infected cultures did not affect the production of IL-10. In uninfected cultures there was an increased production of IL-10 after incubation with TS01, TS02, TS09, TS15 and PM01. The low toxicity to macrophages, the leishmanicidal activity and the presence of Th1 cytokine profile displayed pointed to the usage of compounds TS01, TS11 and PM01 as promising agents for cutaneous leishmaniasis treatment.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Chemotherapy. Synthetic compounds.

Thiosemicarbazone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da LTA no Brasil no ano de 2007	26
Figura 2 - Distribuição mundial da LTA	26
Figura 3 - Casos de LTA no Brasil (1980-2009)	27
Figura 4 - Representação esquemática forma amastigota (A) e promastigota (B) de <i>Leishmania</i> sp. mostrando o núcleo (N), flagelo (F) e cinetoplasto (K).	28
Figura 5 - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose cutânea no Brasil	29
Figura 6 - Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo <i>Lutzomyia</i> sp.	29
Figura 7 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.	31
Figura 8 - Caracterização das diferentes manifestações clínicas da LTA.	32
Figura 9 - Estrutura genérica das tiossemicarbazonas R, R1, R2, R3 = H, grupos arila ou grupos alquila	43
Figura 10 - Representação da estrutura da cruzaina, ligada a inibidor derivado de vinil sulfona	45
Figura 11 - Representação estrutural do anel 1,3-tiazol.	46
Figura 12 - Exemplos de produtos bioativos naturais contendo tiazol.	47
Figura 13 - Mecanismos de morte celular induzidos pelos compostos.	63
Figura 14 - Quantificação de NO em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24.	67

Figura 15 - Quantificação da produção de NO em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.....	68
Figura 16 - Quantificação da produção de NO em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	68
Figura 17 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24h.....	69
Figura 18 - Quantificação da produção de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.....	70
Figura 19 - Quantificação da produção de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	70
Figura 20 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS por 24h.....	71
Figura 21 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.....	72
Figura 22 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	72
Figura 23 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24h.....	74
Figura 24 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.....	74

Figura 25 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	75
Figura 26 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS por 24h.	76
Figura 27 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.	76
Figura 28 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS por 48h.	77
Figura 29 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 48h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.	78
Figura 30 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 48h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	78
Figura 31 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24h.	79
Figura 32 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas com os diferentes compostos no tempo de 24h.	80
Figura 33 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS por 24h (A) e 48h (B).	81
Figura 34 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.	81

Figura 35 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	82
Figura 36 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 48h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.	82
Figura 37 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais tratados por 48h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.	83
Figura 38 - Planejamento sintético das tiossemicarbazonas	110
Figura 39 - Planejamento sintético da série ftali-hidrazona-tiazol	125
Figura 40 - Reação da série PM01-10	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos sintetizados e seus respectivos pesos moleculares (g/mol) ..	56
Tabela 2 - Efeito das Ftalimida-tiazolil-hidrazonas sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos peritoniais.	58
Tabela 3 - Efeito das Tiossemicarbazonas sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos peritoniais.	59
Tabela 4 - Efeito dos compostos sobre as formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	61
Tabela 5 - Produção de NO por macrófagos peritoniais estimulados com os compostos por 24h.	64
Tabela 6 - Produção de NO por macrófagos peritoniais estimulados com os compostos por 48h.	65
Tabela 7 - Produção de NO pelos controles nos tempos de 24 e 48h.	66

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CC ₅₀	Concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Cluster de diferenciação
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMAR	Espectro de massa de alta resolução
ESI	Ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorocromo isotiocinato de fluoresceína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC ₅₀	Concentração de Inibição de 50% do crescimento
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ISe	Índice de Seletividade
IV	Infravermelho
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
LPS	Lipopolissacarídeo

LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MPL-SE	Monofosforil Lipídeo A
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein data bank</i>)
PI	Iodeto de propídio
PM	Série Ftalil-Hidrazona-Tiazol
q.s.p.s	Quantidade suficiente para solubilizar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Sb-III	Antimonial trivalente
Sb-V	Antimonial pentavalente
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
Th	Linfócito T auxiliar
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TOF	<i>Time-of-flight</i>
TPP	Enzima pirofosfato de tiamina
TS	Série Tiosemicarbazonas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
	2.1 Geral	24
	2.2 Específicos	24
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
	3.1 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	25
	3.2 Agentes etiológicos e vetores	27
	3.3 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.	30
	3.4 Manifestações clínicas	31
	3.5 Diagnóstico.....	33
	3.6 Aspectos imunológicos.....	34
	3.6.1 Resposta celular	34
	3.6.2 Óxido nítrico	36
	3.6.3 Suscetibilidade e resistência à infecção	37
	3.7 Medidas de controle e tratamento	38
	3.8 Tiosemicarbazonas	43
	3.9 Tiazóis	46
	3.10 Ftalimidas	48
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50

4.1 Compostos sintéticos.....	50
4.2 Coleta de macrófagos peritoniais.....	50
4.3 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoniais	50
4.4 Cultivo dos parasitas	51
4.5 Atividade biológica em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
4.6 Ensaio de marcação Anexina-FITC e PI em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
4.7 Atividade biológica em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	53
4.8 Cultura de macrófagos peritoniais para obtenção de sobrenadantes	54
4.9 Análise da produção de óxido nítrico	54
4.10 Dosagens de citocinas em sobrenadantes	54
4.11 Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Síntese dos compostos	56
5.2 Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos peritoniais	56
5.3 Atividade biológica contra promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
5.4 Atividade biológica sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
5.5 Mecanismos de morte celular induzidos pelos compostos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	62
5.6 Produção de óxido nítrico	63

5.6.1 Produção de NO por macrófagos não infectados tratados e controles	63
5.6.2 Produção de NO por amastigotas intracelulares tratadas e controles	67
5.7 Análise da produção de citocinas	69
5.7.1 Fator de necrose tumoral (TNF).....	69
5.7.1.1 Quantificação de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares	69
5.7.1.2 Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos.....	71
5.7.2 Interleucina 12 (IL-12)	73
5.7.2.1 Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares	73
5.7.2.2 Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS.....	75
5.7.3 Interleucina 10 (IL-10)	79
5.7.3.1 Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares	79
5.7.3.2 Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS.....	80
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	95
8 PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE 1 – Metodologias sintéticas	110
APÊNDICE 2 – Gráficos de inibição de crescimento de promastigotas.....	138
APÊNDICE 3 – Gráficos de inibição de crescimento de amastigotas	142
ANEXO 1 – Documento da comissão de ética no uso de animais.....	144
ANEXO 2 – Artigo submetido ao Journal of Antimicrobial Chemotherapy.....	145

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear, determinando as formas clínicas cutânea, mucocutânea e visceral, na dependência da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro. Estas doenças são transmitidas por flebotomíneos e estão presentes em cerca de 88 países, com 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e cerca de 1 a 2 milhões de novos casos registrados a cada ano (WHO, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde relata uma incidência de 28 mil casos por ano constituindo ainda um sério problema de saúde pública e estando presente em todas as regiões do país (BRASIL, 2011).

Um espectro de formas clínicas pode se desenvolver na dependência das características da resposta imune mediada por células, sendo a leishmaniose cutânea a manifestação clínica mais frequente. No Brasil já foram identificadas sete espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. O presente trabalho tem como alvo a *Leishmania amazonensis*, espécie encontrada na maioria dos estados brasileiros (BRASIL, 2007).

Dentre as medidas tomadas como controle para o combate da doença estão: controle de vetores e animais reservatórios, diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos. Para esta última medida, a principal opção terapêutica é representada pelos antimoniais pentavalentes, que são drogas utilizadas há mais de 70 anos no tratamento de leishmaniose cutânea e visceral e a cerca de 20 anos vem sendo relatados casos de resistência do parasita (MINODIERA; PAROLAB, 2007). Outras limitações de seu uso estão no alto custo e na necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração, evidenciando a urgência da busca por novas drogas com menor custo associado e com menos efeitos colaterais (CROFT et al., 2006; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2012; SEN; CHATTERJEE, 2011).

Neste contexto estão inseridos os compostos derivados da estrutura da tiossemicarbazona e da ftalimidas, que apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem importante classe de compostos sintéticos cujas propriedades têm sido bastante estudadas devido à possibilidade de manipulação de seus radicais, com coordenação de seu mecanismo de ação (BERALDO, 2004). Dentre as atividades biológicas promissoras, foi demonstrado o potencial anticonvulsivante, antimicrobiano, larvicida, antiviral, antiparasitário e antitumoral destes compostos (GREENBAUM et al., 2004; HASHIMOTO, 2008; HERNANDES et al., 2010; MISHRA et al., 2002; PESSOA et al., 2010).

A atividade de compostos derivados a partir da estrutura das tiossemicarbazonas sobre *Trypanossoma cruzi* está associada à inibição da cruzaina, uma cisteína protease encontrada abundantemente em tripanossomatídeos, que recebeu esse nome por de ter sido identificada inicialmente em *T. cruzi* (GREENBAUM et al., 2004; HERNANDES et al., 2010). As cisteíno-proteases de *Leishmania* ocorrem em grandes quantidades em volumosos lisossomas, denominados de megassomas, que são particularmente abundantes em amastigotas, forma presente no hospedeiro vertebrado. Estas enzimas semelhantemente à cruzaina desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação de sua resposta imune, constituindo assim atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses (MOTTRAM et al., 2004).

Outra classe de compostos bastante promissora para o desenvolvimento de quimioterápicos são as ftalimidas. As ftalimidas são conhecidas pelas suas propriedades imunomoduladoras, atuando na regulação de citocinas como TNF, IFN- γ e as interleucinas 2, 4, 5, 6, 10 e 12. Os efeitos mais importantes das ftalimidas estão relacionados à regulação bidirecional do TNF, uma citocina bastante importante no curso da infecção por leishmania (HASHIMOTO, 2002). Neste trabalho houve a hibridação do grupamento ftalimida com grupo tiazolil-hidrazona visando à junção de dois grupos com potencial inibição de cisteína protease (HERNANDES et al., 2010), com o papel imunomodulatório presente nas ftalimidas, que podem atuar sobre macrófagos estimulando a produção de fator de necrose tumoral e óxido nítrico, que são componentes imunológicos fundamentais para o controle de doenças causadas por tripanossomatídeos.

Tendo em vista o fato de ainda não existirem compostos que atuem com mais seletividade sobre o parasita causador da leishmaniose sem causar tantos danos ao homem, estudos sobre novos agentes terapêuticos continuam a ser bastante relevantes sob o ponto de vista da saúde pública. Neste estudo avaliamos a atividade leishmanicida de 22 produtos sintéticos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona e híbridos ftalil- hidrazona- tiazol, determinando a toxicidade desses compostos sobre macrófagos e a atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, além de avaliar seu potencial imunomodulatório sobre macrófagos infectados e não infectados com os parasitas. Esperamos com o desenvolvimento de o presente projeto poder contribuir efetivamente para a busca de novos quimioterápicos contra a leishmaniose.

1 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a potencial atividade imunomoduladora e leishmanicida de derivados de tiossemicarbazona e ftalimidas.

2.2 Específicos

- a) Avaliar em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos a atividade citotóxica dos diferentes compostos obtidos por meio sintético e estimar o índice de seletividade (ISE) destes compostos para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*;
- b) Determinar através de curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* a IC₅₀;
- c) Investigar através da citometria de fluxo o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos nas formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- d) Avaliar *in vitro* o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos durante o tratamento com os compostos, determinando a IC₅₀;
- e) Analisar em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* o efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico;
- f) Verificar em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* o efeito dos compostos sobre a produção das citocinas TNF (fator de necrose tumoral), IL(interleucina)-12 e IL-10.

3 REVISÃO DA LITERATURA

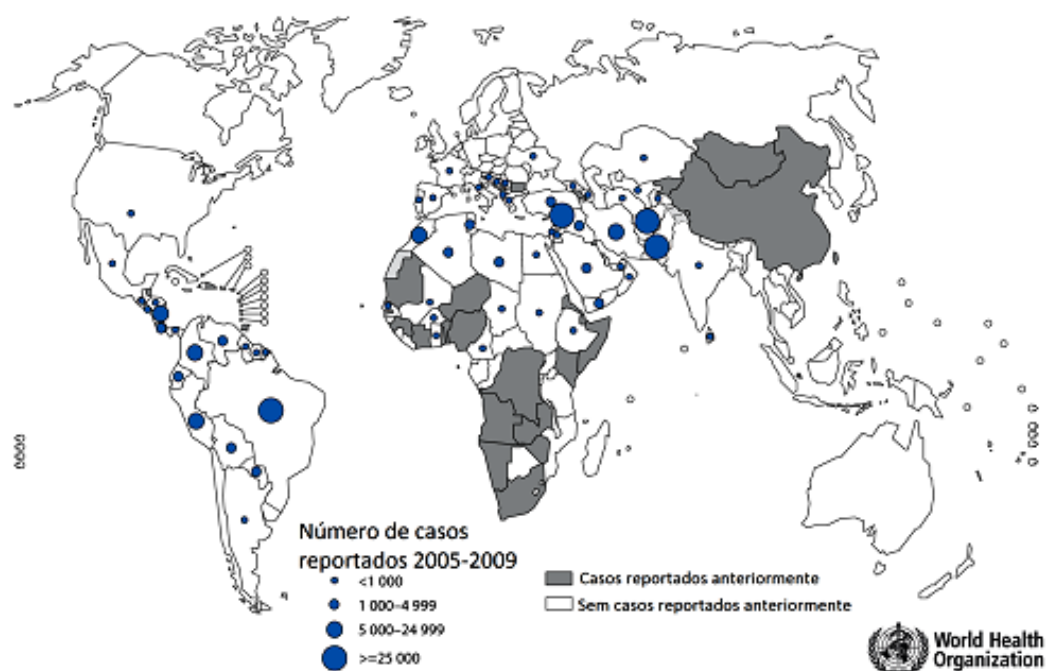
3.1 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa. Ela é causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), constituindo ainda um dos maiores problemas de saúde pública. A doença afeta cerca de 88 países na Europa, Ásia, África e América (Figura 1). Cerca de 90% dos casos ocorrem no Marrocos, Etiópia, Tunísia, Afeganistão, Paquistão, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Nas Américas, a LTA ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; WHO, 2010).

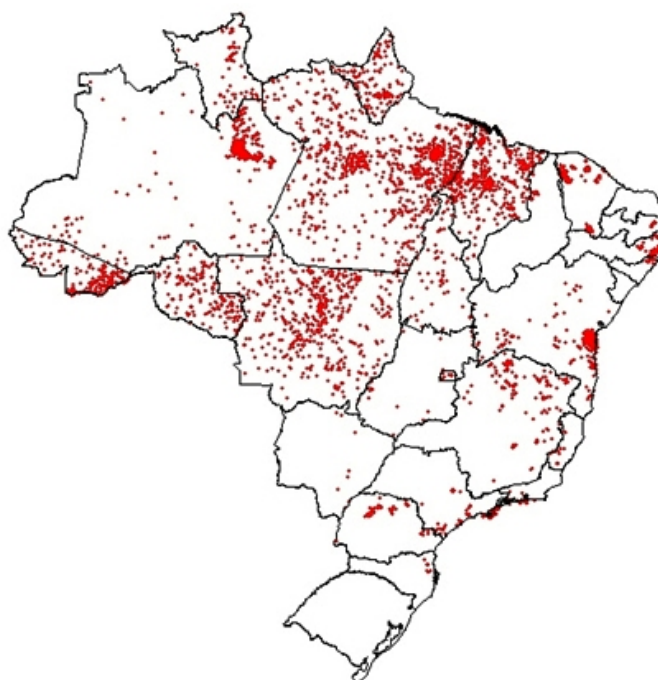
Estima-se que a Leishmaniose Tegumentar americana (LTA) tenha 1-1,5 milhões de novos casos a cada ano e que haja cerca de 12 milhões de pessoas atualmente infectadas (WHO, 2010). No entanto, a subnotificação ainda é um fato presente, pois dos 88 países considerados endêmicos, a notificação é obrigatória em apenas 32 deles, incluindo o Brasil (WHO, 2010). Além disso, devido à deficiência de diagnóstico e ausência de sintomas, os números de casos de leishmaniose tegumentar são provavelmente subestimados (GONZALEZ *et al.*, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007; WHO, 2010).

No Brasil, na década de 80 foram registrados casos em 20 estados, e, a partir do ano de 2001 em todos os estados foram notificados casos da doença. Em 2003 a LTA tornou-se presente em todos os estados brasileiros devido à expansão geográfica acentuada (BRASIL, 2007) (Figura 2). No período de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 27.093 casos, com tendência de crescimento entre os anos 1980 e 2003 (BRASIL, 2011; SOUZA, 2010) (Figura 3).

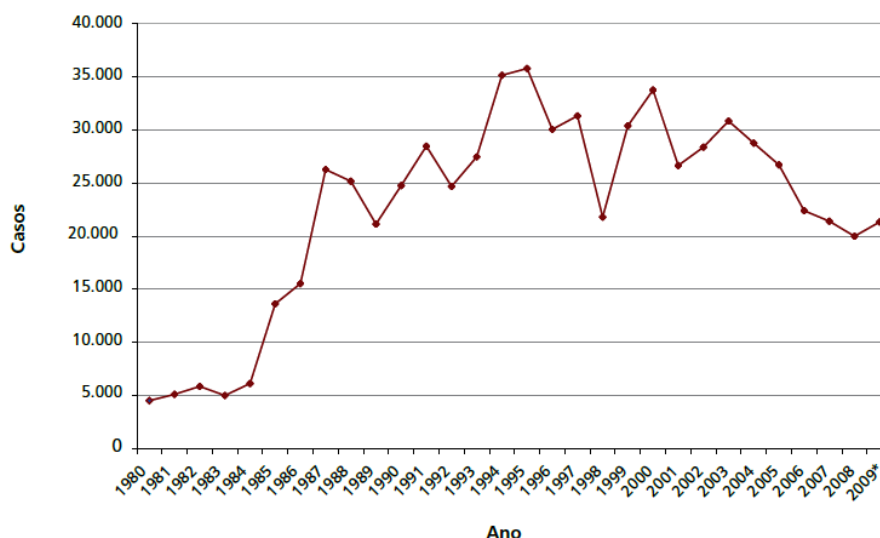
A LTA apresenta incidência acentuada em todas as regiões do estado de Pernambuco, porém concentrando na Zona da Mata cerca de 60% dos casos registrados (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2008). Também tem sido registrado o aumento da ocorrência da LTA no Sertão do Estado (ANDRADE *et al.*, 2009).

Figura 1 - Distribuição mundial da LTA

Fonte: World Health Organization (2009)

Figura 2 - Distribuição da LTA no Brasil no ano de 2007

Fonte: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/lt/situacao-da-lt-no-brasil/>
Nota: 1 ponto = 5 casos

Figura 3 - Casos de LTA no Brasil (1980-2009)

Fonte: BRASIL, 2011

Nota: Dados atualizados em abril/2010

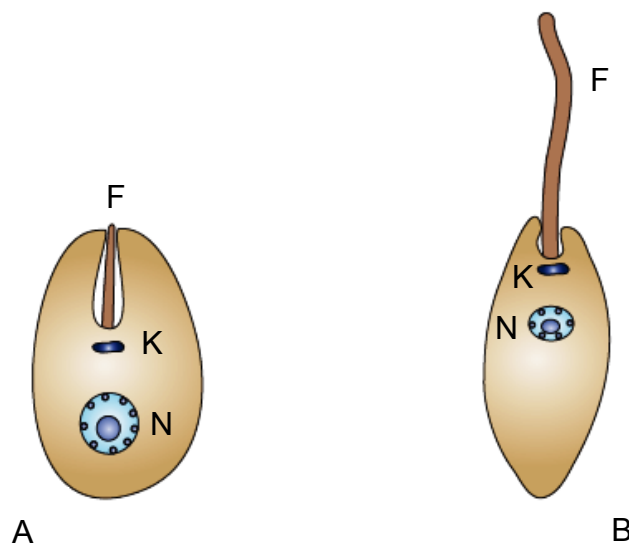
3.2 Agentes etiológicos e vetores

O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000). Os parasitas do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, sendo esta classificação baseada no desenvolvimento do parasita no inseto vetor.

As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Já os do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção suprapilária) (LAINSON; SHAW, 1998).

O parasita do gênero *Leishmania* sp. apresenta-se na forma flagelada promastigota, forma com motilidade flagelar encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, amastigota, forma não móvel encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero (DEDET et al., 1999; GOTO; LINDOSO, 2010) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática forma amastigota (A) e promastigota (B) de *Leishmania* sp. mostrando o núcleo (N), flagelo (F) e cinetoplasto (K).



Fonte: Adaptado de Docampo et al., 2005

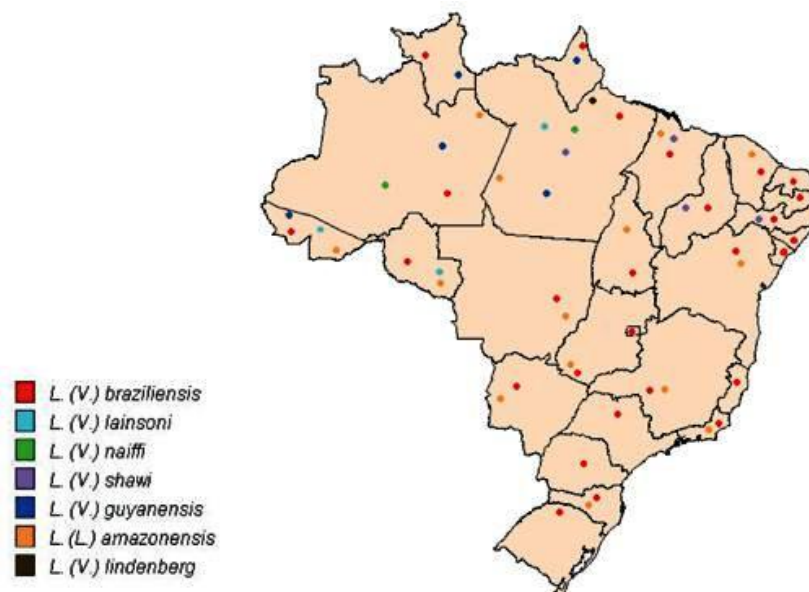
Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de LTA. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (Figura 5). A espécie de leishmania alvo deste trabalho é a *L. (L.) amazonensis*.

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Brasil se distribui em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), também na Bahia, em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná. No homem ela é responsável pela leishmaniose cutânea e cutâneo-difusa ou anérgica, onde esta última não responde aos diversos tipos de tratamento (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

As espécies de *Leishmania* sp. capazes de causar infecção em humanos também são conhecidas por acometer alguns pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos que constituem a fonte de infecção para os insetos vetores das leishmanioses, os flebotomíneos (GAZOZAI et al., 2010). Estes insetos pertencem à ordem Díptera, família Psychodidae e gênero *Lutzomyia* (Figura 6). Aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* têm a sua capacidade de transmissão

da *Leishmania* sp. comprovada nas Américas (JACOBSON, 2010; LAINSON; SHAW, 1998). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2007).

Figura 5 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose cutânea no Brasil



Fonte: BRASIL, 2007

Figura 6 - Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo *Lutzomyia* sp.



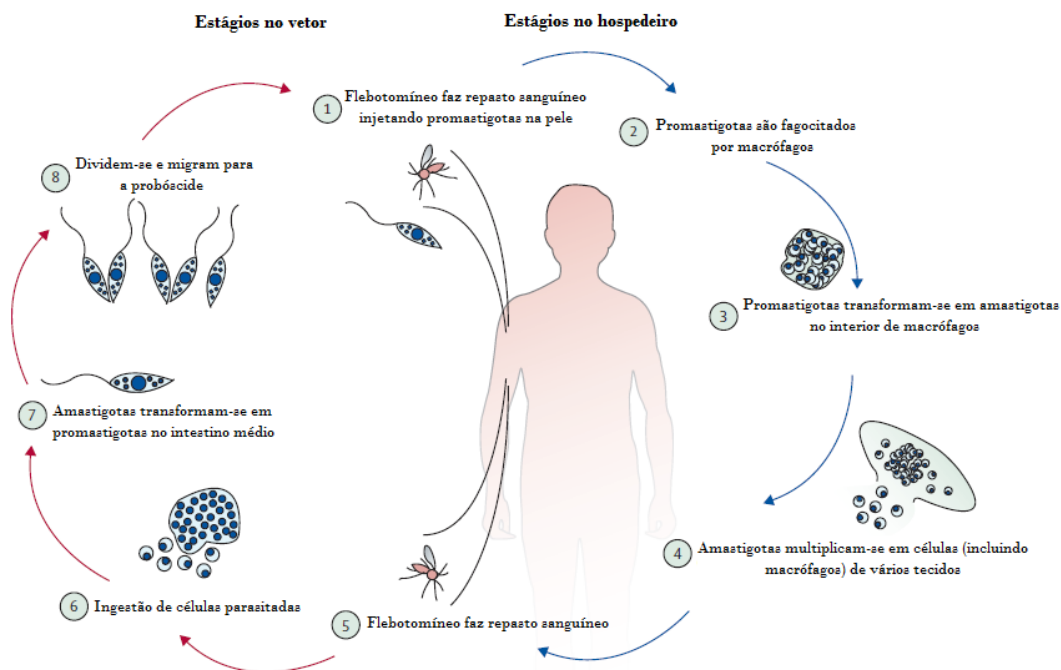
Fonte: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>

3.3 Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

O ciclo evolutivo da *Leishmania* sp. inicia-se quando o vetor faz o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. As formas amastigotas do parasita se alojam nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos em que vivem, e reproduzem-se de forma assexuada por divisão binária até romperem a célula, disseminando-se pelas vias hematogênica e linfática (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; CARVALHO, 2003). No momento do repasto sanguíneo a fêmea do flebotômíneo ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas e em seu trato digestivo estes se rompem liberando o parasita. Este se aloja em partes do intestino, transformando-se na forma promastigota.

No intestino do inseto ocorre diferenciação das formas promastigotas em paramastigotas, que permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal através de hemidesmossomas, onde ainda se dividem. Novamente ocorre transformação em promastigotas que migram através do estômago em direção à faringe do inseto. A metaciclogênese ocorre durante a migração no trato digestivo do vetor, em que as células atingem um estado infectivo (BASANO; CAMARGO, 2004).

Durante o repasto sanguíneo do vetor, agora infectado, ocorre a transmissão do parasita. Formas promastigotas são inoculadas através da picada e, após um período de quatro a oito horas, são interiorizadas pelos macrófagos do hospedeiro, diferenciando-se novamente em formas amastigotas. Estas se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (Figura 7) (REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 7 - Ciclo de vida da Leishmania sp.

Fonte: Modificado de REITHINGER *et al.*, 2007

3.4 Manifestações clínicas

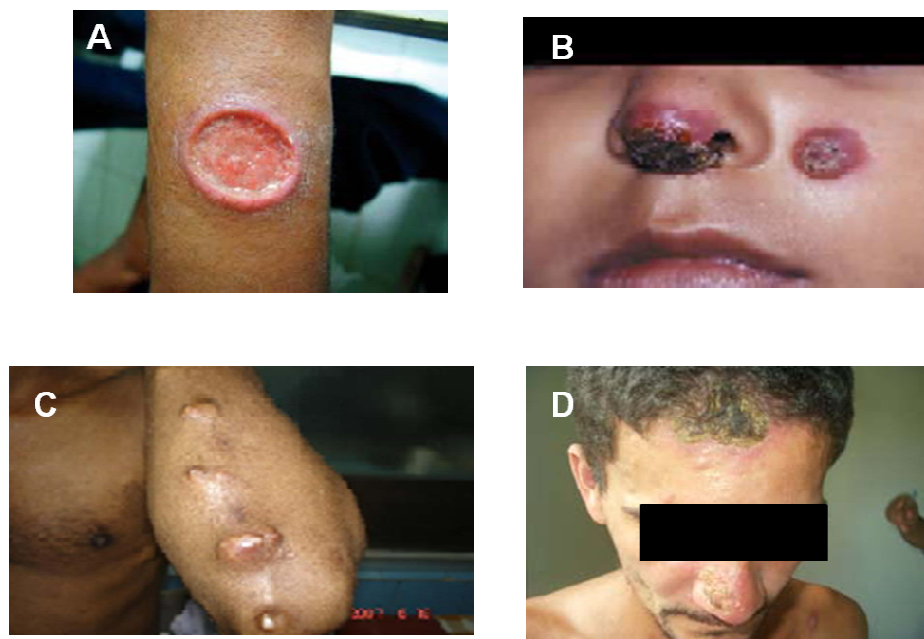
A infecção humana na LTA pode ser assintomática ou apresentar um espectro de formas clínicas que podem variar desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas, difusas ou nodulares até as graves lesões mucocutâneas (CLEM, 2010). A úlcera típica da LTA é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado. Mede de alguns milímetros até alguns centímetros e possui base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações grosseiras. É comum a infecção bacteriana estar associada, podendo causar dor local e exsudato (Figura 8) (BRASIL, 2007).

As lesões cutâneas podem ainda apresentar-se morfologicamente como: impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, o que dificulta ainda mais o diagnóstico clínico. Nas lesões mucocutâneas, podem ser

observadas úlceras infiltrantes ou úlceras vegetantes (ANDRADE et. al, 2005). Também pode haver acometimento da região nasofaríngea, laringe e cavidade oral, e ela apresenta natureza metastática (BRASIL, 2007). As lesões podem ser confundidas com doenças infecciosas como paracoccidioidomicose, histoplasmosse, sífilis e com neoplasias, por isso há a necessidade de um diagnóstico preciso (ÁVILA et. al, 2004).

A infecção causada por *L. amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente em alguns indivíduos, há o desenvolvimento do quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD). Há evidências de que *L. amazonensis* tem uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune eficaz. Na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, este se multiplica sem controle, aumentando o numero de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal.

Figura 8 - Caracterização das diferentes manifestações clínicas da LTA.



Legenda: (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada.

3.5 Diagnóstico

Em virtude das diversas manifestações clínicas, o diagnóstico da LTA é relativamente difícil, sendo indispensável a diferenciação desta doença com outras de causas distintas, mas com espectro clínico similar, como a hanseníase, câncer de pele, tuberculose e micoses cutâneas (REITHINGER et al., 2007).

Dentre as técnicas laboratoriais utilizadas, a pesquisa direta é o procedimento de primeira escolha por ser rápido, de fácil execução e ter menor custo. O material a ser analisado pode ser obtido da escarificação da borda da lesão, impressão por aposição em lâmina (*imprint*) ou aspirado da lesão, corado pelo Giemsa ou Leishman. Embora a técnica seja específica, pois evidencia as formas amastigotas do parasito, é necessário um profissional treinado para realizá-la, além de apresentar sensibilidade inversamente proporcional à carga parasitária presente na lesão (BAILEY; LOCKWOOD, 2009; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste de hipersensibilidade tardia que apresenta uma alta sensibilidade e uma especificidade que varia de acordo com o antígeno utilizado. Embora apresente resultado positivo na maioria dos casos de LTA (90%), o resultado é negativo em lesões recentes, na forma cutânea difusa e em pacientes imunodeprimidos.(VEGA-LÓPEZ, 2003).

Os testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI), o Ensaio imunoenzimático (ELISA) e o Western Blot, são limitados por não relacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, além da possibilidade de apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, como o *Trypanosoma cruzi*. Pelas limitações dessas técnicas, abordagens imunológicas alternativas vêm sendo empregadas. Uma delas é a citometria de fluxo que permite detectar anticorpos anti-*Leishmania*, e tem demonstrado resultado semelhante ao obtido com IFI (OLIVEIRA et al., 2013; ROCHA et al., 2006).

Técnicas de diagnóstico molecular baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido extensivamente desenvolvidas para a aplicação na LTA. Com alta sensibilidade e especificidade, são particularmente úteis em amostras contendo poucos parasitas, como na forma mucosa, além de permitir o monitoramento da terapia da leishmaniose cutânea. Contudo, o uso rotineiro é ainda

impedido por demandar uma infraestrutura laboratorial adequada, pessoal qualificado e alto custo (GOMES et al., 2012).

Há a necessidade da associação de parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais com a finalidade de se obter um diagnóstico fidedigno. No exame clínico, é interessante associar as informações coletadas através da anamnese do paciente a dados epidemiológicos. Dentre eles estão a existência de casos de LTA na região, referência de cães com lesões residindo nas proximidades, procedência de área endêmica e inserção de áreas florestais.

3.6 Aspectos imunológicos

3.6.1 Resposta celular

Embora títulos de anticorpos sejam observados em todas as manifestações clínicas, a resolução da infecção é dependente de linfócitos T e sabe-se que, nas infecções por *Leishmania*, há o desenvolvimento de resposta imune predominantemente celular por parte do hospedeiro, onde ocorre uma expansão caracterizada por células T CD4+, apresentando perfis de citocinas Th1 ou Th2 (PINHEIRO, 2004; REIS et al., 2006).

No perfil Th1, citocinas como IFN- γ e TNF estão envolvidas na resistência e eliminação dos parasitas, enquanto citocinas do tipo Th2, como a IL-4 e IL-10 estão ligadas à susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (ALEXANDER, BRYSON, 2005; COUTINHO et al., 1996; VON STEBUT, 2007).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada nos últimos 30 anos para elucidar aspectos da relação parasita-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasita-macrófago (REIS et al., 2006; ROCHA et al., 2007).

Na leishmaniose cutânea, os estudos mais aprofundados da resposta imune adaptativa foram desenvolvidos em camundongos isogênicos infectados com *L. major*. Os estudos têm mostrado que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante na evolução da infecção para a cura ou

desenvolvimento de doença grave (MATTNER *et al.*, 1996; REITHINGER *et al.*, 2007; SCOTT; FARREL, 1998).

Estes estudos revelam que camundongos susceptíveis apresentam lesões cutâneas no sítio de inoculação do parasita, enquanto os camundongos resistentes parecem curar-se rapidamente. A resistência ao parasita é conferida por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1, enquanto a susceptibilidade é conferida por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 (REIS *et al.*, 2006). Linfócitos T CD4⁺ que apresentam o perfil Th1 têm sua diferenciação estimulada pelas citocinas IL-12 e IFN- γ e produzem citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF), interleucina IL-2 e IL-12. Células que apresentam o perfil Th2 são estimuladas por IL-4 e produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (REIS *et al.*, 2009; SAKAGUCHI *et al.*, 2008)

A linhagem de camundongos endogâmicos BALB/c mostra-se susceptível à infecção com *L. amazonensis* (CALABRESE *et al.*, 1992), onde apresenta uma lesão primária progressiva ou múltiplas lesões metastáticas, apresentando o perfil de resposta Th2 e,consequentemente, uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (HIMMELRICH *et al.*, 2000; KANE; MOSSER, 2001; PADIGEL *et al.*, 2003; PASSERO *et al.*, 2010).

A IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo a produção de IFN- γ , levando ao desenvolvimento da resposta Th2 (CARRERA *et al.*, 1996; GOLLOB *et al.*, 2008; NATEGHI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 1994). A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrófagica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c IL10^{-/-} mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção por *L. major* (KANE; MOSSER, 2001).

Em humanos, a resposta imune ainda não foi completamente elucidada. Porém, sabe-se que em todas as formas clínicas da doença a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2 (REIS *et al.*, 2006, BRELAZ *et al.*, 2012). Na forma cutânea localizada, há uma forte resposta de linfócitos T, com citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e TNF. As lesões mucocutâneas são caracterizadas por uma mistura de resposta dos tipos Th1 e Th2. Já pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2, com produção de citocinas como IL-4 e IL-10

(REIS *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 1998). Em alguns trabalhos, foi descrito também o perfil Th3, induzido por TGF- β , que pode induzir e manter a tolerância periférica através de células T regulatórias (BELKAID, 2007).

As células T regulatórias (Treg) que se acumulam no local da lesão, por sua vez, estão relacionadas à regulação das células efectoras locais, podendo ser naturais ou induzidas. Citocinas como IL-2 e TGF- β e substâncias como o ácido retinóico facilitam a diferenciação de células T *naïve* em Treg induzidas que expressam o fator de transcrição Foxp3 (SAKAGUCHI *et al.*, 2008; KAUFMANN, KUCHROO, 2009).

Estudos recentes têm evidenciado também o subtipo celular conhecido como Th17, relacionado com a produção de IL-17. A princípio, IL-17 está envolvida com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes (SCHMIDT-WEBER *et al.*, 2007; OUKKA, 2007). IL-17 aumenta a produção de múltiplos mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF e NOS2.

As células Th17 diferenciam-se a partir de linfócitos T CD4⁺ *naïve* na presença de TGF- β e IL-6 (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; DONG, 2008). A citocina TGF- β é também responsável pela indução de Foxp3, porém a citocina IL-6 atua na supressão da indução deste fator de transcrição. Deste modo, as duas citocinas em conjunto atuam na diferenciação de células Th17 (KAUFMANN; KUCHROO, 2009; DONG, 2008).

3.6.2 Óxido nítrico

O controle da leishmaniose via resposta Th1 através da ação das citocinas IFN- γ e TNF conduz à ativação de macrófagos e eliminação de parasitas intracelulares através da indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com consequente síntese de NO a partir de L-arginina (GREEN *et al.*, 1994; HOLZMULLER *et al.*, 2002). Essa relação entre o aumento da produção de NO pelos macrófagos ativados e a resistência à leishmaniose está bem estabelecida em humanos e em modelo murino (EVANS *et al.*, 1993; HOLZMULLER *et al.*, 2002; VOULDOUKIS *et al.*, 1997).

O NO tem a capacidade de inativar numerosas enzimas metabólicas do parasita a partir da formação de complexos ferro-ditrirosil-dithiolato. Na leishmaniose, os parasitas possuem a enzima superóxido dismutase e a inativação

desta enzima diminuiria a habilidade do parasita de resistir ao ataque por intermediários de oxigênio reativo, resultando em sua morte intracelular (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; JAMES, 1995; LIEW *et al.*, 1990).

Por outro lado, a produção de NO pode ser regulada pelo fator β de crescimento e transformação (TGF- β). Neste caso, o parasita estimula a produção desta citocina, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ . A indução de TNF ou TGF- β depende da presença e quantidade de IFN- γ no início da infecção (GREEN *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2005). Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ atuam como fonte produtora dessas citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos (ABBAS, 2008; BRELAZ *et al.*, 2012).

3.6.3 Suscetibilidade e resistência à infecção

As manifestações clínicas na LTA são variáveis e dependentes de características do parasita, do vetor, e do hospedeiro vertebrado, incluindo a sua constituição genética e estado imunológico (MARZOCHI, 1992; GRIMALDI; TESH, 1993; REIS *et al.*, 2009). Dependendo da espécie do parasita e da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, a infecção causa um espectro de doença que varia de lesões autocicatrizantes a infecções disseminadas e fatais, o que caracteriza a resistência e a suscetibilidade do hospedeiro à infecção pelo parasita (ROMÃO *et al.*, 2007).

Em se tratando de *L. amazonensis*, apesar dessa espécie ser associada à forma cutânea da doença em humanos, estudos realizados em camundongos suscetíveis demonstram que a visceralização é um fenômeno frequente e pode ser visualizada em vários órgãos como cérebro, fígado, baço e medula óssea. Os mecanismos genéticos que determinam susceptibilidade e/ou resistência à infecção por *Leishmania* são dependentes de, pelo menos, dois componentes: um relacionado com a capacidade dos macrófagos hospedeiros para suportar ou inibir a multiplicação do parasita e a outra para controlar a magnitude, a qualidade, e a reação do sistema imunitário contra o parasita (CARDOSO *et al.*, 2010).

Há estudos que também levam em consideração o papel da saliva do inseto vetor no perfil imunológico da doença, que tem se mostrado crucial para o

estabelecimento da infecção e patogênese da doença. A saliva é vasodilatadora e aumenta o eritema, aumenta a carga parasitária, o tamanho da lesão e a persistência do parasita após a inoculação com *L. major*, *L. amazonensis*, e *L. braziliensis*, e a variação intra-específica de componentes da saliva determina o resultado clínico após infecção *L. infantum*. A base imunológica para essas descobertas não é totalmente compreendido, mas parece que as proteínas da saliva podem mudar a resposta imune adaptativa de um perfil Th1 a uma resposta imune mediada por células Th2, por exemplo, através do aumento da produção de IL-4 e IL-6, ou inibindo o TNF, IFN- γ , IL-12, e a produção de NO (REITHINGER *et al.*, 2007).

3.7 Medidas de controle e tratamento

O controle das leishmanioses está fundamentado na implantação de programas de prevenção, tratamento das formas clínicas, extermínio de cães infectados e controle dos vetores, este último envolvendo a pulverização de residências com inseticidas residuais (COSTA, 2005; DESJEUX, 2001).

A falta de uma vacina, a ausência de ferramentas terapêuticas adequadas e o alto custo das opções terapêuticas existentes, são os principais obstáculos encontrados para a prevenção e o controle das leishmanioses (MURRAY *et al.* 2005).

O tratamento convencional de todas as manifestações da LTA é realizado através da quimioterapia com antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), cuja droga de primeira escolha utilizada no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). A administração do medicamento é feita por via intramuscular ou endovenosa, com a dose variando de 10 a 20 mg Sb^{+5} /Kg/dia, durante vinte ou trinta dias.

Dentre os efeitos colaterais que podem surgir estão artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Em alguns pacientes, no início do tratamento pode haver exacerbação do quadro clínico com o aumento do infiltrado,

do eritema, das secreções nasal e faríngea, mas presume-se que isso decorra de uma resposta aos antígenos liberados com a morte do parasito (BRASIL, 2007).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente elucidado, embora alguns autores sugiram que a molécula pentavalente (Sb^{+5}) atue como uma pró-droga que, ao ser convertida em antimonial trivalente (Sb^{+3}), passa a ser ativa e adquire maior toxicidade contra o parasito, interferindo na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania* sp. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2007; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Sendo o antimonial pentavalente a principal droga utilizada para o tratamento da leishmaniose a mais de 70 anos, a ausência de resposta durante o seu uso e casos de resistência de cepas do parasita vem sendo relatadas, sendo bastante comum na Índia, onde pode ser observada até 60% de insucesso no tratamento devido à resistência (MURRAY et al., 2005; SUNDAR, 2001; SUNDAR; CHATTERJEE, 2006; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

A resistência dos parasitas está envolvida possivelmente com os mecanismos de ação dos antimoniais, dentre eles: o mecanismo de oxirredução, onde a redução *in vivo* de complexos Sb^{+5} para compostos mais tóxicos de Sb^{+3} (CHAI et al, 2005; DEMICHELI et al, 2002). Em geral, essa resistência é adquirida durante o tratamento (ROJAS et al., 2006) e varia de 10 a 40% dos casos (O'NEAL et al., 2007).

Também relacionando-se o mecanismo de ação ao desenvolvimento da resistência, observa-se que uma vez que esta é estabelecida para complexos trivalentes, há alta incidência de resistência cruzada para complexos pentavalentes, porém surpreendentemente há aumento da suscetibilidade a drogas de segunda escolha como pentamidina e anfotericina B (SERENO et al, 2000).

A ação do antimonial na forma amastigota é através de transporte desconhecido ou pela aquaporina (AQP1). No parasito, o Sb^{+5} pode ser convertida a Sb^{+3} por tióis ou por redutases ACR2 ou TRD1. provavelmente Sb^{+3} interage com algum alvo celular, formando conjugados com vários tióis- como a cisteína, glutatona e tripanotona. Não se conhece onde a formação desses conjugados é enzimaticamente mediada ou não. Em casos de resistência, os níveis de tripanotona estão elevados (OUELLETTE et al., 2004).

No caso de não haver uma boa resposta ao tratamento com Glucantime® ou na impossibilidade de seu uso, a Anfotericina B é uma das drogas de segunda escolha, ou de primeira escolha no caso de gestantes. Sua administração se dá por via endovenosa, gota a gota, na dose diária de 0,2 mg/Kg/dia até no máximo 50 mg (BRASIL, 2007).

A Anfotericina B apresenta toxicidade seletiva por sua interferência no precursor do ergosterol presente na membrana citoplasmática de *Leishmania*. Dentre os mais frequentes efeitos adversos estão febre, náuseas, vômitos, hipocalcemia e flebite no local da infusão (BRASIL, 2007).

Outra alternativa de tratamento é a pentamidina, usada na dose de 4 mg/Kg/dia, de dois em dois dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2g, por via intramuscular. O critério de cura utilizado é o clínico, com a completa cicatrização da lesão e acompanhamento do paciente por até um ano após o término do tratamento. O uso da pentamidina, assim como o da Anfotericina B apresenta efeitos colaterais frequentes e graves, como alterações renais, cardíacas e hepáticas além de alto custo de tratamento e necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração (BRASIL, 2007).

O sucesso do tratamento da leishmaniose está sujeito à imunidade celular, independentemente da droga utilizada, e em pacientes com co infecção HIV-leishmaniose o tratamento tende mais ainda ao insucesso - entre 40% e 65% (CHRISTOPHER et al., 2007).

Olliaro (2010) propõe que a monoterapia não seria ideal, visto que podem causar maiores chances de resistência aos fármacos. Embora a resistência do parasito à Anfotericina B não tenha sido descrita ainda, a possibilidade de se empregar combinações de fármacos para as leishmanioses visa prevenir de forma mais eficaz sua resistência, reduzir a longa duração dos tratamentos, favorecer a aderência e cobertura, reduzir custos diretos e indiretos da terapêutica.

Outro importante fator para o surgimento da resistência à terapia, seria a inadequação dos pacientes aos regimes terapêuticos (OLLIARO, 2010). Nesse sentido Cattand *et al.* (2006) destacam a importância dos serviços de saúde promoverem a adesão dos portadores ao tratamento das Leishmanioses, pois é comum pacientes que vivem em áreas sem recursos interromperem a terapêutica, promovendo a consequente seleção de cepas resistentes do parasito e recidivas mais severas das doenças. Nessas situações, tanto a leishmaniose tegumentar,

quanto a visceral, podem tornar-se enfermidades crônicas e debilitantes, causarem a incapacidade dos portadores para atividades de vida diária e o trabalho, tornando-os ainda mais vulneráveis as precárias condições de vida, pobreza, desnutrição e infecções secundárias.

Em virtude do alto índice de falha terapêutica, do curso prolongado e do desenvolvimento de espécies resistentes tem-se buscado opções terapêuticas associadas ao tratamento padrão com antimoniais. Os imunomoduladores se destacam nesse arsenal, visto que a leishmaniose se mostra uma enfermidade essencialmente imuno-mediada (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998)

Dentre esses imunomoduladores pode-se citar estudos com Imiquimode que tem sido realizados há mais de uma década. Esta droga ativa os receptores *toll like* (7 e 8) presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno, aumentando a produção de IFN- γ , TNF, IL-1e IL-12, estimulando macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), favorecendo a morte do parasito pela indução da resposta Th1. Pode também ativar diretamente o macrófago infectado com a forma amastigota. No entanto, de forma isolada, o Imiquimode pode reduzir o tamanho da lesão, mas não cura. Associado à Paramomicina ou Miltefosina atinge índices de cura de até 80% (MIRANDA-VERASTEGUI *et al.*, 2009).

Outra opção seria o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que pode acelerar a cura por 03 possíveis mecanismos: ativação de macrófagos, estímulo da cicatrização e modulação imunológica. O seu uso associado ao antimonial reduz a dose e o tempo de tratamento e, conseqüentemente, sua toxicidade (ALMEIDA *et al.*, 1999).

As vacinas também estão presentes entre as opções terapêuticas. Ensaio clínicos utilizando vacina composta pela forma promastigota de *L. amazonensis* foi realizado em 2002; e mostrou-se útil nos casos não responsivos a antimoniais isoladamente, com HIV ou que apresentassem a forma difusa da doença. A vacina possivelmente é capaz de induzir resposta Th1 pelo aumento de IFN- γ . A cura foi obtida associando-a ao antimonial (com dose reduzida em 50%) (MACHADO-PINTO *et al.*, 2002). Mayrink e colaboradores (2006) também obtiveram sucesso em tratamento utilizando terapia com antimonial associada à vacina de promastigotas com *L. amazonensis*, chegando ao índice de cura de 100% dos pacientes. No entanto, outros ensaios realizados em humanos, utilizando parasitas mortos e

proteínas recombinantes resultaram em imunidade de curta duração (SCHRIEFER *et al.*, 2008).

Atualmente, alguns testes clínicos com protótipos candidatos a vacinas podem ser encontrados. A vacina Leish-111f está na fase I e II de testes clínicos (tolerância, imunogenicidade, eficácia e segurança) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00111553>). Já a vacina LEISH-F2+MPL-SE, que consiste na proteína de leishmania LEISH-F2 e no adjuvante MPL-SE está na fase II (eficácia, segurança e imunogenicidade) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309>). Outra vacina, que consiste em formas autoclavadas de *L. major* associadas ao BCG e hidróxido de alumínio como adjuvante estão na fase II e III desses testes (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00429780>). Apesar dos avanços e promessas, principalmente em modelos animais, ainda não se tem disponível uma vacina humana (KEDZIERSKI, 2010; NYLEN; GAUTAM, 2010; ROBERTS, 2006).

Há vacinas existentes no mercado que são disponibilizadas apenas para cães, para evitar o acometimento pela forma visceral da doença. No Brasil, existe no mercado a Leishmune, do laboratório Fort Dodge Saúde Animal, registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) desde 2003. Além desta vacina, existe uma outra do laboratório Hertape, em que, após vacinação, o animal continua negativo no exame de IFI, diferente da vacina Fort Dodge. Apesar de essas vacinas apresentarem requisitos técnicos de eficácia, o Ministério da Saúde ainda não recomenda seu uso (Nota técnica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Visto que não há vacina disponível no mercado para uso em humanos e há dificuldades na execução do tratamento, como a via de administração da droga e presença de fortes efeitos colaterais, é de extrema importância salientar a necessidade de estudos com fármacos candidatos a novas drogas, na busca de tratamentos alternativos que proporcionem mais conforto aos pacientes e contribuam para novas estratégias de combate à LTA (TOLEDO *et al.*, 2001).

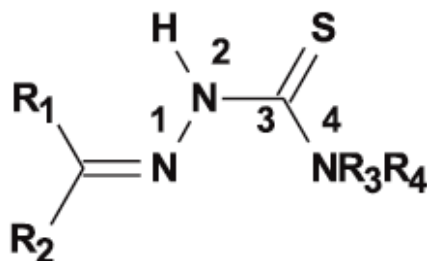
Tendo em vista a gravidade da ação das leishmanioses sobre o homem, o crescente aumento das áreas atingidas, o reduzido arsenal terapêutico e a crescente resistência do parasita ao tratamento, pesquisas no sentido de buscar alternativas que sejam mais eficazes, com menos efeitos colaterais e baixo custo associado são extremamente necessárias e recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010).

3.8 Tiossemicarbazonas

Dentro dos novos grupos de fármacos estudados e considerados promissores, estão as tiossemicarbazonas, que apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido bastante estudadas pela Química Medicinal Inorgânica devido à possibilidade de manipulação de seus radicais, com coordenação de seu mecanismo de ação (Figura 9) (BERALDO, 2004).

Dentre as atividades biológicas promissoras, foi demonstrado o potencial anticonvulsivante, antiviral, antiparasitário e antitumoral, além de ser a segunda classe mais importante de compostos antitumorais depois dos derivados do cisplatina. Seu potencial antimicrobiano também tem sido demonstrado, pois inibem o crescimento de bactérias gram positivas, tais como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis* e *Enterococcus D*, mas não são bons inibidores de bactérias gram negativas tais como *Pseudomonas*, *Klebsiella-Enterobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Proteus* (BERALDO, 2004; FINCH et al., 1999; GREENBAUM et al., 2004; MISHRA et al., 2002).

Figura 9 - Estrutura genérica das tiossemicarbazonas R, R1, R2, R3 = H, grupos arila ou grupos alquila



Estes compostos são obtidos geralmente pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos

dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (TENÓRIO et al., 2005). Neste contexto, a síntese de tiossemicarbazonas em escala industrial apresentaria vantagens em relação a moléculas cuja síntese é feita em várias etapas e/ou dão origem a vários produtos de reação.

O único composto da classe das tiossemicarbazonas a ser empregado clinicamente é a tioacetazona (4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona. A tioacetazona vem sendo utilizada em associação com a isoniazida desde 1960 no tratamento da tuberculose, com o intuito de prevenir o desenvolvimento de resistência a isoniazida. Entretanto, sua ação predominantemente bacteriostática, além dos efeitos colaterais como a indução de *diabetes mellitus* e reações cutâneas limitam sua utilização (BERALDO, 2004).

De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas agem como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox, seja através de interações com o DNA ou da inibição da síntese do DNA. Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas (BERALDO, 2004).

A atividade de compostos derivados das tiossemicarbazonas sobre *Trypanosoma cruzi* tem sido bastante estudada, demonstrando resultados promissores e com possível alvo já estabelecido (ENGEL et al., 1998; GREENBAUM et al., 2004). Essa atividade antiparasitária está associada à inibição da cruzaina (Figura 10), uma cisteína protease encontrada abundantemente em tripanossomatídeos, que recebeu esse nome devido ao fato de ter sido identificada inicialmente em *T. cruzi*. A cruzaina tem como funções: nutrição, replicação e diferenciação do parasita, remodelamento da célula do hospedeiro infectada e evasão dos mecanismos da resposta imune desse hospedeiro com consequente manutenção das doenças relacionadas aos parasitas (DU et al., 2002).

Figura 10 - Representação da estrutura da cruzaina, ligada a inibidor derivado de vinil sulfona



Fonte: PDB, código: 1F29

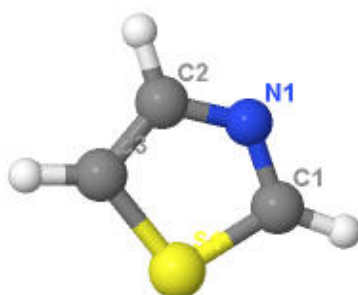
A descoberta de enzimas envolvidas na patogênese e na invasão de células do hospedeiro pelos tripanossomatídeos tem permitido o desenho de drogas alvo específicas, podendo assim combater o parasita, com consequências reduzidas para células do hospedeiro (HUNTER, 2009).

A atividade proteolítica em parasitas do gênero *Leishmania* foi primeiramente reportada por Pupkins e Coombs(1984) em promastigotas de *Leishmania mexicana* e as cisteína proteases foram as principais proteases detectadas. As cisteíno-proteases de *Leishmania* ocorrem em grandes quantidades em volumosos lisossomas, denominados de megassomas, que são particularmente abundantes em amastigotas, forma presente no hospedeiro vertebrado. Estas enzimas semelhantemente à cruzaina, desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação de sua resposta imune, constituindo assim atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses (MOTTRAM et al., 2004; SELZER et al., 1999)

3.9 Tiazóis

Outro grupo promissor como candidato a novos fármacos é formado pelos tiazóis (Figura 11). Os tiazóis constituem uma importante classe de compostos heterocíclicos que têm atraído um interesse contínuo ao longo dos anos devido a seu amplo espectro de atividades biológicas, sendo empregados no desenvolvimento de drogas para o tratamento de alergias, hipertensão, inflamação, esquizofrenia, infecções bacterianas e por HIV, hipnóticos, analgésicos e como antagonistas dos receptores de fibrinogênio com atividade antitrombótica (BONDACK et al., 2007; VICINI et al., 2003) .

Figura 11 - Representação estrutural do anel 1,3-tiazol.



Fonte: PDB, código: LOM

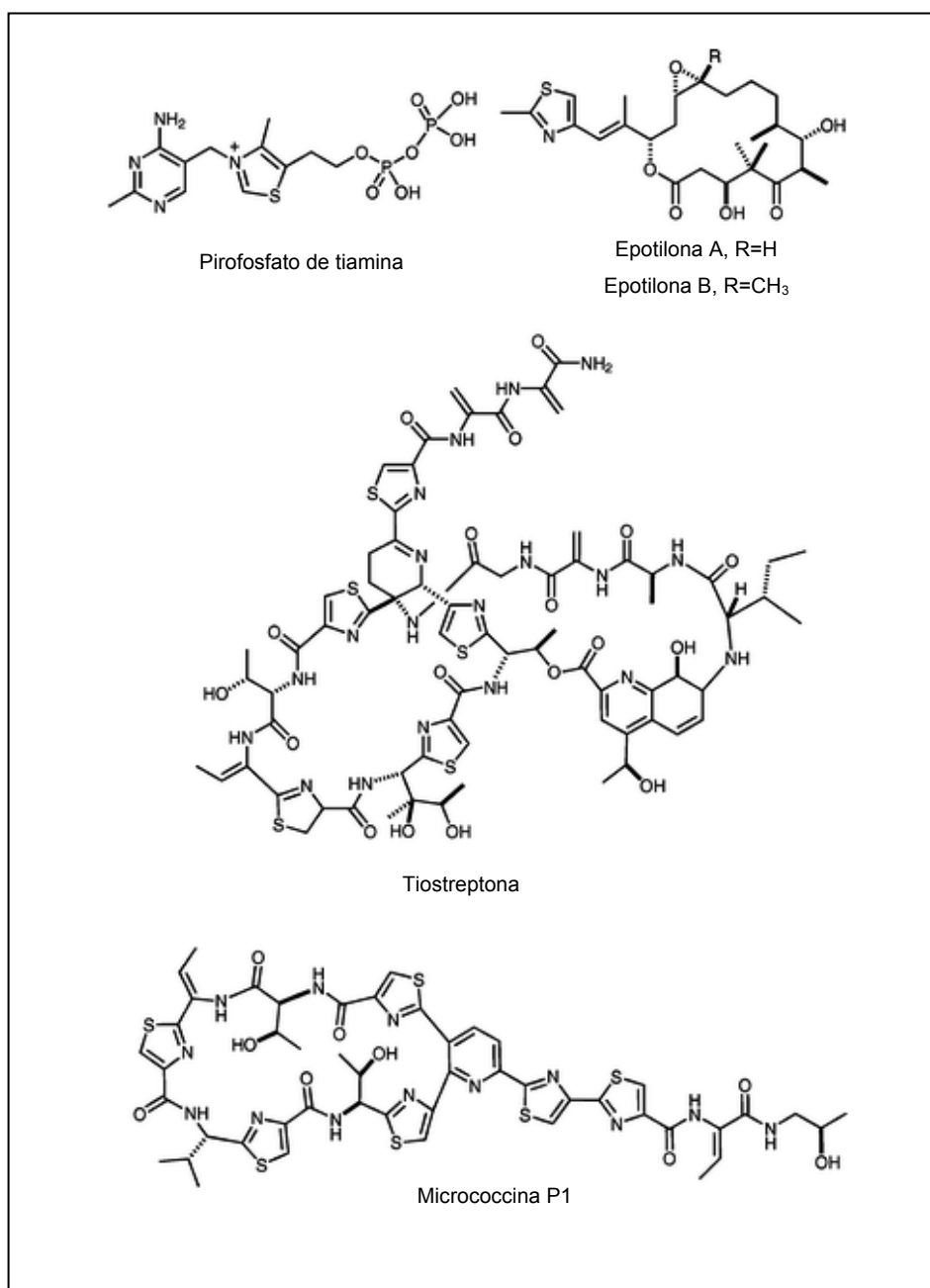
Os tiazóis também estão presentes em processos naturais, como seu papel chave na atividade catalítica do pirofosfato de tiamina (TPP), uma coenzima importante na respiração que faz parte do ciclo de Krebs (Figura 12). Além disso, é um protótipo estrutural que está presente em numerosos compostos bioativos naturais. Eptilonas e a grande família de antibióticos macrocíclicos tiopeptídios, possuem como protótipo estrutural conhecida como tiostreptona, molécula que também possui tiazol (Figura 12).

Outro exemplo da ocorrência natural do tiazol é a micrococcina P1 (Figura 12), um antibiótico tiopeptídico ativo contra microrganismos resistentes à vancomicina,

cuja estrutura foi estabelecida por síntese total cerca de 60 anos após seu isolamento (DONDONI, 2010).

Outro importante grupamento em que o anel tiazol está presente é a tiazolil-hidrazona, um bioisóstero da tiossemicarbazona, cujos derivados já foram identificados como novos potentes inibidores da cisteína protease cruzaina e do crescimento de *Trypanosoma cruzi*, possuindo baixa toxicidade em modelo animal (HERNANDES et al., 2010).

Figura 12 - Exemplos de produtos bioativos naturais contendo tiazol.



Fonte: Modificado de DONDONI, 2010

3.10 Ftalimidas

Outra estrutura promissora para uso na síntese de novos fármacos é a ftalimida. Dentre os compostos mais conhecidos que contém a estrutura ftalimida está a talidomida (N-ftalimidoglutarimida), que foi introduzida no mercado farmacêutico em 1956, como sedativo e hipnótico, tornando-se em pouco tempo bastante popular para o tratamento da insônia. No início da década de 60, foi descrito o perfil teratogênico da talidomida, associando a sua utilização, durante o primeiro semestre de gestação a taxas alarmantes de alterações congênitas (HASHIMOTO, 2002). A talidomida consiste em uma bis-imida, contendo um anel ftalimídico ligado à subunidade glutarimídica quiral.

A identificação de propriedades anti-inflamatória e imunomoduladoras promissoras da talidomida culminaram na renovação do interesse por esse composto. Como consequência, em 1998 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou, sob rígido controle, o uso da talidomida para o tratamento das manifestações cutâneas moderadas do eritema nodoso leproso, uma complicação inflamatória da hanseníase (MATTHEWS; MCCOY, 2003).

Objetivando aprimorar as propriedades farmacológicas da talidomida e reduzir seus efeitos teratogênicos, inúmeros esforços de pesquisa têm sido feitos na busca de análogos otimizados, com melhor perfil farmacoterapêutico, partindo-se da premissa de que poderiam identificar e excluir os grupamentos toxicofóricos presentes na talidomida (MATTHEWS; MCCOY, 2003).

As doenças para as quais a talidomida atualmente tem potencial valor terapêutico incluem artrite reumatóide, fotodermate, síndrome de Behcet, lúpus eritematoso discóide, doença do enxerto-versus-hospedeiro, malária, tuberculose, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), câncer de cólon, câncer de mama, mieloma múltiplo refratário, câncer de próstata, síndromes mielodisplásicas, doença de Crohn, diabetes, glioblastoma (HASHIMOTO, 2002).

Embora as aplicações farmacológicas de talidomida tenham sido amplamente investigadas, a base molecular da sua ação ainda não foi esclarecida. Os efeitos farmacológicos benéficos suscitados pela droga incluem a atividade anti-caquexia, atividade anti promotora de tumor, a atividade anti-angiogênica, atividade anti-metástases, a atividade antiviral e efeito hipoglicemiante (HASHIMOTO, 2002; MATTHEWS; MCCOY, 2003)..

A talidomida é conhecida por regular a produção de várias citocinas, o TNF, as ILs 2, 4, 5, 6, 10 e 12, e o IFN- γ . Embora a talidomida afete a produção de várias citocinas, a hipótese que prevalece é que todos dos efeitos benéficos da talidomida são por meio de regulação de TNF. Essa regulação é considerada bidirecional, pois a presença da droga pode estimular ou reprimir a produção do TNF, na dependência da célula que está sendo submetida ao tratamento e da estrutura química secundária do composto (HASHIMOTO, 2002).

A atividade de outros compostos contendo ftalimida é bastante relatada na literatura, sendo demonstrado que compostos derivados da N- hidroximetilftalimida inibem o desenvolvimento *Bacillus sp.*, *Micrococcus flavus*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* (ORZESZKO et al., 2000).

Derivados da ftalimida demonstraram bastante efetividade sobre *Trypanosoma brucei*, com ausência de citotoxicidade em macrófagos (MUTH et al., 2007). Outros derivados também apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, e *Leishmania mexicana*, com baixa toxicidade a células musculares e fibroblastos (BRESSI et al., 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos sintéticos

Os compostos testados, provenientes do Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a -20°C. Esta solução foi então dissolvida em meio de cultura adequado para cada ensaio (RPMI para ensaios com macrófagos/amastigotas e Schneider's para ensaios com promastigotas), para a obtenção das diferentes concentrações testadas nos experimentos. Os detalhes metodológicos das sínteses e caracterização estrutural dos compostos estão apresentados no **Apêndice 1**.

4.2 Coleta de macrófagos peritoniais

A coleta de macrófagos peritoniais foi realizada em camundongos BALB/c machos. Os animais foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO₂ e foi realizada assepsia dos mesmos com álcool 70%. Dentro da cabine de fluxo laminar, cada animal foi fixado à prancha de dissecação pelas patas com auxílio de agulha. Foi realizada a exposição do peritônio e a injeção de 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB, seguida de coleta desse meio. Foi realizado *pool* de células de pelo menos oito animais. O lavado foi acondicionado em frasco de vidro estéril a 4°C. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída em azul de tripan e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

Os procedimentos realizados com animais neste trabalho possuem aprovação pelo Comitê de ética para o uso de animais (CEUA/FIOCRUZ 26/2011) (**Anexo 1**).

4.3 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos peritoniais

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT conforme Pereira *et al.* (2004). Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que deve ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que

a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância.

As células obtidas conforme item 4.2 foram plaqueadas em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Poços apenas com meio de cultura foram utilizados como controle. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 3h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata. O índice de seletividade (ISe) foi determinado como a razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀, em µg/mL, para cada composto analisado.

4.4 Cultivo dos parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas infectivas, recém obtidas de camundongos, em culturas de macrófagos murinos e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos conforme descritos a seguir.

4.5 Atividade biológica em promastigotas de *L. amazonensis*

Visando um “screening” inicial dos compostos com atividade leishmanicida, formas promastigotas foram contadas e diluídas em meio Schneider’s (Sigma) suplementado com 10% de SFB a 1×10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações destes compostos (0,19 a 100 µg/mL) por 96h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B foram utilizados como controle negativo e positivo respectivamente. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. O crescimento celular foi avaliado e a IC₅₀/96h foi determinada por análise de regressão. As concentrações usadas para a determinação da IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos parasitas) foram: 0.19, 1.56, 6.25, 25 e 100 µg/mL. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.6 Ensaio de marcação Anexina-FITC e PI em promastigotas de *L. amazonensis*

Para a caracterização do tipo de morte celular induzida pelos compostos sobre os parasitas foram realizadas marcações com Anexina marcada com isotiocinato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídio (PI) conforme Marinho *et al.*, 2011, com modificações. Para isto formas promastigotas (4×10^7 células/mL) foram tratadas com a IC₅₀ dos mesmos compostos pré selecionados para amastigotas por 24h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura foram utilizados como controle negativo. Parasitas incubados com Anfotericina B (IC₅₀) e com Saponina (0,5%) foram utilizados como controle positivo. Após a incubação os parasitas foram lavados em PBS e ressuspensos em tampão de ligação (Annexin V Binding Buffer- BD Pharmingen™). A marcação foi realizada com 10 µL de Iodeto de Propídeo (50 µg/mL) e 5 µL de Anexina-FITC (BD Pharmingen™) por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram então submetidas à análise por citometria de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson) equipado com o software Cell Quest (Becton & Dickinson), com aquisição de 20.000 eventos, para determinação da porcentagem de células marcadas com anexina V-FITC, PI ou

duplo-marcadas. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados obtidos a partir da média de quatro leituras.

4.7 Atividade biológica em amastigotas de *L. amazonensis*

Os compostos mais promissores levando-se em consideração o baixo valor de IC₅₀ sobre o parasita e a alta CC₅₀ sobre macrófagos peritoniais murinos foram avaliados quanto à sua atividade sobre a forma amastigota intracelular de *L. amazonensis*. Para esta avaliação, macrófagos peritoniais coletados como anteriormente descrito foram distribuídos em placas de 24 poços (4 x 10⁵ célula/mL) contendo uma lamínula redonda estéril. Os macrófagos foram incubados para aderência por 48h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* na proporção de 8 parasitas/ macrófago, por um período de 4h, a 37°C e 5% de CO₂. Logo após, parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (25, 12,5 e 6,25 µg/mL) por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Estas concentrações foram determinadas com base nos resultados obtidos dos efeitos dos compostos sobre as formas promastigotas e em macrófagos peritoniais. Levou-se em consideração uma faixa de concentração que compreendesse os valores de IC₅₀ no parasita e CC₅₀ no macrófago, sem excessiva citotoxicidade para este último. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,0625 a 0,25%) presente na diluição dos compostos. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para quantificação de óxido nítrico e citocinas e as lamínulas contendo a cultura foram lavadas com PBS, coletadas e coradas com kit de coloração Panótico Rápido. A porcentagem de macrófagos infectados, bem como o número de amastigotas/macrófagos foi determinada pela contagem de 100 macrófagos, em duplicata. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas (T) em comparação com a cultura controle (C), definida pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ amastigotas} = T / C \times 100$$

4.8 Cultura de macrófagos peritoneais para obtenção de sobrenadantes

Macrófagos peritoneais de camundongos obtidos conforme anteriormente também foram incubados na concentração de 4×10^5 células/mL, a 37°C e 5% de CO₂ e foram submetidos ao tratamento com a mesma faixa de concentração dos compostos selecionados para a atividade biológica em amastigotas (25, 12,5 e 6,25 µg/mL), bem como Anfotericina B (2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 µg/mL) e LPS (50ng/mL) por 24h e 48h, a 37°C e 5% de CO₂. Passados os períodos de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para quantificação de óxido nítrico e citocinas. Ensaio foi realizado em duplicata.

4.9 Análise da produção de óxido nítrico

A análise da estimulação da produção de óxido nítrico por macrófagos foi mensurada indiretamente pelo método do reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% *N*-(1- naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto/2,5% H₃PO₄). Através da reação de Griess, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico, que reagirá com a *N*-(1- naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto formando um complexo de coloração rósea. Sobrenadantes da cultura de amastigotas intracelulares, bem como de macrófagos peritoneais não infectados tratados ou não, anteriormente descritos, foram coletados e plaqueados em placa de 96 poços num volume de 25 µL/poço. Foi acrescentado 25 µL/poço do reagente de Griess e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância foi lida a 540 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração de nitrito foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.10 Dosagens de citocinas em sobrenadantes

A dosagem de citocinas foi realizada a partir de sobrenadantes das culturas de amastigotas intracelulares tratadas ou não e de macrófagos peritoneais não infectados, em condições descritas no item 4.6 e 4.7. Foram realizadas dosagens das citocinas TNF, IL-10 e IL-12 através do ELISA de captura. Os anticorpos

monoclonais utilizados nesse ensaio foram do Kit OptEIA (BDBiosciences), sendo previamente titulados. Microplacas de ELISA (Costar-96 poços) foram sensibilizadas com 25 µl dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com 150 µl /poço de PBS pH 7,2-Tween-20 - 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com 100 µl da solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw.

Os padrões das citocinas foram diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração de 16.000 pg/ml em diluição seriada com fator 2. Em seguida, 25 µl da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h a TA. As placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 25 µl dos anticorpos biotinilados específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB foram adicionados, seguido de incubação por 1h30min, a TA. Após 9 lavagens com PBS-Tw, foi adicionado 50 µl da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 25 µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada a 405 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas (16.000 a 31,25 pg/mL) e as concentrações finais expressas em pg/ml. Ensaio realizado em duplicata.

4.11 Análise estatística

As análises de regressão linear e de significância foram feitas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). Para as análises de significância foi utilizado ANOVA seguida do teste de Dunnett, ou teste t, sempre considerando significativo valor $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Síntese dos compostos

Os compostos testados foram sintetizados pelo grupo de pesquisas da prof. Dra. Ana Cristina Lima Leite, do Laboratório de Síntese de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Ao todo, foram sintetizados 22 compostos, sendo 13 Tiossemicarbazonas (TSs) e 9 híbridos Ftalil-Hidrazona-Tiazol (PMs) (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos sintetizados e seus respectivos pesos moleculares (g/mol)

Tiossemicarbazonas	PM (g/mol)	Ftalimidas	PM (g/mol)
TS-01	286.1014	PM01	438.50
TS-02	300.1174	PM02	452.13
TS-09	315.1041	PM03	468.53
TS-10	303.08	PM04	483.50
TS-11	320.0624	PM05	483.50
TS-12	364.0119	PM06	472.95
TS-15	352.1129	PM07	517.40
TS-16	342.1640	PM08	456.49
TS-22	362.1319	PM10	507.39
TS-23	400.1126		
TS-27	335.1092		
TS-28	386.9766		
TS-29	345.1147		

5.2 Análise da citotoxicidade dos compostos em macrófagos peritoniais

O potencial citotóxico dos compostos sobre macrófagos peritoniais foi avaliado pela técnica do MTT, onde foi observada variação na atividade frente aos macrófagos. Todos os compostos avaliados apresentaram maior citotoxicidade aos

parasitas quando comparados aos macrófagos murinos, tendo valores de IC_{50} menores que os valores de CC_{50} . Alguns compostos não apresentaram toxicidade aos macrófagos em nenhuma das concentrações testadas, sendo considerada $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Entre as ftalimidas, os valores de CC_{50} determinados variaram entre 34,6 e 219,1 μM para PM07 e PM08, respectivamente. Já na série das tiossemicarbazonas os valores variaram entre 123,7 e 333,2 μM para a TS27 e TS02, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

Para determinar o quanto o composto seria mais seletivo para o parasita do que para o macrófago, foi realizada uma comparação entre os valores de CC_{50} no macrófago, com os valores de IC_{50} no parasita, determinando-se assim o Índice de Seletividade (ISe) do composto para a forma promastigota do parasita. Alguns compostos não apresentaram citotoxicidade em macrófagos na faixa de concentração avaliada. Com isso, não foi possível determinar o ISe. A partir da análise do ISe foi possível observar que todos os compostos, de ambas as séries, foram mais seletivos para o parasita que para os macrófagos, e dentre os índices de seletividade definidos, houve variação entre 43,56 e 6,3 para as ftalimidas, sendo a PM 06 o mais seletivo e 44,96 e 1,76 para as tiossemicarbazonas, sendo a TS09 o mais seletivo (Tabelas 2 e 3).

A anfotericina B demonstrou maior toxicidade aos macrófagos que os compostos avaliados, com valor de CC_{50} de 8,1 μM e índice de seletividade na forma promastigota de 7,5 (Tabelas 2 e 3). Vale ressaltar que a incubação dos macrófagos com DMSO não causou redução da porcentagem de células viáveis.

Tabela 2 - Efeito das Ftalimida-tiazolil-hidrazonas sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos peritoniais.

COMPOSTOS	$\mu\text{g/mL}$		μM		ISe _{PRO}
	CC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀	IC ₅₀	
PM01	46,28	3,05	105,5	7,0	15,17
PM02	18,36	0,97	40,6	2,1	18,92
PM03	>100	3,73	>213,43	8,0	ND
PM04	>100	1,17	>206,8	2,4	ND
PM05	>100	1,64	>206,8	3,4	ND
PM06	97,13	2,23	205,4	4,7	43,56
PM07	17,88	2,84	34,6	5,5	6,3
PM08	>100	2,84	>219,1	6,2	ND
PM10	>100	0,88	>197,1	1,7	ND
Anfotericina B	7,5	1,00	8,1	1,1	7,5

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: IC₅₀ – Concentração que inibe em 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*

CC₅₀ – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos

ISe_{PRO} (Índice de Seletividade) = CC₅₀ Macrófagos / IC₅₀ Promastigotas

ND: Não determinado porque as concentrações utilizadas para o ensaio não apresentaram toxicidade.

Tabela 3 - Efeito das Tiossemicarbazonas sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos peritoniais.

COMPOSTOS	$\mu\text{g/mL}$		μM		ISe _{PRO}
	CC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀	IC ₅₀	
TS01	46,67	1,72	163,1	6,0	27,13
TS02	>100	3,74	>333,2	12,5	ND
TS09	49,01	1,09	155,5	3,5	44,96
TS10	46,8	26,52	154,4	87,5	1,76
TS11	>100	1,56	>312,4	4,9	ND
TS12	>100	1,74	>274,7	4,8	ND
TS15	>100	1,27	>284	3,6	ND
TS16	>100	4,63	>292,2	13,5	ND
TS22	>100	6,4	>276,1	17,7	ND
TS23	57,47	4,45	143,6	11,1	12,91
TS27	41,44	1,59	123,7	4,7	26,06
TS28	>100	1,93	>258,4	5,0	ND
TS29	>100	3,52	>289,7	10,2	ND
Anfotericina B	7,5	1,00	8,1	1,1	7,5

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: IC₅₀ – Concentração que inibe em 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*

CC₅₀ – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos

ISe_{PRO} (Índice de Seletividade) = CC₅₀ Macrófagos / IC₅₀ Promastigotas

ND: Não determinado porque as concentrações utilizadas para o ensaio não apresentaram toxicidade.

5.3 Atividade biológica contra promastigotas de *L. amazonensis*

Com o objetivo de identificar os compostos mais promissores contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, inicialmente também foi realizado um “screening” com todos os compostos sintetizados.

Nossos resultados demonstram que todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento das formas promastigotas, com valores de IC_{50} variando entre 1,7 e 8,0 μM para as Ftalimidas e entre 3,5 e 87,5 μM para as Tiossemicarbazonas (Tabelas 2 e 3). Os compostos que apresentaram uma maior efetividade, com menor valor de IC_{50} , foram a PM10 (1,7 μM) e TS 09 (3,5 μM). Os gráficos de dose-resposta podem ser observados no **Apêndice 2**.

A anfotericina B em promastigotas obteve 1,1 μM como valor de IC_{50} . Já na incubação com DMSO, apenas a concentração de 1% (equivalente à usada na concentração de 100 $\mu g/mL$) conseguiu inibir o crescimento dos parasitas em 31,06%.

5.4 Atividade biológica sobre amastigotas de *L. amazonensis*

Os baixos valores de IC_{50} , a baixa citotoxicidade em macrófagos e consequente altos valores de ISe foram os parâmetros utilizados para selecionar os compostos para os testes biológicos com as formas amastigotas intracelulares. Além disso, essa forma evolutiva do parasita é a mais relevante, principalmente por estar presente no hospedeiro mamífero.

Foram selecionados os compostos PM01, PM04, PM10, TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12 e TS15. Estes compostos além de selecionados para os ensaios em amastigotas, também foram utilizados em todos os ensaios subsequentes. As concentrações que foram utilizadas para o tratamento das amastigotas foram escolhidas levando-se em consideração os valores de CC_{50} em macrófagos. Vale ressaltar que essas concentrações, foram bem abaixo dos valores de CC_{50} . Além disso, a maioria dos compostos analisados não causou citotoxicidade nos macrófagos na faixa de concentração (1 a 100 $\mu g/mL$) analisada.

Os compostos avaliados apresentaram menores valores de IC₅₀ em promastigotas que em amastigotas intracelulares, demonstrando assim maior efetividade contra a primeira. Os valores de IC₅₀ para as amastigotas variaram entre 18,3µM (TS12) e 44,8 µM (PM01). O ISe variou entre 2,62 e 4,67 para a PM01 e TS10, respectivamente (Tabela 4). Os gráficos de dose-resposta podem ser observados no **Apêndice 3**.

Tabela 4 - Efeito dos compostos sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*.

COMPOSTOS	µg/mL		µM		ISe _{AMA}
	CC ₅₀	IC ₅₀	CC ₅₀	IC ₅₀	
PM01	46,28	17,67	105,5	44,8	2,62
PM04	>100	8,85	>206,8	34,3	ND
PM10	>100	17,64	>197,1	39,4	ND
TS01	46,67	12,83	163,1	33,0	3,64
TS02	>100	10,28	>333,2	37,8	ND
TS09	49,01	12,41	155,5	34,3	3,95
TS10	46,8	10,01	154,4	25,1	4,67
TS11	>100	12,09	>312,4	40,3	ND
TS12	>100	12,48	>274,7	18,3	ND
TS15	>100	8,85	>284	34,8	ND
Anfotericina B	7,5	0,22	8,1	0,23	34,09

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: IC₅₀— Concentração que inibe em 50% do crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis*

CC₅₀ – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos

ISe_{AMA} (Índice de Seletividade) = CC₅₀ Macrófagos/ IC₅₀ Amastigotas

ND: Não determinado porque as concentrações utilizadas para o ensaio não apresentaram toxicidade.

A Anfotericina B, droga de referência que foi utilizada nos ensaios como controle positivo, apresentou-se bastante efetiva contra a cepa de *Leishmania amazonensis* utilizada nos ensaios. Com baixos valores de IC₅₀ para ambas as formas do parasita e elevado ISe (Tabelas 3 e 4). Já na incubação com DMSO,

apenas a concentração de 0,25% (equivalente à usada na concentração de 25µg/mL) conseguiu inibir o número de amastigotas em 10,9%, em relação ao controle.

5.5 Mecanismos de morte celular induzidos pelos compostos em promastigotas de *L. amazonensis*

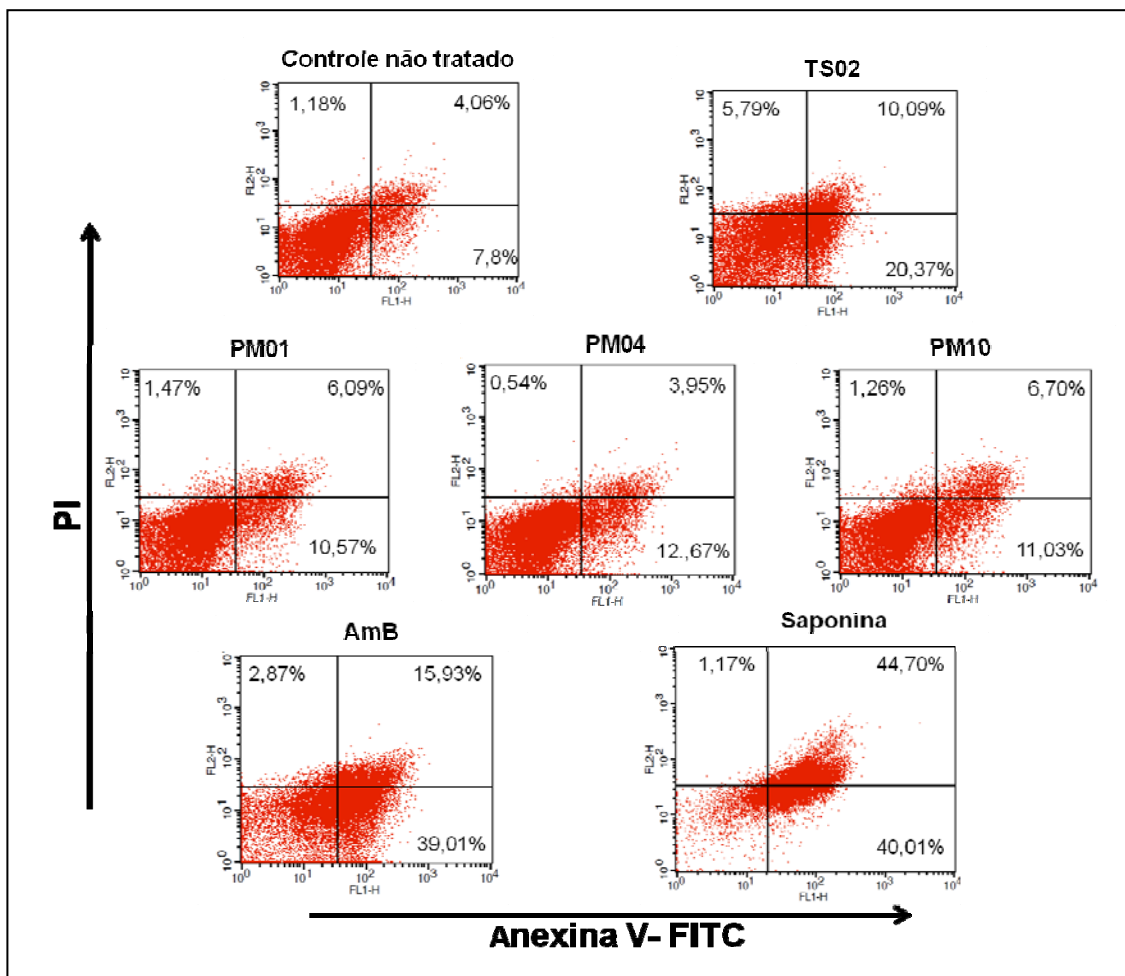
Com o objetivo de avaliar os efeitos causados pelos compostos avaliados sobre a integridade da membrana plasmática e DNA do parasita, células tratadas e controles foram submetidas à marcação com iodeto de propídio (PI) e Anexina V–FITC. A Anexina V é uma proteína com grande afinidade pela fosfatidilserina, que é um fosfolípido presente no interior da membrana plasmática, e que durante o processo de apoptose, é exposto no exterior da membrana.

O PI é um marcador que se liga ao DNA da célula apenas quando a permeabilidade da membrana está alterada. A partir da marcação com Anexina V e PI é possível fazer uma discriminação entre células em apoptose inicial (Anexina V+, PI-), células necróticas ou células em apoptose tardia (Anexina V+, PI+) e células viáveis (Anexina V-, PI-).

Foi analisada a influência dos compostos PM01, PM04, PM10, TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12 e TS15 sobre o parasita. A utilização dos compostos TS01, TS09, TS10, TS11, TS12 e TS15 não causou alterações significativas nos parasitas no tempo de incubação utilizado. Por outro lado, a incubação dos parasitas com a IC₅₀ dos compostos TS02, PM01, PM04, PM10 e Anfotericina B por 24h causou alterações compatíveis com necrose e/ou apoptose de modo significativo.

A presença dos compostos TS02, PM01, PM04 e PM10 levou a exposição da fosfatidilserina na membrana externa dos parasitas, tendo maior população marcada com anexina-FITC, característica de morte celular por apoptose.

O composto TS02 também foi capaz de causar alterações na permeação da membrana plasmática e induzir morte por necrose, uma vez que permitiu a marcação dos parasitas com PI. A saponina foi utilizada como controle positivo de necrose. A Anfotericina B, do mesmo modo que a TS02, foi capaz de induzir morte celular tanto por necrose como por apoptose no parasita (Figura 13).

Figura 13 - Mecanismos de morte celular induzidos pelos compostos.

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas por 24h com a concentração da IC₅₀. Marcação com Anexina-FITC (FL2H) e PI (FL1H).

5.6 Produção de óxido nítrico

Com objetivo de verificarmos se os compostos poderiam induzir um aumento na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos e em amastigotas intracelulares foi utilizado o reagente de Griess.

5.6.1 Produção de NO por macrófagos não infectados tratados e controles

Para a avaliação da produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados com os compostos e controles foram testados dois tempos de incubação: 24h e 48h. Foram utilizadas as concentrações de 6.25, 12.5 e 25µg/mL, sendo todas essas bem

menores que os valores de CC_{50} em macrófagos. A quantificação demonstrou que em ambos os tempos foi identificada a produção desse mediador, sendo que a maioria dos resultados significativos após a incubação por 24h (Tabela 5). No tempo de 48h apenas a TS02 produziu quantidades significativas de NO em todas as concentrações testadas, em comparação ao controle não tratado (Tabela 6).

Como controles para o ensaio da produção de NO foram utilizados meio de cultura RPMI completo, LPS e Anfotericina B. Todas as análises estatísticas foram realizadas comparando com a produção de NO pelo controle sem tratamento. O controle sem tratamento também foi capaz de produzir NO, porém em concentrações mais baixas que a maioria dos compostos e que o LPS. A produção frente ao estímulo com LPS apenas foi significativo após a incubação por 48h, enquanto que com a Anfotericina B apenas na menor concentração testada, no período de 24h (Tabela 7).

Tabela 5 - Produção de NO por macrófagos peritoniais estimulados com os compostos por 24h.

COMPOSTOS	µg/mL		
	25	12,5	6,25
PM01	10,1 ± 0,01 *	9,9 ± 0,09	10,0 ± 0,12
PM04	10,6 ± 0,15 *	10,1 ± 0,18 *	10,5 ± 0,05 *
PM10	10,2 ± 0,38 *	10,2 ± 0,48 *	9,6 ± 0,15
TS01	10,7 ± 0,02 *	10,2 ± 0,07 *	10,6 ± 0,35 *
TS02	10,1 ± 0,07 *	9,8 ± 0,13 *	9,6 ± 0,23 *
TS09	9,3 ± 0,2	8,6 ± 0,05	8,9 ± 0,7
TS10	9,5 ± 0,13	9,1 ± 0,13	9,1 ± 0,8
TS11	11,9 ± 0,3 *	10,5 ± 0,76 *	10,9 ± 0,03 *
TS12	11,4 ± 0,17 *	10,5 ± 0,23 *	9,8 ± 0,16
TS15	9,6 ± 0,3	10,2 ± 0,21 *	10,3 ± 0,02 *

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os asteriscos (*) correspondem à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. PM01, PM04 e PM10: $p = 0,0086$. TS01, TS02, TS09: $p = 0,0002$. TS10, TS11, TS12 e TS15: $p < 0,0001$.

Tabela 6 - Produção de NO por macrófagos peritoniais estimulados com os compostos por 48h.

COMPOSTOS	µg/mL		
	25	12,5	6,25
PM01	9,9 ± 0,11	9,6 ± 0,18	9,8 ± 0,23
PM04	10,2 ± 1,03	10,1 ± 0,73	10,2 ± 0,2
PM10	10,2 ± 0,06	9,7 ± 0,00	12,1 ± 3,6
TS01	7,7 ± 0,05 *	8,6 ± 0,03 *	8,6 ± 0,02
TS02	8,6 ± 0,05 *	8,5 ± 0,05 *	8,5 ± 0,13 *
TS09	8,2 ± 0,66 *	8,6 ± 0,25 *	8,9 ± 0,1
TS10	8,9 ± 0,00	8,9 ± 0,05	9,1 ± 0,16
TS11	12,3 ± 2,3	11,8 ± 0,2	10,6 ± 0,00
TS12	11,7 ± 0,3	10,5 ± 0,16	9,6 ± 0,55
TS15	9,0 ± 2,07	9,0 ± 0,5	9,7 ± 0,1

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os asteriscos (*) correspondem à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. PM01, PM04 e PM10: $p = 0.5226$. TS01, TS02, TS09: $p < 0.0001$. TS10, TS11, TS12 e TS15: $p = 0.0593$.

Tabela 7 - Produção de NO pelos controles nos tempos de 24 e 48h.

Tratamento	NO ₂ ⁻	
	24h	48h
Sem tratamento	8,8 ± 0,23	9,26 ± 0,01
LPS (50ng/mL)	9,68 ± 0,41	10,78 ± 0,12 *
Anfotericina B (µg/mL)		
2,0	9,39 ± 0,2	9,24 ± 1,43
1,0	9,46 ± 0,03	8,77 ± 0,13
0,5	9,77 ± 0,31	9,47 ± 0,05
0,25	9,53 ± 0,46	9,72 ± 0,03
0,125	10,47 ± 1,03 *	9,66 ± 0,31

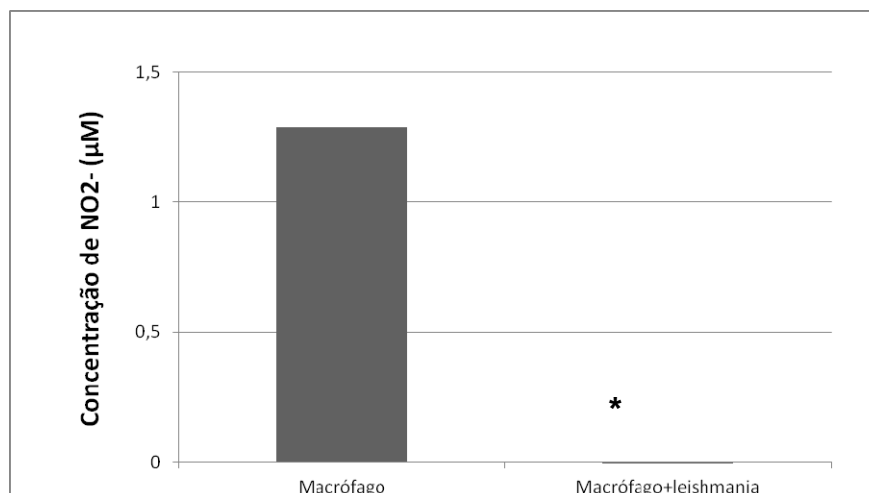
Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os asteriscos (*) correspondem à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. AmB: $p = 0,086$. LPS: $p < 0,0001$.

5.6.2 Produção de NO por amastigotas intracelulares tratadas e controles

Numa análise entre as concentrações de NO produzidas por macrófagos peritoniais sem infecção e amastigotas intracelulares foi observada que a presença dos parasitas causou significativa redução na produção de NO. Enquanto que os macrófagos incubados apenas com meio de cultura produziram em média 1,3 μM de NO, a concentração produzida pelas amastigotas intracelulares foi considerada não detectável (Figura 14).

Figura 14 - Quantificação de NO em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24.

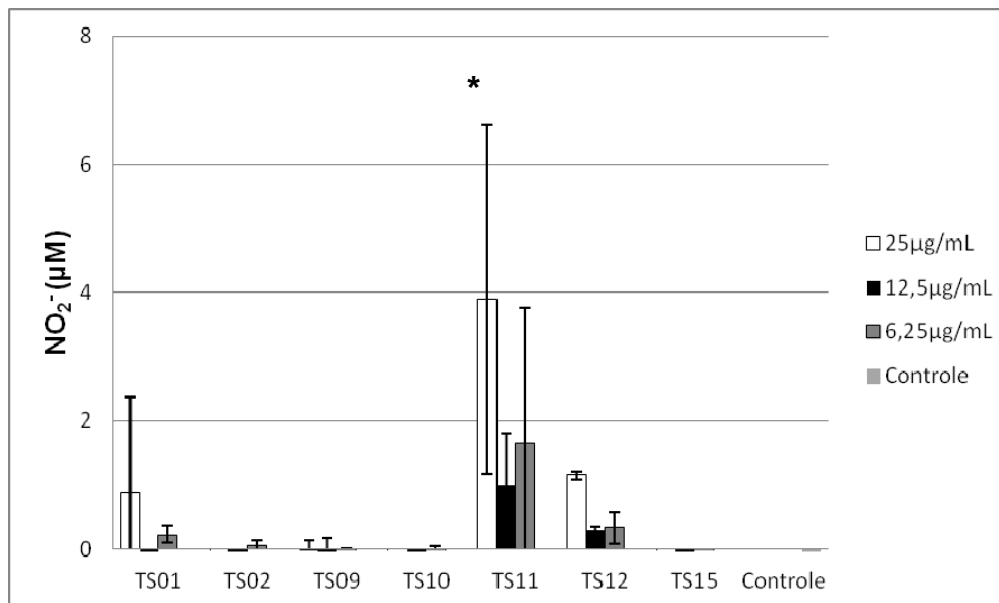


Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$), utilizando teste t. $p < 0.0001$.

Ao fazer a comparação entre macrófagos infectados e macrófagos infectados e tratados, apenas a TS11 foi capaz de aumentar significativamente a produção de NO (Figura 15 e 16). Com o tratamento com Anfotericina B (AmB) a produção de NO não foi significativa.

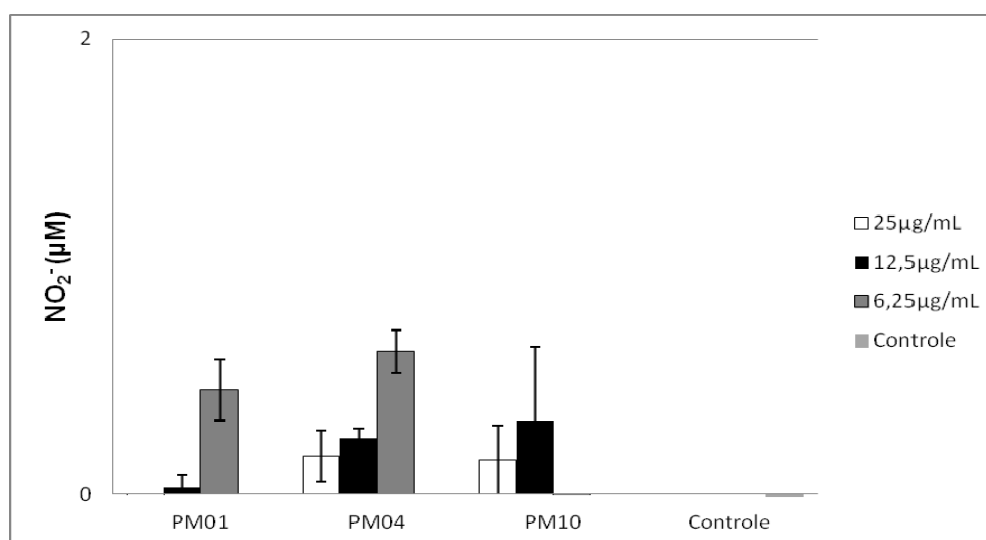
Figura 15 - Quantificação da produção de NO em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

Figura 16 - Quantificação da produção de NO em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Sem diferença significativa.

5.7 Análise da produção de citocinas

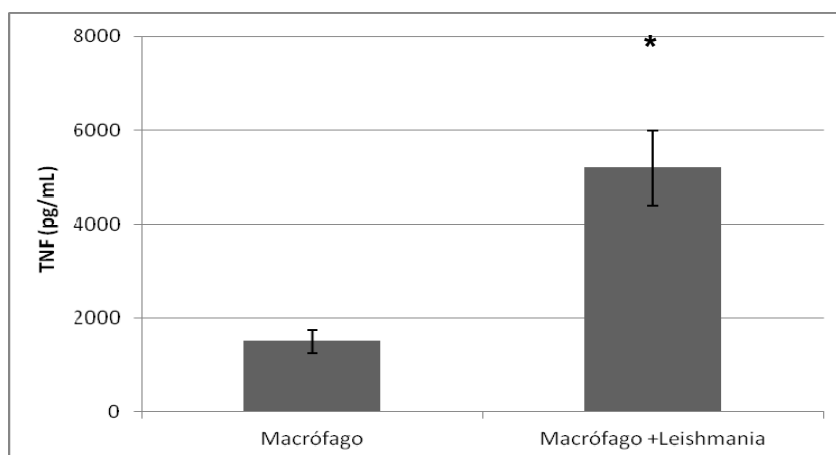
5.7.1 Fator de necrose tumoral (TNF)

A concentração de TNF foi dosada nos sobrenadantes de macrófagos incubados por 24 e 48h na presença dos compostos e em sobrenadantes das amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os mesmos compostos, nas mesmas condições e concentrações.

5.7.1.1 Quantificação de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares

A infecção da cultura de macrófagos para a obtenção de amastigotas intracelulares causou um aumento significativo da produção de TNF em comparação ao controle não infectado (Figura 17). Com a presença dos compostos na cultura houve um maior aumento na produção desta citocina apenas com a TS01, na menor concentração testada, e redução significativa dessa citocina nas culturas tratadas com TS11, TS12, TS15, PM04 e PM10 na concentração mais baixa e/ou intermediária em relação ao controle infectado e não tratado (Figura 18 e 19).

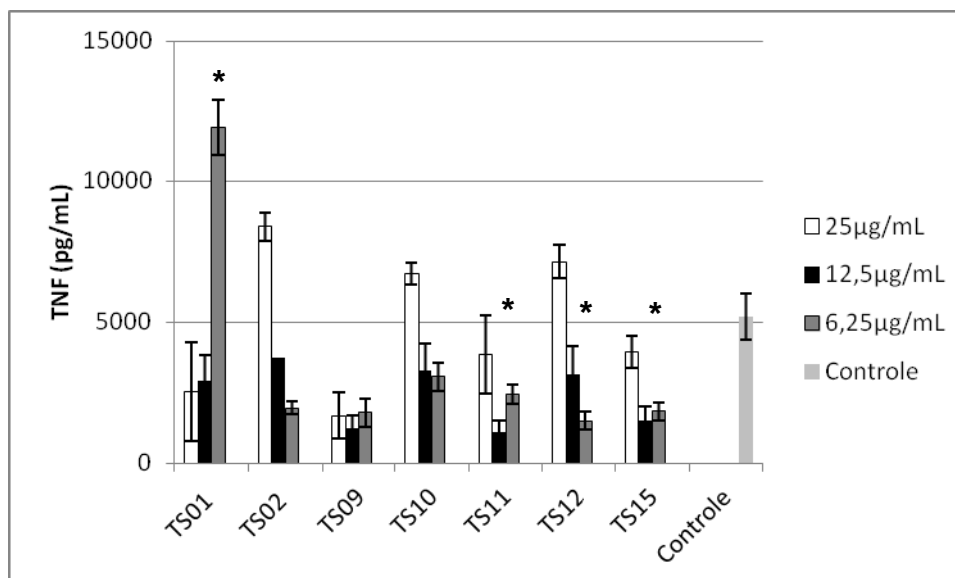
Figura 17 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoneais não infectados e infectados no tempo de 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$), utilizando teste t. $p = 0,0250$.

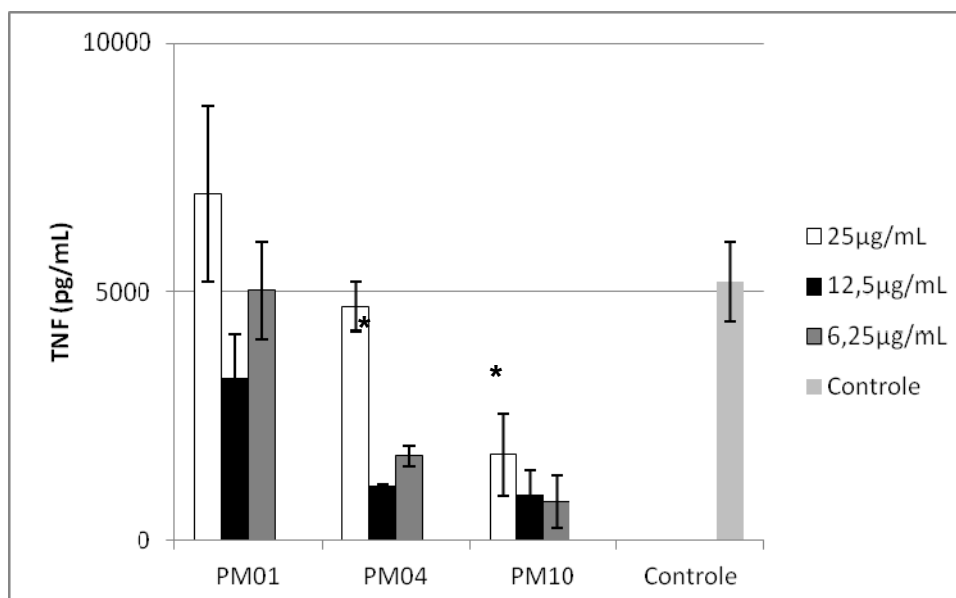
Figura 18 - Quantificação da produção de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. TS01: aumento, com $p = 0.0001$. TS11, TS12, TS15: redução com $p = 0.0001$.

Figura 19 - Quantificação da produção de TNF em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



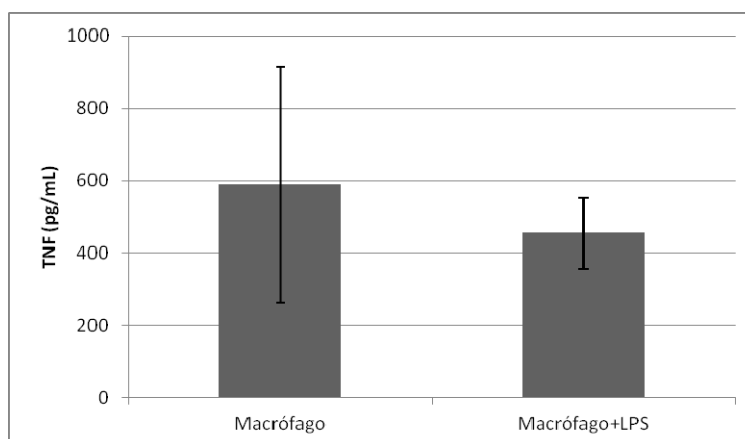
Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett. PM04 e PM10: redução da produção com $p = 0.006$.

5.7.1.2 Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos

Como controle positivo para a cultura de macrófagos peritoneais foi utilizado o LPS, onde não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de TNF no tempo de 24h (Figura 20). Já com os diferentes compostos houve produção significativa desta citocina apenas para os seguintes compostos: TS01(6,25µg/mL), TS09(6,25µg/mL), TS10(12,5µg/mL), TS11(12,5µg/mL) e PM01(25µg/mL). Na maioria dos compostos e concentrações testadas não houve produção de TNF (Figura 21e 22).

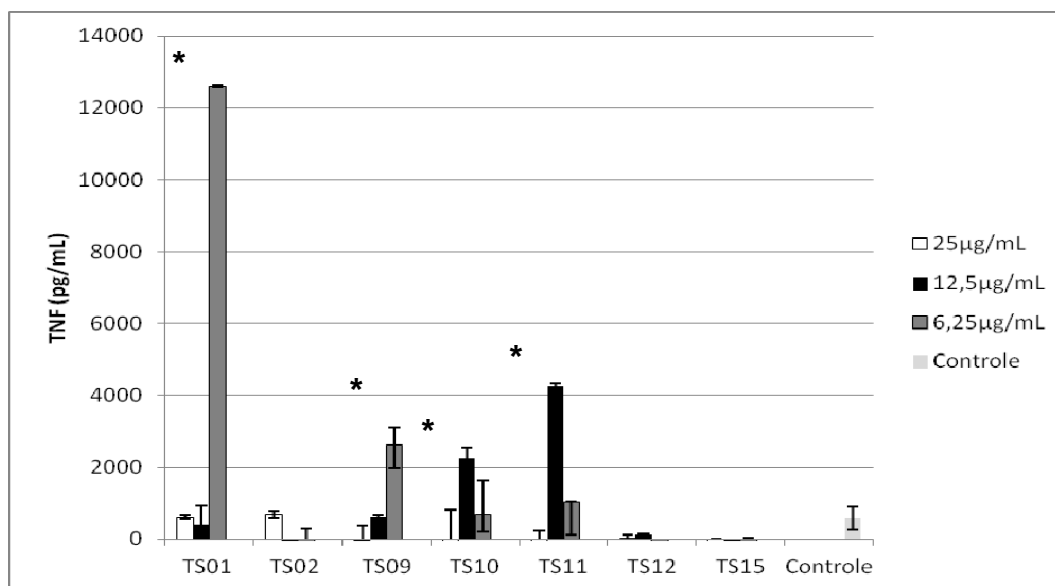
Figura 20 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoneais controle e tratado com LPS por 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Sem diferença significativa, utilizando teste t. $p=0.6344$

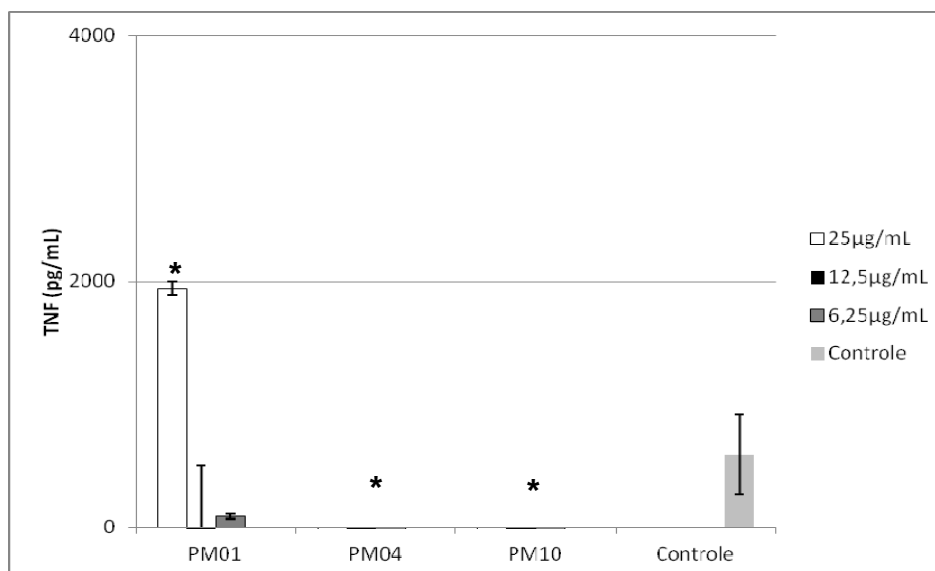
Figura 21 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

Figura 22 - Quantificação de TNF em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. PM01: aumento da produção com $p < 0.0001$. PM04 e PM10: redução da produção com $p < 0.0001$.

Com o tratamento pelo período de 48h não foi detectada produção de TNF pelos macrófagos, tanto no sem tratamento, como no tratado com LPS e os compostos. A Anfotericina B também não estimulou a produção de TNF em nenhuma das concentrações testadas, em ambos os tempos.

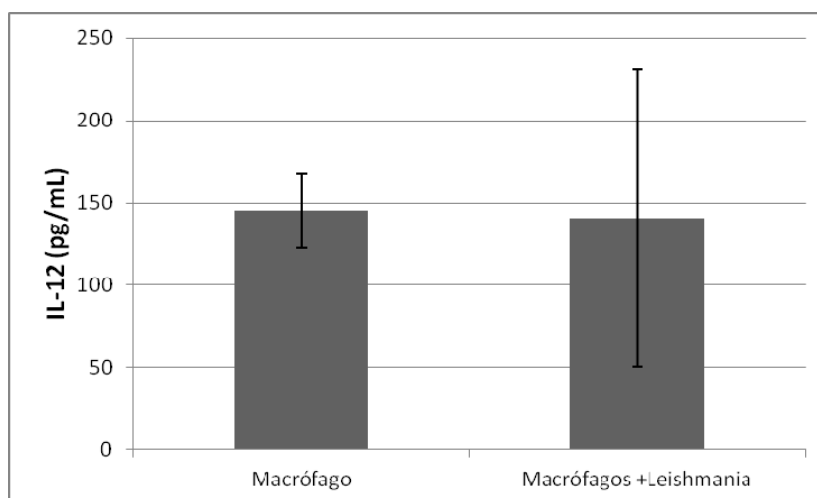
5.7.2 Interleucina 12 (IL-12)

A produção de IL-12 foi dosada nas mesmas condições do TNF, como anteriormente descrita.

5.7.2.1 Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares

A infecção da cultura de macrófagos para a obtenção de amastigotas intracelulares causou discreto aumento na produção de IL-12, porém estatisticamente não significante (Figura 23). Nas culturas tratadas com os compostos, apenas TS09(6,25µg/mL), TS11(6,25µg/mL), TS15 (6,25µg/mL) e PM01(25µg/mL) estimularam a produção de IL-12 de modo significativo em comparação ao controle (Figura 24 e 25). A Anfotericina B não estimulou a produção de IL-12.

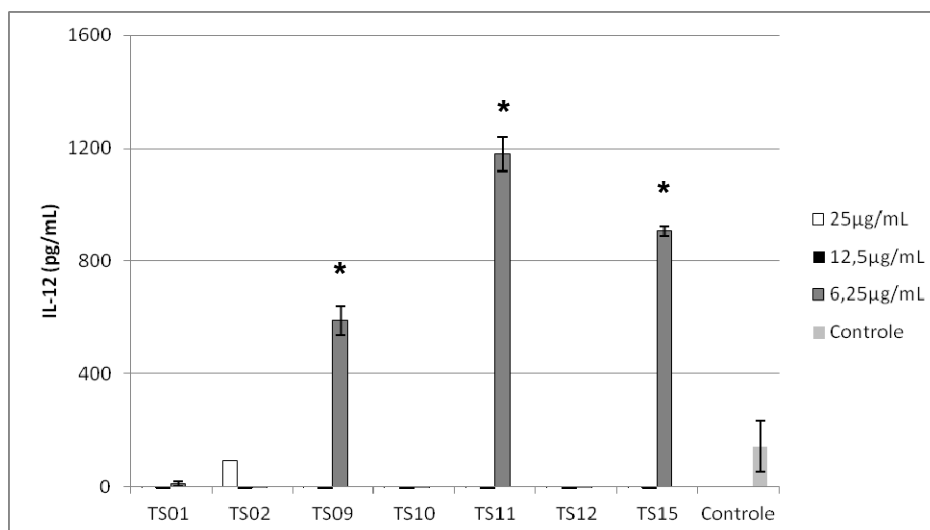
Figura 23 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais não infectados e infectados no tempo de 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Sem diferença significativa, utilizando teste t. $p=0.7555$.

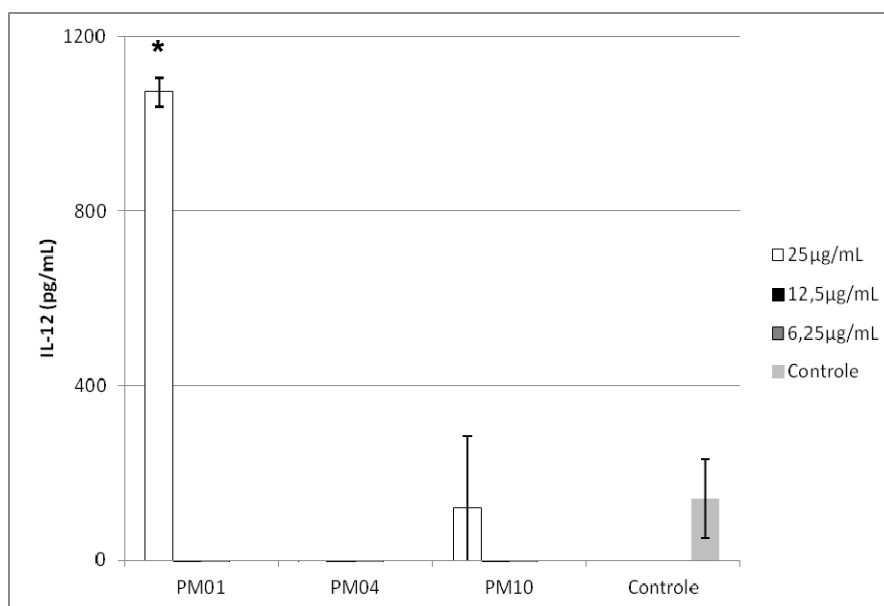
Figura 24 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p<0.0001$.

Figura 25 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



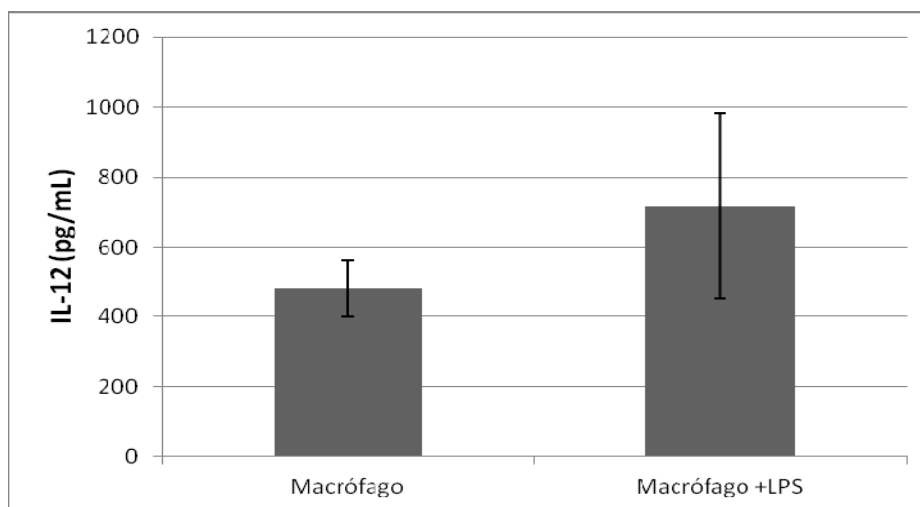
Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

5.7.2.2 Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais controle e tratado com LPS.

Embora tenha ocorrido um discreto aumento na produção de IL-12 na cultura de macrófagos tratada com LPS, quando comparada com a cultura de macrófagos sem tratamento, não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de IL-12 entre elas, com o período de incubação de 24h (Figura 26). Enquanto que na presença dos compostos, foi detectada produção significativa desta citocina nos sobrenadantes dos macrófagos incubados com TS01(6,25µg/mL), TS02 (25µg/mL) e TS12(25 e 12,5µg/mL) (Figura 27). Não houve produção de IL-12 na cultura tratada com PM01, PM04 e PM10. A presença da Anfotericina B não interferiu na produção desta citocina.

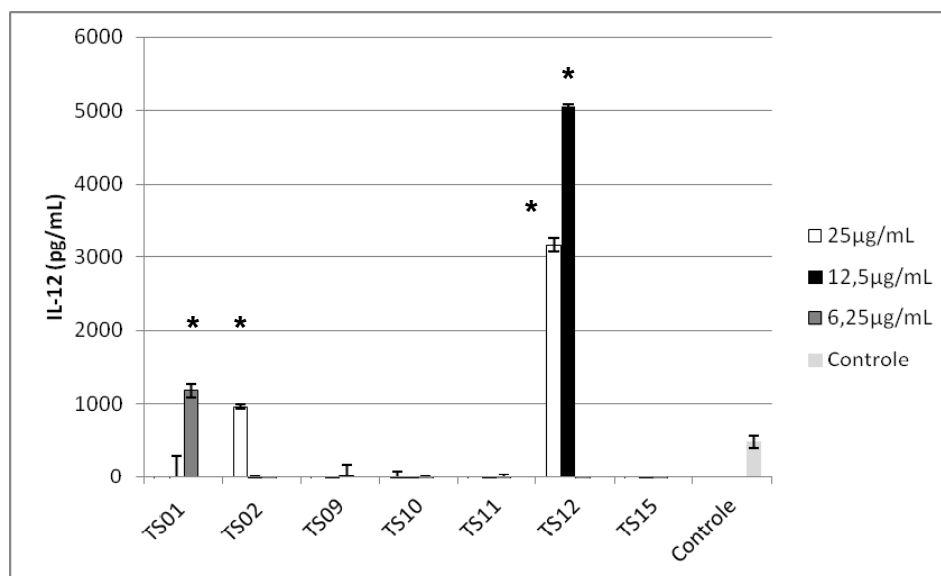
Figura 26 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais controle e tratado com LPS por 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Sem diferença significativa, utilizando teste t. $p=0.3520$

Figura 27 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.

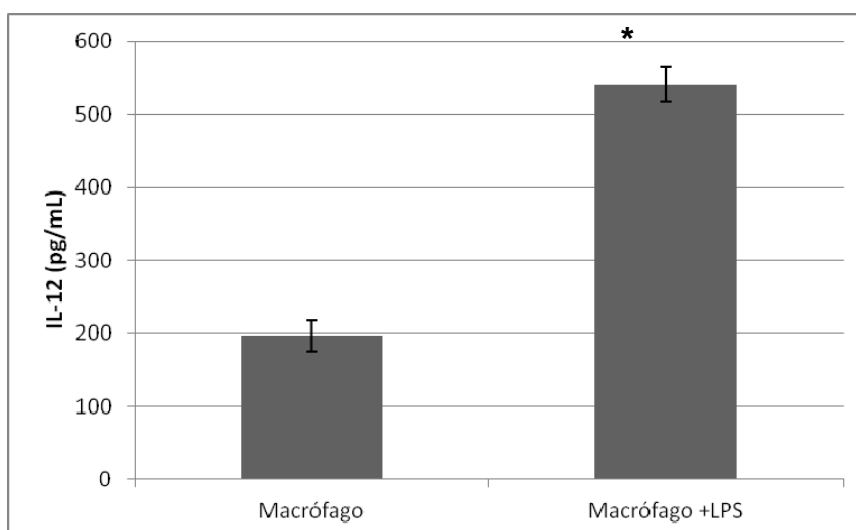


Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p<0.0001$.

Já com a incubação por 48h foi visualizada diferença significativa na produção de IL-12 entre macrófagos não tratados e incubados com LPS (Figura 28). Neste mesmo período houve produção significativa desta citocina nas culturas estimuladas com os seguintes compostos: TS01(12, 5 e 6,25µg/mL), TS10(6,25µg/mL), TS12(25µg/mL), TS15(6,25µg/mL), PM01 (12, 5 e 6,25µg/mL) e PM04(12,5µg/mL) (Figura 29 e 30). Houve pequena produção desta citocina na presença das menores concentrações utilizadas de Anfotericina B, porém de modo não significativo, em comparação ao controle.

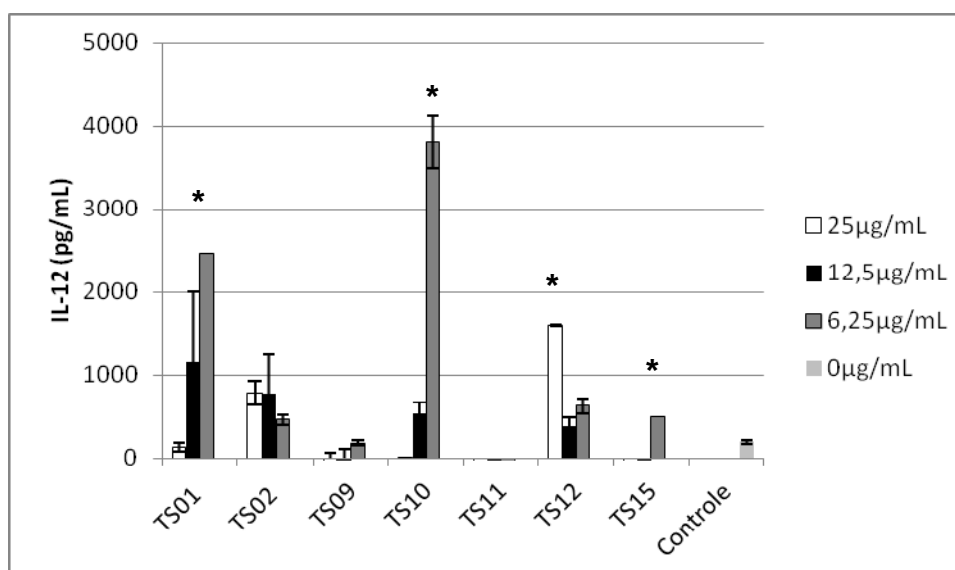
Figura 28 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais controle e tratado com LPS por 48h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa, utilizando teste t. $p=0.0045$

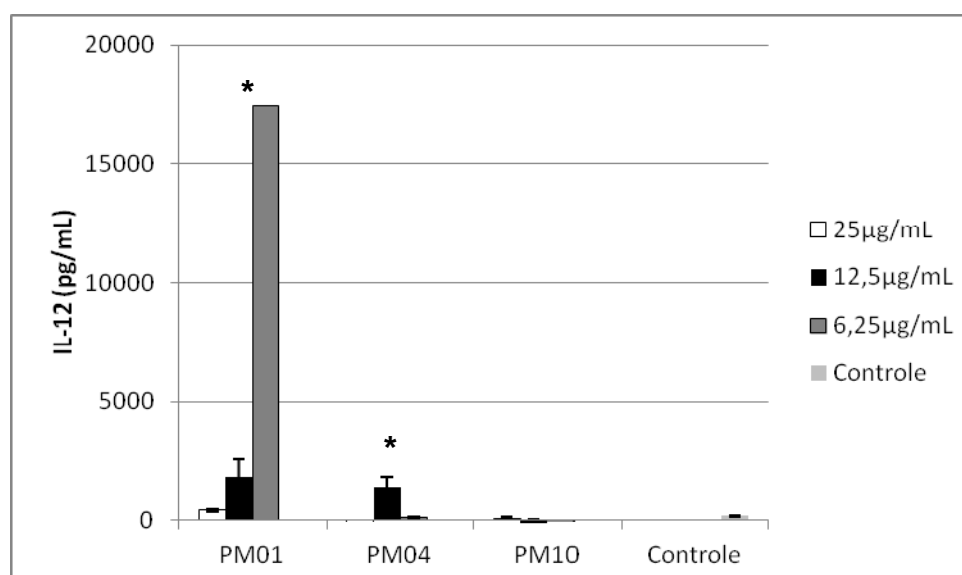
Figura 29 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 48h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

Figura 30 - Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 48h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

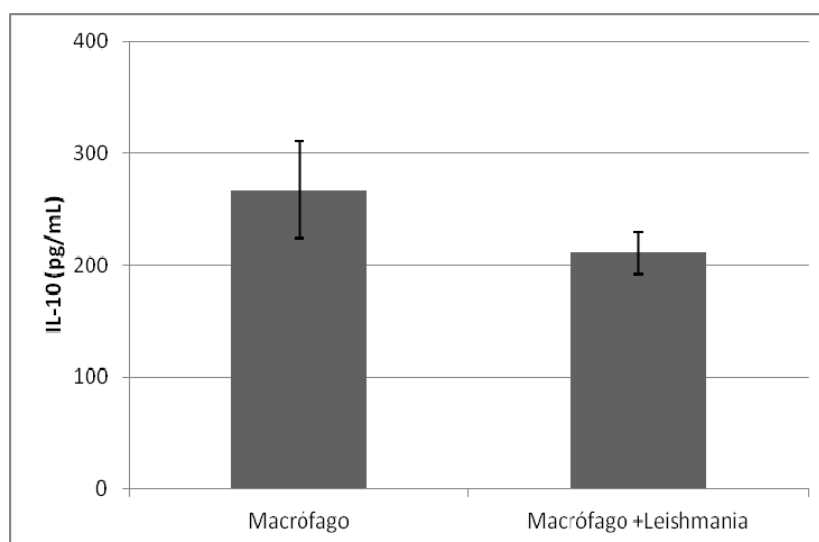
5.7.3 Interleucina 10 (IL-10)

A concentração de IL-10 nos sobrenadantes foi dosada nas mesmas condições do TNF e IL-12 anteriormente descritas.

5.7.3.1 Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares

A infecção da cultura de macrófagos peritoniais para a obtenção da forma amastigota intracelular causou discreta redução na produção de IL-10, porém de modo não significativo (Figura 31). Nas culturas tratadas com as diferentes concentrações dos compostos também não houve diferença significativa na produção desta citocina (Figura 32). A Anfotericina mais uma vez não interferiu na produção de citocina.

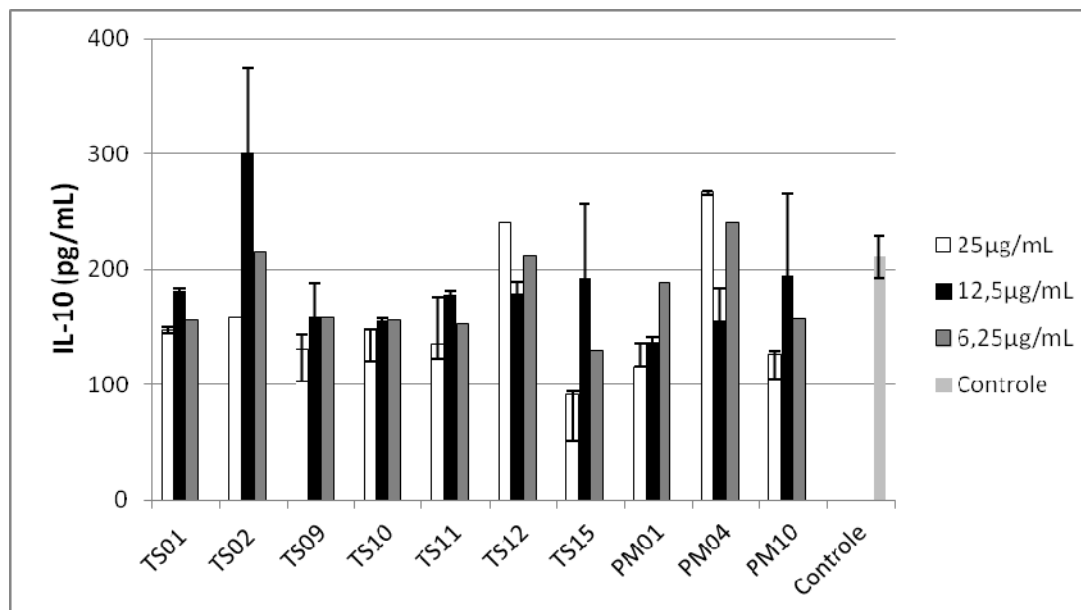
Figura 31 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais não infectados e infectados no tempo de 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Sem diferença significativa, utilizando teste t. $p=0.2306$.

Figura 32 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de amastigotas intracelulares tratadas com os diferentes compostos no tempo de 24h.



Fonte: Elaborado pela autora

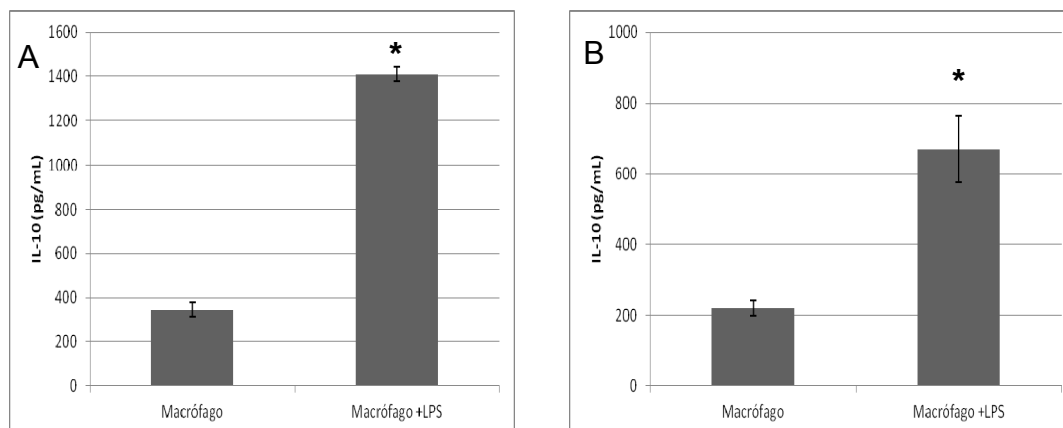
Nota: Sem diferença significativa, ANOVA teste de Dunnett. TS01, TS02, TS09, TS10: $p=0.3934$. TS11, TS12, TS15: $p=0.2693$. PM01, PM04, PM10: $p=0.5512$.

5.7.3.2 Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoniais controle e tratado com LPS.

A incubação da cultura de macrófagos peritoniais com LPS causou aumento significativo na produção de IL-10, tanto no período de 24h como de 48h (Figura 33). Na presença dos compostos no período de 24h houve aumento significativo da produção de IL-10 para os seguintes compostos: TS01(12,5 e 6,25µg/mL), TS15(12,5 e 6,25µg/mL) e PM01(25µg/mL). Por outro lado houve redução significativa da produção desta citocina para TS01(25µg/mL), TS09(25 e 12,5µg/mL), TS10(25 e 6,25µg/mL), TS11(12,5µg/mL) e TS12(12,5µg/mL) (Figura 34 e 35).

Já no período de 48h apenas TS01(12,5 e 6,25µg/mL) e TS02 (25µg/mL), aumentaram significativamente a produção de IL-10, enquanto que TS09(6,25µg/mL), TS12(25µg/mL) e PM01(12,5µg/mL) reduziram sua produção (Figuras 36 e 37). As maiores concentrações utilizadas de Anfotericina B também causaram redução significativa da produção de IL-10 após a incubação por 48h.

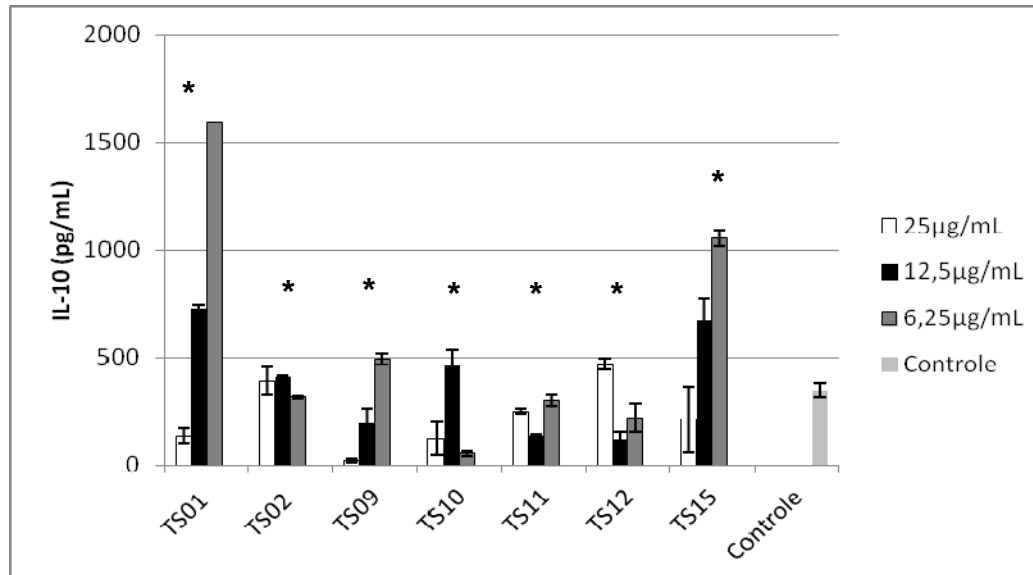
Figura 33 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais controle e tratado com LPS por 24h (A) e 48h (B).



Fonte: Elaborado pela autora

Notas: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa, utilizando teste t. 24h: $p=0.0010$. 48h: $p=0.0226$.

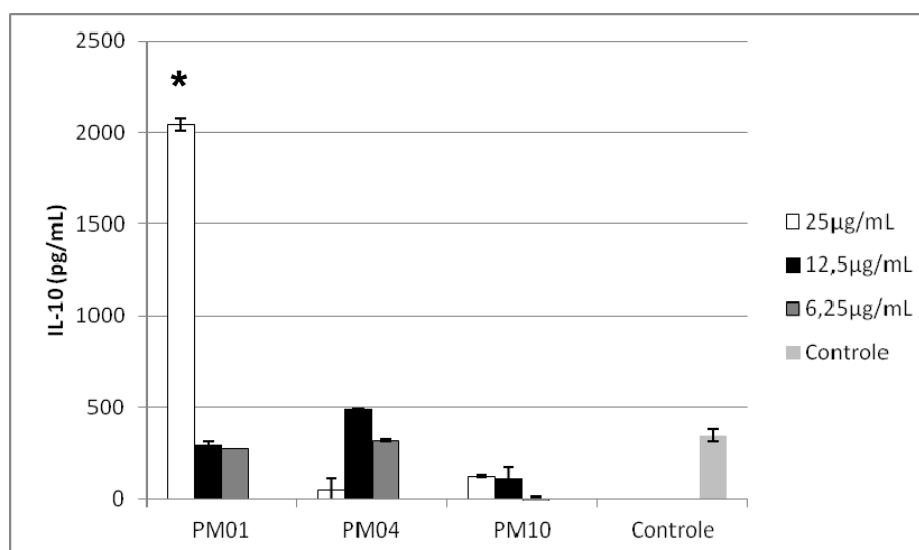
Figura 34 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 24h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Font

Nota: O asterisco (*) corresponde a diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p<0.0001$.

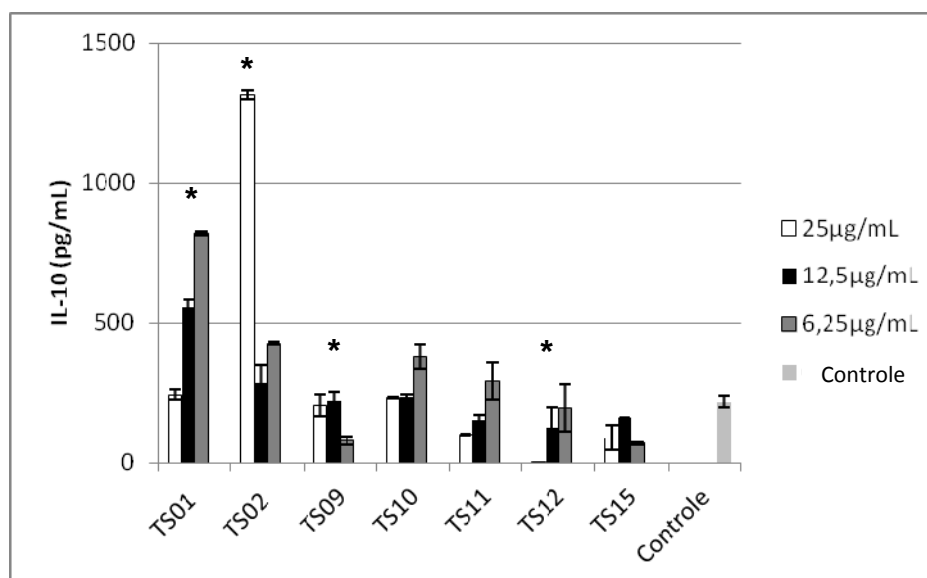
Figura 35 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 24h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. $p < 0.0001$.

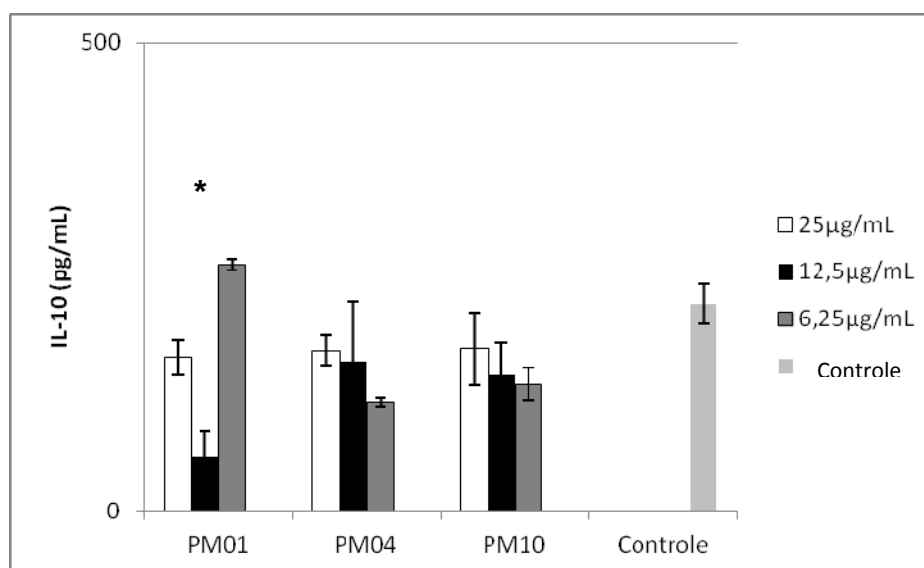
Figura 36 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 48h com os compostos TS01, TS02, TS09, TS10, TS11, TS12, TS15 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. TS01, TS02, TS09 e TS10: $p < 0.0001$. TS12: $p = 0.0052$.

Figura 37 - Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macrófagos peritoneais tratados por 48h com os compostos PM01, PM04, PM10 e controle sem tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: O asterisco (*) corresponde à diferença significativa em relação ao controle, ANOVA teste de Dunnett. PM01: $p=0.0002$.

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea, causada pelo protozoário *Leishmania amazonensis* geralmente é uma doença debilitante que causa segregação social com maiores impactos principalmente nas populações menos favorecidas economicamente, onde a desnutrição e as condições socioambientais contribuem para um aumento na mortalidade e morbidade associado à doença (BRASIL, 2007). Nenhuma vacina está disponível para o tratamento desta doença em humanos e a quimioterapia baseada em compostos pentavalentes causam sérios efeitos colaterais, além de relatos de resistência ao tratamento. Nestes casos, Anfotericina B e Pentamidina têm sido utilizadas, mas os severos efeitos colaterais e o alto custo do tratamento ainda são fatores altamente limitantes a eficácia do tratamento (AMATO et al., 2008). Dentro deste panorama a prospecção de novos agentes quimioterápicos ainda se faz necessário.

Durante as últimas décadas alguns aspectos deram impulso à descoberta de novos compostos com atividade leishmanicida, dentre eles: o conhecimento da biologia, vias bioquímicas e genoma do parasita, o surgimento de novas técnicas, vários avanços em ferramentas de bioinformática e um maior número de redes, parcerias e consórcios para apoiar o desenvolvimento desses novos agentes. Atualmente, os desenvolvimentos de fármacos, tanto sintéticos como naturais, tem importância relevante na busca de novas alternativas terapêuticas (MONZOTE, 2009).

A química medicinal tem contribuído bastante na geração de modificações estruturais em uma molécula visando obter novos derivados e essa tem sido uma abordagem bem sucedida para a concepção de novos fármacos baseados em alvos moleculares conhecidos e validados no parasita (LIÑARES et al., 2006; MONZOTE, 2009). O conhecimento sobre a ação físico-química e estrutural sobre o alvo fornecem evidências sobre o grupo farmacóforo inicial, e a partir daí, derivados podem ser obtidos com o objetivo de aumentar a atividade e modular características tóxicas e a farmacocinética do composto. Esta abordagem em conjunto com as ferramentas da bioinformática criam possibilidades de avaliação *in silico* de potenciais drogas (MONZOTE, 2009).

No presente trabalho realizamos um *screening* da atividade biológica de 22 produtos sintéticos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona e híbridos ftalil-hidrazona- tiazol sobre macrófagos e sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis*.

A síntese de tiossemicarbazonas inéditas foi estimulada pela sua conhecida atividade contra *Trypanosoma cruzi*, inibição da cisteína protease no parasita, além da possibilidade de manipulação de seus radicais, com coordenação de seu mecanismo de ação conhecidos (BERALDO, 2004; ENGEL *et al.*, 1998; GREENBAUM *et al.*, 2004).

Já para a obtenção da série PM foi levado em consideração grupos farmacofóricos destacados por suas propriedades biológicas. Assim, o anel ftalimida foi escolhido por apresentar relatos na literatura de sua atividade contra parasitas patogênicos e na regulação de citocinas importantes no desenvolvimento da leishmaniose (BRESSI *et al.*, 2001; HASHIMOTO, 2002; MUTH *et al.*, 2007). Outro grupo farmacofórico escolhido foi a tiazolil-hidrazona, que é um bioisómero cíclico da tiossemicarbazona, e que há comprovação da sua ação sobre a inibição da cruzafina e do crescimento de *T. cruzi in vitro* (LEITE *et al.*, 2006).

Inicialmente analisamos a citotoxicidade de todos os compostos sobre macrófagos de camundongos uma vez que um dos principais critérios a se levar em consideração no desenvolvimento de novos compostos com atividade leishmanicida é que, além da atividade sobre o parasita em baixas quantidades tendo como consequência a economia durante um possível tratamento, que estes não apresentem toxicidade a células de mamíferos (LIÑARES *et al.*, 2006). Portanto não só a atividade sobre o parasita foi avaliada, mas também seu efeito sobre células de mamífero.

Alguns compostos nas concentrações analisadas apresentaram citotoxicidade sobre os macrófagos murinos, outros não. Toxicidade animal e ineficácia são os principais problemas enfrentados pelos químicos medicinais, onde é comum encontrar compostos ativos apenas *in vitro*, compostos com toxicidade animal, ou até mesmo sem eficácia *in vivo*. Os modelos animais ocupam um passo crucial no fluxo de investigação para o desenvolvimento de medicamentos eficazes, mas um novo composto candidato a droga necessita de uma seleção apropriada através de ensaios *in vitro*, medida antes de haver estudos de longo prazo em modelos animais (DRUILHE *et al.*, 2002). Tendo isso em vista, a citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos devem ser avaliada durante os ensaios *in vitro*. Com essa finalidade,

vários métodos e linhagens de células estão disponíveis, dentre elas: fibroblastos (3T3, L929, e V79), HepG2, Vero, Caco-2, esplenócitos murinos (HERNANDES *et al.*, 2010). Como a forma amastigota de *Leishmania* sp. se desenvolve dentro de macrófagos, optamos por utilizar essa célula nos ensaios de citotoxicidade.

Também foi avaliada a atividade dos compostos sobre promastigotas do parasita, onde foi possível observar os baixos valores de IC₅₀, onde apenas a TS10, com a presença de flúor em sua estrutura, apresentou valor de IC₅₀ elevado, em comparação aos demais compostos. A baixa toxicidade dos compostos em relação às células de mamíferos teve um reflexo direto nos valores do índice de seletividade (ISe), os quais foram sempre mais seletivos para os parasitas do que para as células de mamífero.

Entre as ftalimidas a substituição por nitrofenil, fenil e diclorofenil, presente nos compostos PM04, PM02 e PM10, causou uma maior efetividade contra os parasitas, apresentando os menores valores de IC₅₀. Já a substituição por metóxil (PM03) e flúor (PM08) reduziu essa efetividade, com aumento dos valores de IC₅₀.

Nos compostos derivados das tiossemicarbazonas, a presença de metóxil (TS09) e dicloro (TS15) reduziram os valores de IC₅₀, enquanto que os compostos com a substituição por flúor (TS10), difenil (TS22) e fenil (TS02) mostraram-se menos eficaz contra o parasita.

Visto que a forma promastigota é a forma evolutiva do parasita que está presente no inseto vetor, a análise da atividade sobre ela serviu como ponto de partida para determinar se um novo composto possui atividade leishmanicida ou não (MARÍN *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2011).

Os valores de IC₅₀ obtidos para a forma amastigota foram maiores que para as promastigotas, demonstrando assim uma maior atividade dos compostos para esta última. Porém deve ser levado em consideração que ação sobre a forma amastigota é dificultada pela necessidade de permeação do composto através da membrana do macrófago antes de chegar ao parasita, podendo assim, haver perda de efetividade contra esta forma (MACIEL-REZENDE *et al.*, 2013).

Os compostos mais seletivos para a forma promastigota do parasita, de cada série, foram PM06 e TS09. Já para a forma amastigota foram PM01 e TS10. A presença de halogênios nos compostos PM06 e TS10 possivelmente colaborou com essa maior atividade, pois a utilização de substituintes halogenados contribui na formação de ligação halogênio no alvo farmacológico, contribuindo para a

estabilidade da ligação fármaco-receptor (HERNANDES et al., 2010). O possível receptor seria alguma das enzimas cisteína protease do parasita. Outros compostos como TS11, TS12, TS15, TS28, PM07, PM08 e PM10 também possuem halogênios em sua estrutura e apresentaram baixos valores de IC₅₀ em comparação a outros compostos que não possuíam essa estrutura.

Estudos realizados por Caputto et al. (2011) constataram a eficácia dos derivados de tiossemicarbazona em *T. cruzi* com alta seletividade para o parasita em comparação a hemácias. Trabalho realizado por Greenbaum et al. (2004) também demonstrou a atividade de produtos derivados de tiossemicarbazonas como potentes antiparasitários, onde foi observada forte inibição da cisteína protease do parasita, além do elevado tempo de sobrevivência de célula infectada com *T. cruzi* e tratada com os compostos. Já com compostos obtidos e analisados por Vieites et al. (2008) houve variação nos resultados obtidos com as diferentes cepas de *T. cruzi* utilizadas nos ensaios.

Estudos com derivados de tiossemicarbazonas em *Leishmania* sp. ainda são escassos. Em trabalho realizado por Britta et al. (2012) foi avaliada a atividade de uma tiossemicarbazona sobre *L. amazonensis*. Neste trabalho foi observada a inibição contra promastigotas em baixas concentrações do composto, a redução do número de amastigotas/ macrófagos e alterações ultraestruturais a nível de mitocôndria. Derivados de tiossemicarbazonas testados em *L. donovani* por Dodd et al. (1989) causaram além da inibição do crescimento do parasita, inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA.

Muth et al. (2007) numa avaliação de compostos sintéticos com estrutura contendo ftalimida observou elevada atividade contra *Trypanosoma brucei* com ausência de citotoxicidade em macrófagos, enquanto que Ren et al. (2001) numa avaliação de uma série de compostos, o composto contendo ftalimida em sua estrutura apresentou elevada toxicidade em *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum*, com poucos efeitos sobre células KB (carcinoma), considerando que o composto é capaz de apresentar atividade contra parasita com independência de citotoxicidade a outras células.

Uma vez que as ftalimidas do presente trabalho possuem grupamentos farmacofóricos com tiazolil-hidrazona (bioisótero cíclico da tiossemicarbazona), seus efeitos sobre as células podem ser semelhantes aos observados na presença das tiossemicarbazonas, cujo principal alvo em parasitas é a enzima cisteína

protease. O efeito da ftalimida isoladamente sobre o parasita ainda não é estabelecido na literatura.

No presente trabalho realizamos marcação com anexina-FITC e iodeto de propídio (PI) com o objetivo de caracterizar alterações em membrana ou DNA do parasita, que são características de morte celular por necrose e apoptose, respectivamente, e assim entender os efeitos dos compostos diretamente sobre esses parasitas.

Os compostos TS02, PM01, PM04 e PM10 causaram aumento significativo da marcação com anexina-FITC, caracterizando morte dos parasitas por apoptose. Os compostos possuem substituições por grupamentos fenil, e a PM10 também possui dicloro. Tanto a presença dos grupamentos fenil, como do dicloro tornam os compostos mais lipofílicos, o que facilitaria sua permeação através da membrana do parasita, podendo assim atuar a nível intracelular, ocasionando a apoptose observada (BELLO *et al.*, 2011).

Os eventos apoptóticos iniciam-se na mitocôndria, com perda de potencial de membrana e liberação de citocromo e a consequente ativação de cisteíno-proteases (caspases). Uma vez desencadeada, a apoptose evolui com exposição de fosfatidilserina, redução no volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos (*blebs*) na membrana celular, desintegração do núcleo e clivagem do DNA por endonucleases (KOOPMAN, 1994; SHAHA, 2006). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número, de tamanho e se rompem, originando corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001; FADOK *et al.*, 2000; MOREIRA; BARCINSKI, 2004; WANDERLEY *et al.*, 2005; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Parasitas do gênero *Leishmania* exploraram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferarem no hospedeiro (SHAHA, 2006). As formas apoptóticas de promastigotas são sempre destinadas à morte (COSTA *et al.*, 2009; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006), e provocam a síntese de TGF- β pelo macrófago, inibindo sua atividade inflamatória e colaborando para a sobrevivência dos parasitas não apoptóticos (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006).

A apoptose, que é um processo que pode eliminar as células sem provocar uma resposta imune é importante no contexto da patogênese da leishmaniose. Este processo pode facilitar a sobrevivência do parasita dentro do macrófago que é a

mesma célula que tem a capacidade de eliminá-lo (SHAHA, 2006). Por outro lado há autores que acreditam que a apoptose do parasita seria ideal justamente por não ativar processo inflamatório, o que evitaria a exacerbação de lesões da leishmaniose cutânea (ZANGGER *et al.*, 2002).

Recentes análises em drogas utilizadas há vários anos como referência para o tratamento da leishmaniose, tem demonstrado como atividade sobre os parasitas a indução de morte celular por apoptose. Foi demonstrado por Sereno *et al.* (2001) que amastigotas de *L. infantum* apresentam suscetibilidade a antimonial trivalente (SB-III), com indução de morte por fragmentação nuclear de modo parecido com apoptose, com a diferença de não ser mediada por caspases. No trabalho realizado por Marinho *et al.* (2011) foi evidenciada a atividade da miltefosina sobre promastigotas de *L. amazonensis*, também atuando na indução de apoptose, com externalização de fosfatidilserina e fragmentação de DNA. A Anfotericina B também é capaz de atuar de forma parecida a caspase resultando na fragmentação de DNA (SHAHA, 2006).

Uma vez que a apoptose é o tipo de morte celular encontrada quando os parasitas são submetidos diretamente ao tratamento com as drogas de referência, este poderia ser um indicativo da possibilidade de obtenção de bons resultados no tratamento *in vivo*.

Além de induzir apoptose, o composto TS02 também foi capaz de incorporar o PI significativamente, demonstrado que também é capaz de induzir morte celular por necrose. A capacidade desse composto de causar necrose e apoptose pode estar relacionado a presença de metil em sua estrutura, uma vez que o composto TS01, que não possui esse radical a mais, não causou alterações significativas no parasita durante o mesmo tempo de incubação. A necrose também é um tipo de morte celular, mas possui eventos diferentes da apoptose, resultando em aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana e ruptura celular. Durante esse processo o conteúdo celular é liberado, causando reação inflamatória local (ZIEGLER e GROSCUTH; 2004).

Visto que o processo de necrose resultaria na inflamação que é resultado da ativação e ação de células fagocíticas, haveria recrutamento de células inflamatórias associada à produção de citocinas do perfil Th1 que culminaria na resolução da doença. Porém com a necrose e o aumento dessas citocinas pró inflamatórias na

lesão, haveria também acúmulo de neutrófilos, que estão relacionados com níveis aumentados de amastigotas e de maior quantidade de droga para haver a cura das lesões (PASSERO *et al.*, 2010).

O resultado da incubação com o composto TS02 mostrou-se bem parecido com a anfotericina B, causando morte celular por apoptose e necrose. A anfotericina B, apesar de ser um medicamento com elevada toxicidade e efeitos colaterais, tem se mostrado eficiente como droga de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose, atuando a nível de ergosterol, que é um precursor do ergosterol presente na membrana citoplasmática do parasita.

Tendo em vista a importância de NO para o controle da leishmaniose, a produção desse mediador em macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados ou não com os compostos, bem como em macrófagos não infectados e tratados foi caracterizada.

O óxido nítrico é uma importante molécula efetora de uma variedade de funções biológicas, que incluem a agregação plaquetária, a neurotransmissão, citotoxicidade e a defesa contra parasitas. Esta molécula é usualmente mensurada pelos seus produtos oxidados, nitrito ou nitrato, em sobrenadante de cultura ou soro (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). A produção de óxido nítrico (NO) ocorre após a ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que está pouco expressa em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005) que utilizam essa via de produção de radicais livres para eliminar microorganismos fagocitados, em especial parasitas, como a *Leishmania* (BOGDAN, 2001; KORHONEN *et al.*, 2005).

Os macrófagos não infectados e estimulados apresentaram aumento da produção de NO na presença dos compostos por 24 ou 48h de tratamento. Apenas o composto TS10, com substituição por flúor em sua estrutura, não conseguiu produzir quantidades significativas desse mediador. Embora o NO seja um importante mediador produzido por macrófagos para que haja destruição do parasita intracelular, foi observado que em células infectadas com *L. amazonensis* houve redução da produção de NO.

A produção de NO em macrófagos pode ser regulada negativamente pelo TGF- β . E o parasita pode estimular a produção desta citocina, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ . A indução de TNF ou TGF- β depende da presença e quantidade de IFN- γ no início da infecção (GREEN *et al.*, 1994;

PINHEIRO *et al.*, 2005). O parasita também possui sistemas de detoxificação através da produção de enzimas como a superóxido dismutase e tripanotona redutase (GHOSH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 1994;).

Com o tratamento da TS11 utilizando-se a maior concentração houve maior produção de NO. Esse maior produção pode estar associada tanto à estimulação do macrófago pelo composto (que também foi observada em células não infectadas) como à rápida redução do número de amastigotas/macrófago, com consequente retorno da produção basal desse mediador pelos macrófagos.

Vários trabalhos relatam a importância do NO sobre o parasita e o curso da infecção. Souza *et al.* (2010) comparou cepas de *L. braziliensis*, isoladas de pacientes responsivos e refratários ao tratamento com antimonial e correlacionou a resistência/ suscetibilidade do parasita ao NO à tamanho das lesões. Parasitas resistentes ao NO causavam maiores lesões. Também foi demonstrado em infecção experimental com esses parasitas isolados que numa infecção experimental de macrófagos com cepa resistente a NO, não houve indução da produção de TNF.

Em trabalho realizado por Giudice *et al.* (2007) também foi demonstrado que pacientes infectados com cepa de leishmania resistente a NO apresentavam maiores lesões e relacionou essa resistência à ausência de resposta ao tratamento com antimoniais.

Como a produção de citocinas está intimamente relacionada à resposta do paciente à doença e ao tratamento, também neste trabalho analisamos influência dos compostos sobre a produção de algumas citocinas importantes para o curso da doença, que podem ser produzidas por macrófagos: TNF, IL-12 e IL-10. As citocinas são importantes moduladoras da expressão da iNOS. De uma maneira geral, citocinas do perfil Th1 induzem a iNOS (DRAPIER *et al.*, 1988), enquanto as do padrão Th2 inibem a sua indução (CUNHA *et al.*, 1992; GAZZINELLI *et al.*, 1992; NELSON *et al.*, 1991).

A resistência ao parasita é conferida por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1, enquanto a susceptibilidade é conferida por linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 (REIS *et al.*, 2006). Linfócitos T CD4⁺ que apresentam o perfil Th1 têm sua diferenciação estimulada pelas citocinas IL-12 e IFN- γ e produzem citocinas como IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-12. Células que apresentam o perfil Th2 são estimuladas por IL-4 e produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (REIS *et al.*, 2006; SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

O papel imunomodulatório das tiossemicarbazonas e ftalimidas já vem sendo demonstrado na literatura, sendo reguladoras da produção de citocinas consideradas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Freitas et al (2012) demonstraram que após o uso de composto contendo tiossemicarbazona em sua estrutura, foi detectado em camundongos o aumento da produção de várias citocinas: IL-1, IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10. As ftalimidas aparecem como reguladoras das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e principalmente do TNF (HASHIMOTO, 2002).

A presença do parasita na cultura de macrófagos induziu de forma significativa a produção de TNF. TS01 conseguiu aumentar mais ainda a produção dessa citocina na célula infectada, o que não ocorreu com os compostos substituídos. Já nas culturas não infectadas TS01, TS09, TS10, TS11 e PM01 estimularam a produção de TNF de forma significativa. Esses compostos sofreram a substituição por halogênios e metóxil. Apesar da produção de NO estar reduzida na cultura de macrófago infectada, houve aumento da produção de TNF, pois a ação do TNF na produção de NO é induzida pelo IFN- γ , que não foi acrescentado à cultura (DING et al., 1988; XING et al., 2000). O radical fenil, presente nessas moléculas, pode ser o atuante nessa regulação positiva da produção de TNF (MYIACHI et al., 1996).

A infecção dos macrófagos com *L. amazonensis* causou um discreto aumento da produção de IL-12, porém não significativo. Já quando houve o tratamento com os compostos TS09, TS11, TS15 e PM01, houve o aumento significativo da produção dessa citocina. Mais uma vez a substituição por halogênios, metóxil e mais um fenil se mostrou eficaz em estimular a produção de citocinas. Outros compostos também foram capazes de induzir a produção de IL-12 em macrófagos não infectados, como a TS01, TS02 e TS12. Esses compostos que não induziram a produção de IL-12 por macrófagos infectados, mas induziram em não infectados possivelmente sofreram a ação de mecanismos imunorregulatórios que ocorreram devido à presença dos parasitas.

A IL-12 é descrita como fator dominante na diferenciação de células Th1 a partir da célula virgem precursora T CD4⁺ (DEL VECCHIO et al., 2007; TRINCHIERI, 1995;). Este comprometimento para Th1 é otimizado por IFN- γ o qual aumenta a expressão de receptores para IL-12, além de inibir o desenvolvimento de células Th2 (FOULDS et al., 2006; O'GARRA, 1998). Por outro lado, a produção de

IL-4 no início de uma resposta imune é descrita como fator indispensável para a polarização no sentido Th2 (SWAIN, 1993). O estímulo da produção de IL-12 causado por uma droga provavelmente acarretaria no desencadeamento de uma resposta com perfil Th1 contra o parasita.

Quanto à produção de IL-10, não houve alterações significativas em sua produção nem na presença do parasita, nem na presença dos compostos na cultura infectada. Já com a cultura de macrófagos não infectados, a presença de alguns compostos causou aumento e outros redução da produção dessa citocina. A presença da IL-10 em quantidades ora aumentada ora reduzida provavelmente reflete mecanismos imunorregulatórios, que são essenciais para a homeostase celular. Isso reforça o papel da IL-10 como citocina regulatória.

Kane e Mosser (2001) investigaram o papel da IL-10 e o curso da infecção em camundongos BALB/c e observaram que animais com ausência de expressão de IL-10 apresentavam um maior controle da progressão da lesão e menor parasitemia que camundongos que expressavam essa citocina. Dos Santos *et al.* (2011) correlacionou o aumento da produção de NO, a redução da produção de IL-10 e redução da quantidade de amastigotas em culturas de macrófagos.

Apesar de o estímulo de IL-10 ser prejudicial por facilitar a replicação do parasita em células do hospedeiro, citocinas pró- inflamatórias, como IFN- γ , TNF e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas, a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1, podendo prevenir a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998). Apesar da importância da resposta Th1 na cura da infecção, vale ressaltar que as mesmas citocinas envolvidas no controle da infecção podem estar relacionada com a patogênese da doença. É necessária a existência de um contrabalanço com as células produtoras de citocinas do tipo Th2, ou seja, uma dicotomia Th1 x Th2 (REIS *et al.*, 2006).

Diante do exposto, nossos resultados sugerem os compostos TS01, TS11 e PM01 como agentes promissores para o tratamento da leishmaniose cutânea. Esses três compostos além de apresentarem atividade contra ambas as forma evolutiva de *L. amazonensis*, também demonstraram habilidades imunomodulatórias: a TS01 mostrou-se capaz de induzir a produção de TNF, IL-12 e IL-10, a TS11 induziu a produção dessas mesmas citocinas e de NO. Já a PM01 além de induzir a produção

das citocinas TNF, IL-12 e IL-10, induziu também a produção de NO e a morte celular do parasita por apoptose.

7 CONCLUSÕES

- a) Os índices de seletividade encontrados para os compostos analisados demonstraram a baixa toxicidade para macrófagos peritoniais, com elevada seletividade para o parasita;
- b) Todos os compostos analisados apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, inibindo o crescimento da cultura *in vitro*;
- c) A citometria de fluxo foi uma ferramenta útil para a análise rápida e caracterização da morte celular do parasita induzida pelos compostos;
- d) Os compostos TS02, PM01, PM04 e PM10 foram capazes causar morte celular compatível com apoptose em promastigotas, sugerindo potencial ação na resolução da doença em um tratamento *in vivo*;
- e) O composto TS02 além de induzir apoptose, induziu necrose em promastigotas, sugerindo a um aumento *in vivo* de resposta inflamatória;
- f) Todos os compostos analisados reduziram o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis in vitro*;
- g) O composto TS11 foi capaz de recuperar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados, que havia sido anulada por possíveis mecanismos de escape do parasita;
- h) O composto TS01 foi capaz de estimular a produção de TNF por macrófagos infectados e não infectados, mostrando-se como possível indutor de perfil de resposta Th1;
- i) Os compostos TS09, TS11, TS15 e PM01 foram capazes de estimular a produção de IL-12, uma citocina chave do perfil Th1;

- j) Os compostos TS01, TS09, TS10, TS11, TS12 e PM01 foram capazes de inibir a produção de IL-10, o que seria favorável para a inibição da resposta Th2;
- k) Os resultados sugerem a utilização dos compostos TS01, TS11 e PM01 para ensaios *in vivo*, tendo em vista sua atuação sobre *L. amazonensis* *in vitro* e sobre a produção de mediadores importantes para o curso da LTA, onde poderão ser melhor avaliadas suas propriedades imunomodulatórias.

8 PERSPECTIVAS

1. Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão as alterações ultraestruturais em *L. amazonensis* tratadas com os diferentes compostos derivados da estrutura das tiossemicarbazonas e ftalimidas;
2. Avaliar os efeitos dos compostos derivados da estrutura das tiossemicarbazonas e ftalimidas sobre a leishmaniose cutânea em modelo animal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 99; n. 1, p.17-23, 2005.
- ALMEIDA R. et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colonystimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, p.1735–1737, 1999.
- AMATO, V. S. et. al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, Basel, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ANDRADE, B.B. et. al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas Diagnostic Methods of Tegumentary Leishmaniasis: Facts, Fallacies and Perspectives. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 75-82, 2005.
- ANDRADE, M.S. et al. New outbreak of American tegumentary leishmaniasis in a military training center in the Zona da Mata region, in the north of the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 5, p. 594-596, 2009.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- ÁVILA, S. C.G.P. D. et. al. Estudo retrospectivo dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana diagnosticados no laboratório de patologia do Hospital de Base da FAMERP nos anos de 1995-2000, com enfoque clínico e anatomopatológico. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v.11, n.2, 2004.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 25, p. 203-211, 2009.
- BASANO, S.A.; CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, p. 875–888, 2007.
- BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–

activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.19, p. 5046- 5042, 2011.

BHATTACHARYA, S. K.; JHA, T. K.; SUNDAR, S. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clinical Infectious Disease**. New York, v.38, n.2, p.217–221, 2004.

BOGDAN, C. Nitric oxid and the immune response. **Nature immunology**, New York, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, Malden, v. 173, p. 17-26, 2000.

BRANDÃO- FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Brasília, 2011.

BRELAZ, M. C. A. B. et al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, p. 236–239, 2012.

BRESSI, J. C. et al. Adenosine Analogues as Selective Inhibitors of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of *Trypanosomatidae* via Structure-Based Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 44, p. 2080-2093, 2001.

BRITO, M. E. F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 24, p. 2445-2448, 2008.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.45, n.4, p.425-429, 2012.

BRITTA, E. A. et al. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, e41440, 2012.

CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 49-56, 1992.

CAMPBELL-LENDRUM, D .H. et al. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 13, p. 299, 1999.

CAPUTTO, M. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.19, n. 22, p. 6818–6826, 2011.

CARDOSO, F. O. et al. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice, **Journal of Infectious Diseases**. Chicago, v. 201, n.12, p. 1933–1940, 2010.

CARRERA, L. et al. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 183, p. 515-526, 1996.

CATTAND, P. et al. Tropical diseases lacking adequate control measures: Dengue, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis, Chap. 23 In: Jamison DT. Disease control priorities in developing countries. Washington (DC), WHO, p.451-466, 2006.

CHAI, Y; YAN, S; WONG, I.L.K; CHOW, L.M.C AND SUN, H, Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of inorganic Biochemistry**, New York, p. 2257-2263, 2005.

CHRISTOPHER, L. K.; AUWAERTER, P. G.; MAYER, H. Coinfection with HIV and Tropical Infectious Diseases: Protozoal Pathogens. **Clinical Infectious Disease**, Arlington, v.45, n.9, p.1208-1213, 2007.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Florida, v. 2, p. 124–126, 2010.

COSTA, J.F. et al. Apoptotic mimicry as a possible immunopathogenic mechanism of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, p. 40-44, 2009.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

COUTINHO, S. G. et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 84, p.144-155, 1996.

COUTINHO, S. G. et al. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, p. 139-142, 1998.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin- 10 (IL-10) inhibits the induction nitric oxide synthase by interferon-g in murine macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 182, p. 1155-1159, 1992.

CUPOLILO, S. M. N. et al. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice **Histology and histopathology**, Murcia cidade, v.18, p. 1059-1065, 2003.

DE FREITAS BALANCO, J. M. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, London, v.11, p. 1870–1873, 2001.

DEMICHELI, C; FRÉZARD, F; LECOUEY, M AND GARNIER-SUILLEROT, A, Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1570, p. 192-198, 2002.

DEDET, J.P. et al. The Parasite. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 261-268, 1999.

DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clinical cancer research**, Philadelphia, v. 13, p. 4677-85, 2007.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.95, p. 239-243, 2001.

DING, A. H., NATHAN, C. F., STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of immunology**, New York, v. 141, p. 2407- 2412, 1988.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 251–261, 2005.

DODD, R. H. et al. Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-beta-carbolines. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 32, p. 1272-1276, 1989.

DONDONI, A. Heterocycles in organic synthesis: thiazoles and triazoles as exemplar cases of synthetic auxiliaries. **Organic & biomolecular chemistry**, Cambridge, v. 8, p. 3366-3385, 2010.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 5, p. 337-348, 2008.

DOS SANTOS et al. Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. **Parasitology**, London, v. 138, p. 1224–1233, 2011.

DRAPIER, J. C. et al. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 18, p.1587-1592, 1988.

DRUILHE, P. The importance of models of infection in the study of disease resistance. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 10, S38-S46, 2002.

EVANS, T. G. et al. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, New York, v. 151, p.907–915, 1993.

FADOK, V. A. et al. A receptor for phosphatidylserine- specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, London, v. 6782, p. 85-90, 2000.

FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, New York, v. 72, p. 2155-2164, 2011.

FOULDS, K. E. et al. Th1 memory: implications for vaccine development. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 211, p. 58-66, 2006.

FREITAS et al. Effects of butane-2,3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage induced by cadmium in mice. **The journal of toxicological sciences**, Sapporo, v.37, n. 5, p. 899-910, 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 7, p. 2317-36, 2009.

GAZOZAI, S.U. et al. Comparison of diagnostic methods in cutaneous leishmaniasis (histopathology compared to skin smears). **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 4, p. 363-366, 2010.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L- arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 10, p. 2501-2506, 1992.

GHOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochemical journal**, London, v. 369, p. 447-452, 2003.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, n.7, p. 1-12, 2007.

GOLLOB, K. J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.8, p.1338-1343, 2008.

GOMES, L. I. et al. Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. **Experimental Parasitology**, New York, v. 131, p. 175–179, 2012.

GONTIJO, B. CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, p.71-80, 2003.

GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v.2, art. No. CD004834, 2009.

GOTO, H; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GREEN, S. G., et al. Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 43, p. 87-94, 1994.

HASHIMOTO Y. Structural Development of Biological Response Modifiers Based on Thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 10, p. 461–479, 2002.

HASHIMOTO, Y. Thalidomide as a Multi-Template for Development of Biologically Active Compounds. **Archiv der pharmazie**, Weinheim, v. 341, p. 536–547, 2008.

HEPBURN, N.C.; TIDMAN, M.J.; HUNTER, J.A. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, p.88, n.6, p.700–703, 1994.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, p. 7826–7835, 2010.

HERNANDES, M. Z. et al. Recent Insights on the Medicinal Chemistry of Metal-Based Compounds: Hints for the Successful Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 17, n. 31, p. 3739-3750, 2010.

HIMMELRICH, H. et al. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **The Journal of Immunology**, New York, v. 164, p. 4819- 4825, 2000.

HOLZMULLER P. et al. Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in *Leishmania amazonensis* Amastigotes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3727–3735, 2002.

JACOBSON, R.L. et al. Leishmaniasis in an Era of Conflict in the Middle East. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 10, p. 1-12, 2010.

JAMES, S. L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

JHA, T.K.; OLLIARO, P.; THAKUR, C.P. Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) V sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. **British Medical Journal**, London, v.316, p.1200–1205, 1998.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of immunology**, New York, v. 166, p. 1141- 1147, 2001.

KAUFMANN, S. H; KUCHROO, V. K. Th17 cells. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 5, p.579-83, 2009.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, p. 177-185, 2010.

KOOPMAN, G. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, New York, v. 5, p. 1415-1420, 1994.

KORHONEN, R. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current drug targets. **Inflammation and allergy**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

LAINSON, R.; SHAW J.J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In Collier L, Balows A & Sussman M (Eds). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, 9nd Ed., Arnold, London, v. 5, p. 241-266, 1998.

LEITE, A. C.L. et al. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 3749-3757, 2006)

LIEW, F Y; et al. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, Oxford, v. 69, p. 570-573, 1990.

LIEW, F. Y.; WEI, X.Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 29, n. 352, p. 1311-1315, 1997.

LIÑHARES, G. E. G.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the Field of Drug Design to Combat Tropical Protozoan Parasitic Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 13, p. 335-360, 2006.

MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 21, p. 3114-3119, 2013.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, Tokyo, v. 41, p. 73–78, 2002.

MARIN, C. et al. In vitro activity of scorpiand-like azamacrocyclic derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.62, p. 466-477, 2013.

MARINHO, F. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 507-509, 2011.

MATTHEWS, S. J.; MCCOY C. Thalidomide: A Review of Approved and Investigational Uses. **Clinical therapeutics**, Princeton, v. 25, n. 2, p. 342-95, 2003.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p.14-21, 2006.

MIRANDA-VERASTEGUI et al. Firstline therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist Imiquimod in Combination with pentavalent antimony. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 3, n. 7, e49, 2009.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9-19, 2009.

MOREIRA, M. E. C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 93-115, 2004.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, London, v.366, p.1561-1577, 2005.

MUTH, M. et al. Antitrypanosomal activity of quaternary naphthalimide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 17, p. 1590–1593, 2007.

NATEGHI, R. M. et al. CD8+ T Cells as a Source of IFN- γ Production in Human Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.4, n.10, p. 845, 2010.

NELSON, B. J. et al. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effects reactions to the suppressive effects of TGF- β . **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 146, p. 1849-1857, 1991.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, Cambridge, v. 8, p. 275-283, 1998.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 23, p. 595-602, 2010.

- OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v.387, n.1-2, p.245-253, 2013.
- O'NEAL, S. E. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 142 – 148, 2007.
- ORZESZKO, A. et al. Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 47, n. 1, p. 87–94, 2000.
- OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 7, p. 257–266, 2004.
- OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 66, p. 87-90, 2007.
- PADIGEL, U. M. et al. The Role of Interleukin-10 in Susceptibility of BALB/c Mice to Infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **The Journal of Immunology**, New York, v. 171, n. 7, p. 3705-3710, 2003.
- PASSERO, L. F. D. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. **Parasitology International**, Amsterdam, v.59, p.159–165, 2010.
- PESSOA, C. et al. Discovery of Phthalimides as Immunomodulatory and Antitumor Drug Prototypes. **ChemMedChem**, Germany, v. 5, p. 523 – 528, 2010.
- PINHEIRO, P. H. C., et al. Recombinant Cysteine Proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* Implicated in Human and Dog T-Cell Responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 6, p. 3787–3789, 2005.
- PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, Brasília, DF, v. 16, n. 7-8, p. 79-82, 2004.
- REIS, L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, p. 581–596, 2007.
- REN, H. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Simple and Novel Potential Antimalarial Compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 11, n.14, p. 1851–1854, 2001.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

ROBERTS, M. T. M. Current Understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 75/76, p. 115-130, 2006.

ROCHA, J. S. F.; et al. Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n.8, p. 3823–3832, 2007.

ROCHA, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.11, n. 2, p. 156-166, 2006.

ROJAS R. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, n.10, p.1375-1383, 2006.

ROMÃO et al. Leishmaniose: Resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. **Revista de pesquisa e extensão em saúde**, v. 3, n. 1, 2007.

SAKAGUCHI S., et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, Cambridge, v. 133, p. 775-87, 2008.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Th17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 120, n. 2, p. 247-254, 2007.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Londres, n. 21, v. 5, p. 483-488, 2008.

SEN, R.; CHATTERJEE M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, p. 1056– 1069, 2011.

SERENO, D. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* Species & Its Relevance to Disease Pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.123, n.3, p. 233–244, 2006.

SOTO, J. et al. Limited efficacy of injectable aminosidine as single-agent therapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.88, n.6, p.695–698, 1994.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, New York, v.38, n.9, p.1266-1272, 2004.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, v. 10, p. 209, 2010.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 6, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, p. 1739–1746, 2002.

SUNDAR S., CHATTERJEE M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 345–352, 2006.

SWAIN, S. L. IL-4 dictates T-cell differentiation. **Research in immunology**, Paris, v. 144, p. 616-620, 1993.

TAYLOR, M. C. et al. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 64, n.2, p. 293-301, 1994.

TENÓRIO, R. P. et al. TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TOLEDO, V. P. C. P. et al. Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: immunological aspects before and after Treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 89-98, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 13, p. 251–276, 1995.

VAN GRIENSVEN J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, p. 184–194, 2010.

VAN ZANDBERGEN G. et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 37, p. 13837-13842, 2006.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VICINI, P. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Benzo[d]isothiazole, Benzothiazole and Thiazole Schiff Bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 11, p. 4785–4789, 2003.

VIEITES, M. et al. Platinum(II) metal complexes as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 102, p. 1033–1043, 2008.

VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, Malden, v. 16, p. 340-346, 2007.

VOULDOUKIS, I. et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, p.860–865, 1997.

WANDERLEY, J. L. et al. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 6, p. 807-812, 2005.

WANG, Z. E. et al. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 179, n. 4, p. 1367-1371, 1994.

WHO. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 2010.

XING, Z.; ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO, M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF- α and nitric oxide from macrophages via IFN- γ induction. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 68, n. 6, p. 897-902, 2000.

ZANGGER, H. et al. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell death and differentiation**, Oxford, v. 9, p. 1126-1139, 2002.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v. 9, p. 1126 – 1139, 2002.

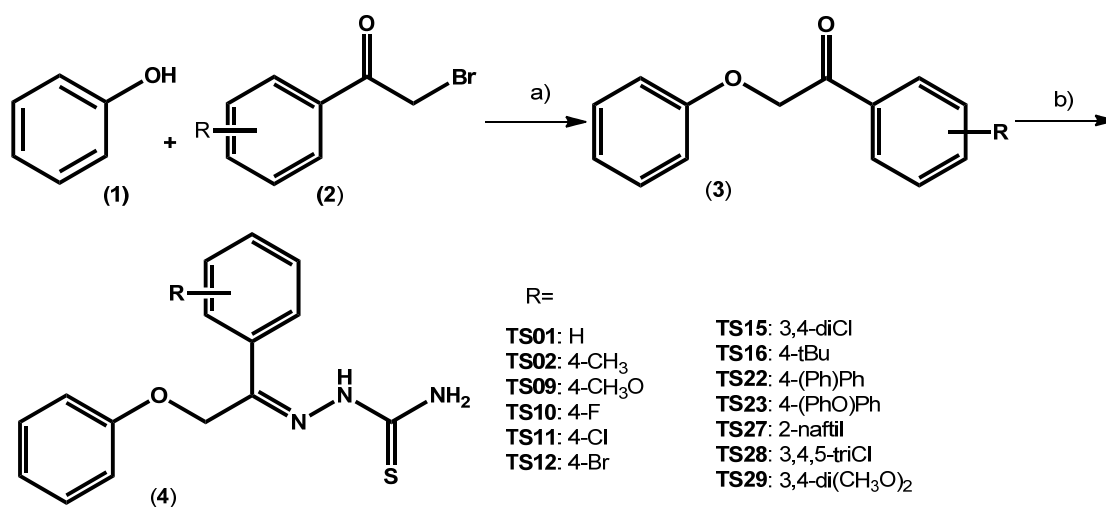
ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, Maryland, v. 19, p. 124-128, 2004.

APÊNDICE 1

1. Síntese das tiossemicarbazonas

A figura 38 apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das aril-tiossemicarbazonas. As aril-tiossemicarbazonas foram planejadas pela introdução da subunidade fenila em C1. Inspirados pelas características estruturais previamente identificadas na série, o grupo etila foi introduzido na posição C5 no anel tiazolidínico. Por razões experimentais, foi decidido manter o NH livre. Já na posição C1, os substituintes foram selecionados de tal forma a investigar grupos funcionais com contribuições estereoeletrônicas diferentes: -H, -F, -Cl, -Br, -Me, -OMe, -OPh, -^tBu e -Ph.

Figura 38 - Planejamento sintético das tiossemicarbazonas



Fonte: Elaborado por Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Nota: Reagentes e condições: a) K₂CO₃, 80 °C, 5 horas; b) tiossemicarbazida; etanol, ácido acético, refluxo, 2 horas.

As tiossemicarbazonas foram preparadas com rendimentos satisfatórios (55–83 %) e isoladas como sólidos cristalinos. Estes compostos foram caracterizados por técnicas espectrométricas (RMN de ¹H e ¹³C, IV) e por EMAR.

Nos espectros de RMN de ^1H de algumas das tiossemicarbazonas, foram observados sinais duplicados referentes aos hidrogênios do metileno. Nos espectros de RMN de ^{13}C , o mesmo tipo de duplicidade referente ao carbono do metileno foi observado. Este comportamento, que foi observado anteriormente com as tiossemicarbazonas, é sugestivo da formação de uma mistura de diastereoisômeros (*Z*) e (*E*).

Os compostos foram isolados como sólidos cristalinos, mesmo assim não foi obtido sucesso na obtenção de cristais apropriados para a difração de raios-X. Por este motivo, não foi possível inferir com precisão a geometria dos compostos.

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados ($\text{DMSO-}d_6$, CDCl_3 , D_2O) são da marca CIL (Tédia Brazil). Tiossemicarbazida foi adquirida pela Acros Organics e recristalizada em etanol. Acetato de sódio foi fundido em bico de Bunsen antes do uso. Os solventes ciclohexano, hexano, acetato de etila e tolueno foram destilados, enquanto que etanol e 2-propanol foram usados como adquirido pelos fornecedores.

As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F_{254} . As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm). Usou-se sílica gel de 70-230 mesh na cromatografia em coluna.

As reações mediadas pela irradiação no ultrassom foram realizadas em banho de ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W). Em todas as reações no ultrassom, não houve aquecimento externo.

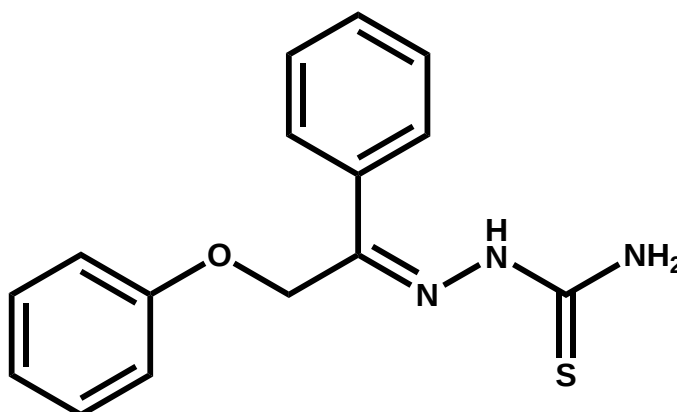
Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos.

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT, HSQC e HMBC) bem como a adição de D_2O para a localização dos sinais de NH. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foi designada da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dubleto; q / quarteto; m / multipeto.

Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr. As micro-análises para C, N, H, S foram feitas em um analisador elementar Carlo Erba (modelo EA 1110). Para os espectros de absorção no ultravioleta, o instrumento de varredura Shimadzu modelo 1240 foi utilizado. Para os espectros de massas de alta-resolução (EMAR), usou-se a técnica de ionização por electrospray (ESI) nos modos positivos (ESI+) ou negativo (ESI-) com detecção no modo "time-of-flight" (TOF), medidos nos aparelhos LC-IT-TOF da Shimadzu ou nanoUPLC-Xevo G2 Tof da Waters.

1.1 Metodologias sintéticas das tiossemicarbazonas

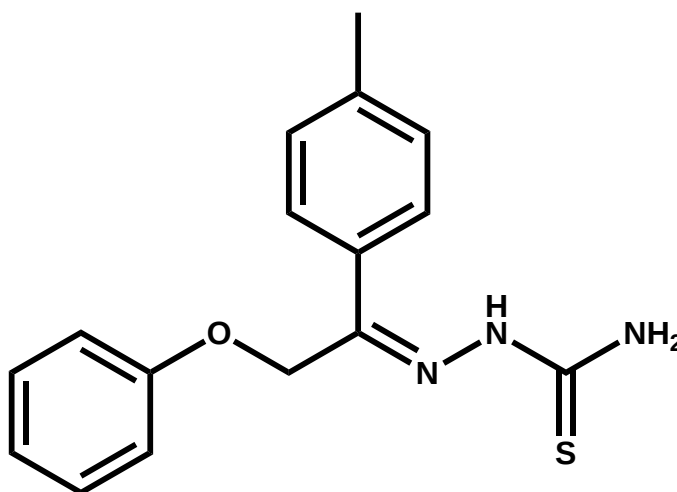
a) 1-(2-Fenóxi-1-feniletilideno)tiossemicarbazida (TS-01)



Em um balão de 100 mL foram adicionados 5 mmol (1.1 g) da 2-fenóxi-1-feniletanona, 50 mL de EtOH, 5.2 mmol (0.49 g) da tiossemicarbazida e uma gota de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em agitação magnética em refluxo durante 2 horas. Após esse tempo, o volume do solvente foi reduzido até a metade sob pressão reduzida. A mistura reacional foi então resfriada, onde observou-se a formação de um sólido, que foi filtrado em funil de Büchner com filtro sinterizado, lavando-se abundantemente com água gelada. Após seco no dessecador, o produto foi recristalizado com tolueno a quente.

Cristais amarelos. Rend: 1.0 g (70 %). P.F.: 190 °C. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3345 e 3398 (NH₂), 3258 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 5.00 e 5.33 (dois s, 2H, CH₂), 6.99 (d, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.39 (s largo, 3H, Ar), 7.92 (s, 2H, Ar), 8.09 e 8.49 (dois s, 2H, NH₂), 10.80 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆),** δ : 61.2 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 127.0 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 129.3 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 179.1 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₁₅H₁₆SON₃ [M+H]⁺: 286.1014; encontrado 286.1000.

b) 1-[1-(4-Toluil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (TS-02)

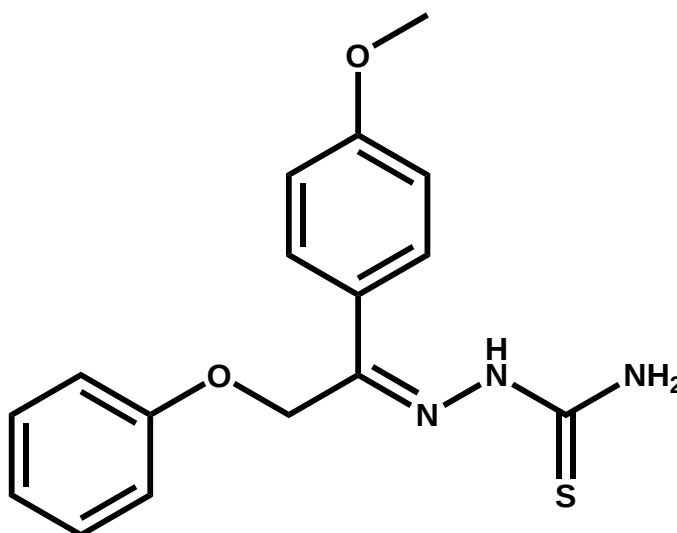


1 mmol (0.23 g) da 1-(4-metilfenil)-2-fenóxiellanona, e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida, 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi recristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos. Rend: 0.25 g (83 %). P.F.: 149-150 °C. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3416 e 3397 (NH₂), 3255 (N–H), 1608 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 2.23 (s, 3H, CH₃), 4.97 e 5.29 (dois s, 2H, CH₂), 6.97 (d, 3H, Ar), 7.20 (d, 2H, J 7.7 Hz, Ar), 7.33 (t, 2H, Ar) 7.82 (d, 2H, J 7.8 Hz, Ar), 8.07 e 8.46 (dois s, 2H, NH₂), 10.74 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 55.2 (CH₃), 61.1 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 126.9

(CH, Ar), 128.9 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 132.8 (Ar), 139.0 (Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 178.9 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para $C_{16}H_{18}N_3SO$ $[M+H]^+$: 300.1171; encontrado 300.1165.

c) 1-[1-(4-Anisil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (TS-09)

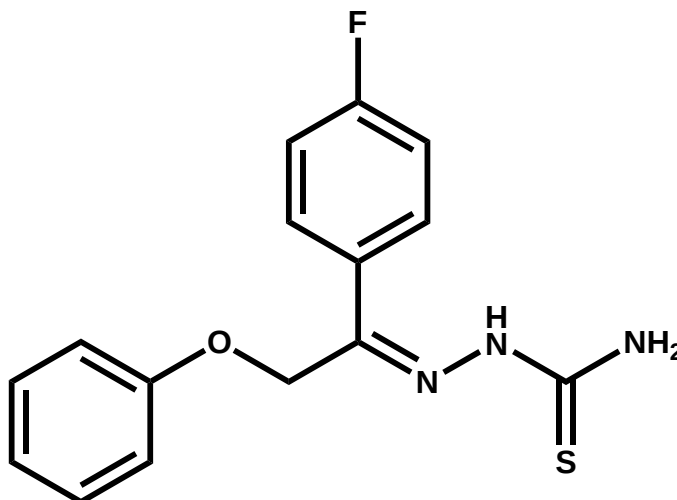


1 mmol (0.25 g) da 1-(4-metóxfenil)-2-fenóxielanona, 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com etanol a quente.

Cristais incolores. Rend: 0.23 g (75 %). P.F.: 170-172 °C. R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3453 (NH₂), 3304 (N–H), 1597 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ :** 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 2H, *J* 8.3 Hz, Ar), 6.98 (m, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.91 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.70 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 55.2 (CH₃), 61.3 e 70.5 (CH₂), 113.6 (CH, Ar), 114.7 (CH, Ar), 114.8 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 128.0 (CH, Ar), 128.6 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 144.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 160.3 (C–O, Ar), 178.9 (C=S).

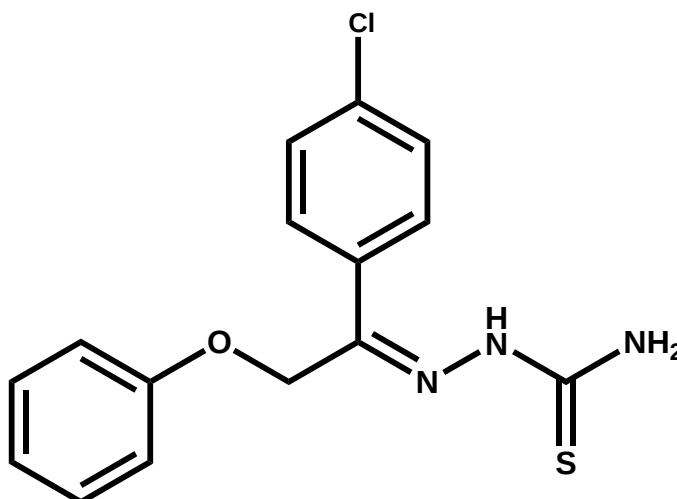
d) 1-[1-(4-Flúorfenil)-2-fenóxi-etilideno]tiossemicarbazida (TS-10)



1 mmol (0.29 g) da 1-(4-flúorfenil)-2-fenóxi-etanona, 50 mL de EtOH e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais incolores. Rend: 0.24 g (80 %). P.F.: 190 °C. R_f = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3413 e 3341 (NH₂), 3243 (N–H), 1601 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**, δ: 5.31 (s, 2H, CH₂), 6.97 (t, 3H, Ar), 7.20 (t, 2H, J 8.8 Hz, Ar), 7.30 (t, 2H, J 7.6 Hz, Ar), 7.91 (m, 2H, Ar), 8.12 e 8.46 (dois s, 2H, NH₂), 10.79 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)**, δ: 61.6 (CH₂), 115.2 (CH, Ar), 115.46 e 115.67 (C–F), 121.8 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 129.9 (CH, Ar), 131.6 (CH, Ar), 132.6 (Ar), 143.8 (C=N), 157.9 (C–O, Ar), 179.6 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₁₅H₁₅SON₃F [M+H]⁺: 304.0920; encontrado 304.0948. Calculado para [M+Na]⁺: 326.0739; encontrado 326.0773.

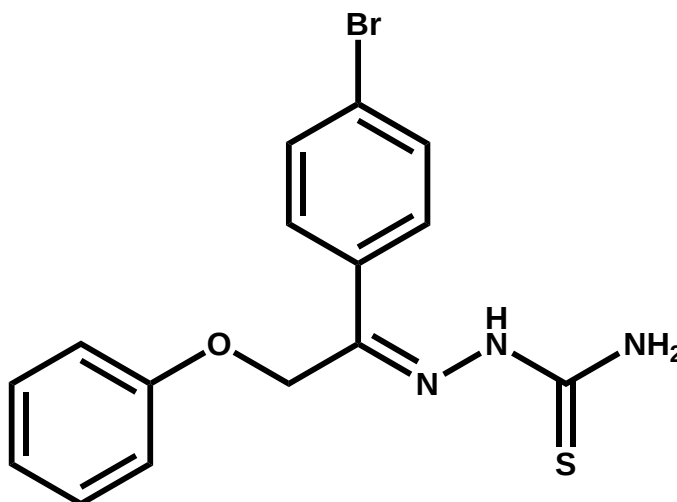
e) 1-[1-(4-Clorofenil)-2-fenóxi-etilideno]tiossemicarbazida (TS11)



2 mmol (0.60 g) da 1-(4-clorofenil)-2-fenóxietaona, e 2.1 mmol (0.20 g) da tiossemicarbazida, 50 mL de EtOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com benzeno a quente.

Cristais amarelos. Rend: 0.50 g (78 %). P.F.: 199-201 °C. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3420 e 3343 (NH₂), 3252 (N–H), 1596 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 5.31 (s, 2H, CH₂), 6.97 (t, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.42 (d, 2H, J 8.8 Hz, Ar), 7.96 (d, 2H, J 8.8 Hz, Ar), 8.15 e 8.49 (dois s, 2H, NH₂), 10.85 (s, 1H, NH). Após a adição de D₂O, os sinais com δ em 8.15, 8.49 e 10.85 ppm diminuem. **RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 60.9 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 128.8 (CH, Ar), 129.4 (CH, Ar), 133.9 (Ar), 134.5 (Ar), 143.1 (C=N), 157.4 (C–O, Ar), 179.2 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₁₅H₁₅SON₃Cl [M+H]⁺: 320.0624; encontrado 320.0615.

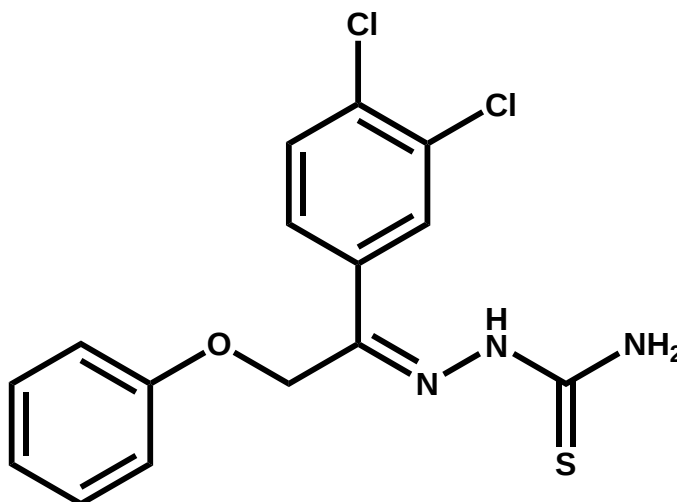
f) 1-[1-(4-Bromofenil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (TS-12)



1 mmol (0.3 g) da 1-(4-bromofenil)-2-fenóxi-tanona, 30 mL de EtOH e 1.1 (0.1 g) mmol de tiossemicarbazida e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

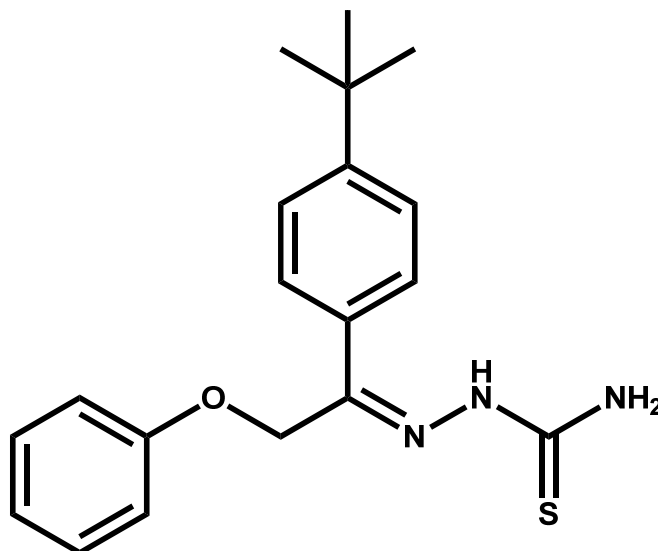
Cristais amarelos. Rend: 0.19 g (55 %). P.F.: 200-202 °C. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3398 e 3330 (NH₂), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.94 (t, 2H, Ar), 7.26-7.35 (m, 3H, Ar), 7.56 (d, 2H, J 8.4 Hz, Ar), 7.89 (d, 2H, J 8.4 Hz, Ar), 8.10 e 8.53 (dois s, 2H, NH₂), 10.09 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆),** δ : 60.03 (CH₂), 114.7 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 122.0 (CH, Ar), 128.3 (CH, Ar), 129.1 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 131.1 (Ar), 134.9 (Ar), 143.2 (C=N), 157.5 (C–O, Ar), 179.2 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₁₅H₁₅N₃SOBr [M+H]⁺: 364.0119; encontrado 364.0150.

g) 1-[1-(3,4-Diclorofenil)-2-fenóxiethylideno]tiossemicarbazida (TS-15)



2 mmol (0.64 g) da 1-(3,4-diclorofenil)-2-fenóxiellanona, 50 mL de EtOH e 2.1 mmol de tiossemicarbazida (0.2 g) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado com etanol a quente.

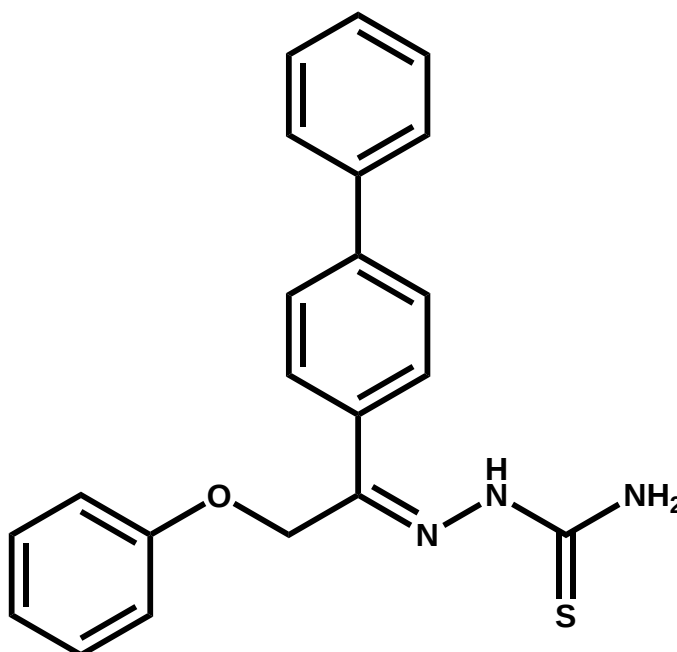
Cristais amarelos. Rend: 0.39 (56 %). P.F.: 189 °C. Rf = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3398 e 3345 (NH₂), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆)**, δ: 5.32 (s, 2H, CH₂), 6.94-7.00 (m, 3H, Ar), 7.31 (t, 2H, Ar), 7.60 (d, 1H, J 8.7 Hz, Ar), 7.86 (dd, 1H, J 8.7 e 1.8 Hz, Ar), 8.28 (d, 1H, J 1.8 Hz, Ar) 8.36 e 8.59 (dois s, 2H, NH₂), 10.95 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆)**, δ: 60.7 (CH₂), 114.8 (CH, Ar), 121.4 (CH, Ar), 127.3 (CH, Ar), 128.7 (CH, Ar), 129.5 (CH, Ar), 129.8 (CH, Ar), 130.2 (CH, Ar), 131.4 (Ar), 131.7 (Ar), 136.2 (Ar), 141.9 (C=N), 157.4 (C–O, Ar), 179.2 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₁₅H₁₄N₃SOCl₂ [M-H]⁺: 352.0078; encontrado 352.1129.

h) 1-[1-(4-*Terc*butilfenil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (TS-16)

1 mmol (0.27 g) da 1-(4-*terc*butilfenil)-2-fenóxietaona, 30 mL de EtOH e 1.1 mmol (0.1 g) da tiossemicarbazida e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.25 g (73 %). P.F.: 145-147 °C. R_f = 0.5 (tolueno / acetato de etila 7:3). I.V., principais absorções: 3453 (NH₂), 3304 (N–H), 1596 (C=N) cm⁻¹. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 1.24 (s largo, 9H, 3xCH₃), 5.29 (s, 2H, CH₂), 6.90 (m, 2H, Ar), 7.31 (d, 2H, J 8.4 Hz, Ar), 7.39 (d, 3H, J 8.4 Hz, Ar), 7.93 (s largo, 2H, Ar), 8.08 e 8.47 (dois s, 2H, NH₂), 10.74 (s, 1H, NH). RMN ¹³C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 31.2 (CH₃), 33.8 (C–CH₃), 61.4 (CH₂), 114.2 (CH, Ar), 126.0 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.2 (CH, Ar), 129.2 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 143.6 (Ar), 144.2 (C=N), 155.2 (C–O, Ar), 179.0 (C=S). EMAR (ESI): Calculado para C₁₉H₂₄N₃SO [M+H]⁺: 342.1640; encontrado 342.1663. Calculado para [M+Na]⁺: 364.1460; encontrado 364.1493.

i) 1-[1-(1,1'-Bifenil)-2-fenóxi-etilideno]tiossemicarbazida (TS-22)

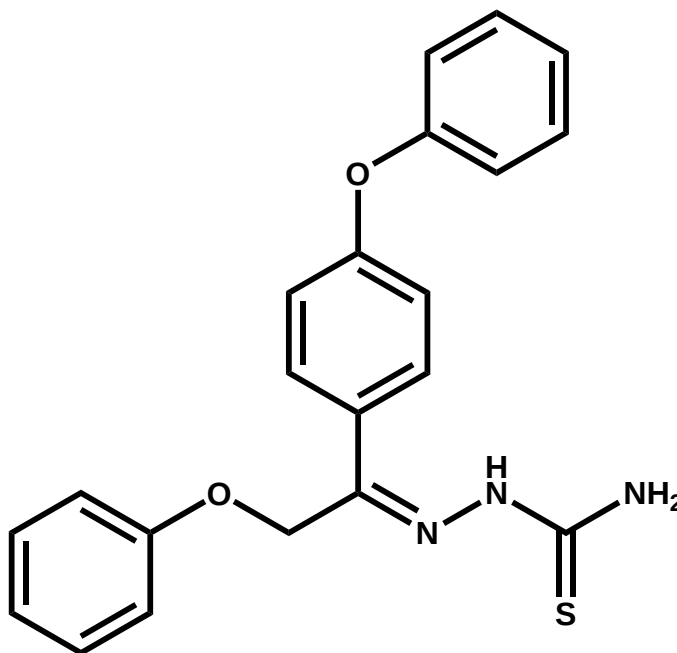


1.5 mmol (0.43 g) da 1-[4-fenil(4'-fenil)-2-fenóxi-etanona, 30 mL de EtOH e 1.6 mmol de tiossemicarbazida (0.14 g) e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi re-cristalizado do benzeno a quente.

Cristais amarelos. Rend: 0.30 g (55 %). P.F.: 210 °C. Rf = 0.3 (tolueno). **I.V., principais absorções:** 3418 e 3351 (NH₂), 3243 (N-H), 1600 (C=N) cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 5.36 (s, 2H, CH₂), 6.97-7.02 (m, 3H, Ar), 7.31 e 7.40 (dd, 2H, J 8.4 e 1.2 Hz, Ar), 7.48 (t, 3H, Ar), 7.72 (t, 4H, Ar), 8.04 (d, 2H, J 8.4 Hz, Ar), 8.17 e 8.52 (dois s, 2H, NH₂), 10.85 (s, 1H, NH). Após a adição de D₂O, os sinais com δ 8.17, 8.52 e 10.85 diminuem. **EMAR (ESI):** Calculado para C₂₁H₂₀N₃OS [M+H]⁺: 362.1327; encontrado 362.1319.

j) 1-[1-(4-Fenóxifenil)-2-fenóxietyliden]tiossemicarbazida (TS-23)



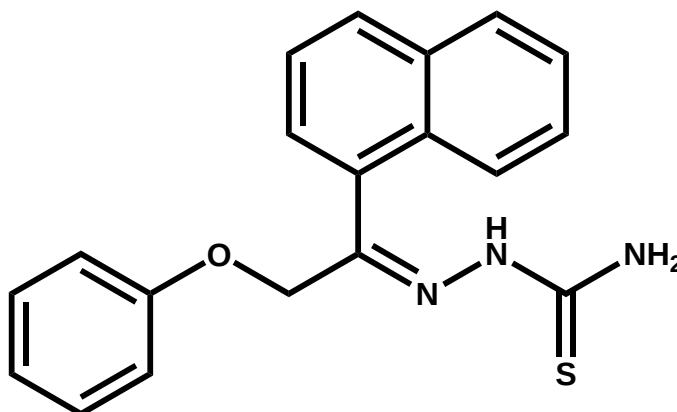
2 mmol (0.60 g) da 1-(4-fenóxifenil)-2-fenóxietylidenona, 2.1 mmol (0.2 g) da tiossemicarbazida, 50 mL de MeOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi recristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.42 g (55 %). P.F.: 210-213 °C. Rf = 0.3 (tolueno).

I.V., principais absorções: 3414 e 3339 (NH₂), 3253 (N–H), 1609 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ:** 5.39 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.95 (m, 2H, Ar), 6.99-7.10 (m, 5H, Ar), 7.32-7.42 (m, 5H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.73 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ:**

61.9 (CH₂), 116.6 (CH, Ar), 117.3 (CH, Ar), 120.3 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 150.2 (C–O, Ar), 153.3 (C–O, Ar), 157.6 (C–O, Ar), 179.1 (C=S). **EMAR (ESI):** Calculado para C₂₁H₂₀N₃O₂S [M+H]⁺: 378.1276; encontrado 378.1302. Calculado para [M+Na]⁺: 400.1096; encontrado 400.1126.

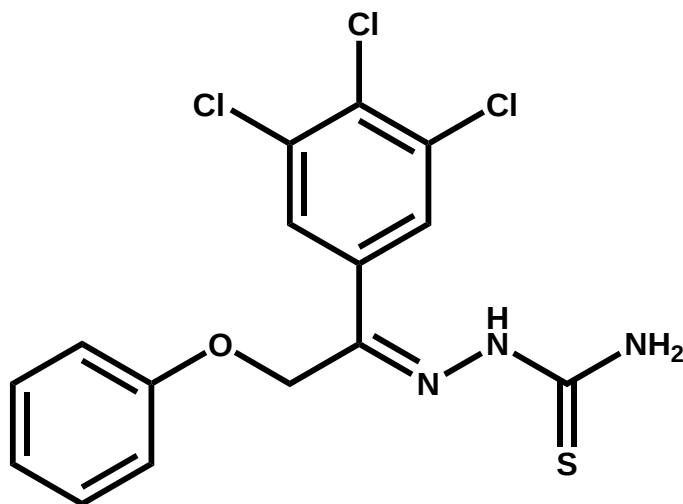
k) 1-[1-(1-Naftil)-2-fenóxietylideno]tiossemicarbazida (TS-27)



2 mmol (0.60 g) da 1-(1-naftil)-2-fenóxi-etanona, 2.1 mmol (0.2 g) da tiossemicarbazida, 50 mL de MeOH e uma gota de ácido acético glacial. O produto foi recristalizado do tolueno a quente.

Cristais incolores. Rend.: 0.41 g (50 %). P.F.: 210-213 °C. Rf = 0.3 (tolueno). **I.V., principais absorções:** 3414 e 3339 (NH₂), 3253 (N–H), 1609 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ:** 5.39 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.95 (m, 2H, Ar), 6.99-7.10 (m, 5H, Ar), 7.32-7.42 (m, 5H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.73 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ:** 61.9 (CH₂), 116.6 (CH, Ar), 117.3 (CH, Ar), 120.3 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 150.2 (Ar), 157.6 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).

I) 1-[1-(3,4,5-tricloro)-2-fenóxiethylideno]tiossemicarbazida (TS-28)



Cristais amarelos. Rend.: 0.59 g (61 %);

P.F.: 230-232 °C;

I.V., principais absorções

3414 e 3339 (NH₂), 3253 (N–H), 1609 (C=N) cm⁻¹

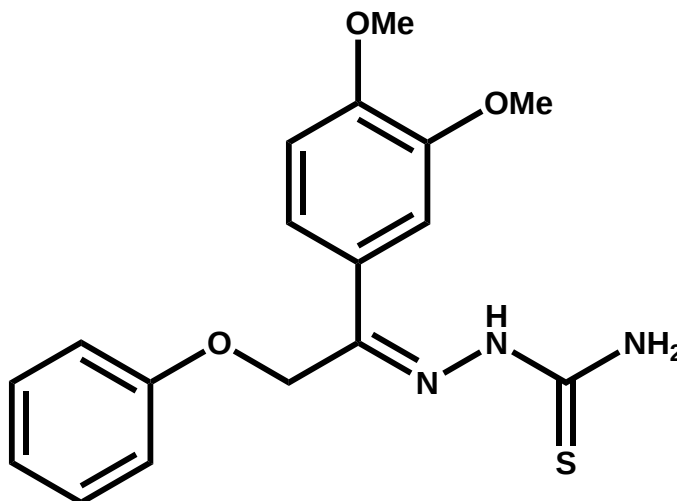
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ

5.39 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.95 (m, 2H, Ar), 6.99-7.10 (m, 5H, Ar), 7.32-7.42 (m, 5H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.73 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ

61.9 (CH₂), 116.6 (CH, Ar), 117.3 (CH, Ar), 120.3 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 150.2 (Ar), 157.6 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).

m) 1-[1-(3,4-dimetoxifenil)-2-fenóxi-etilideno]tiossemicarbazida (TS-29)

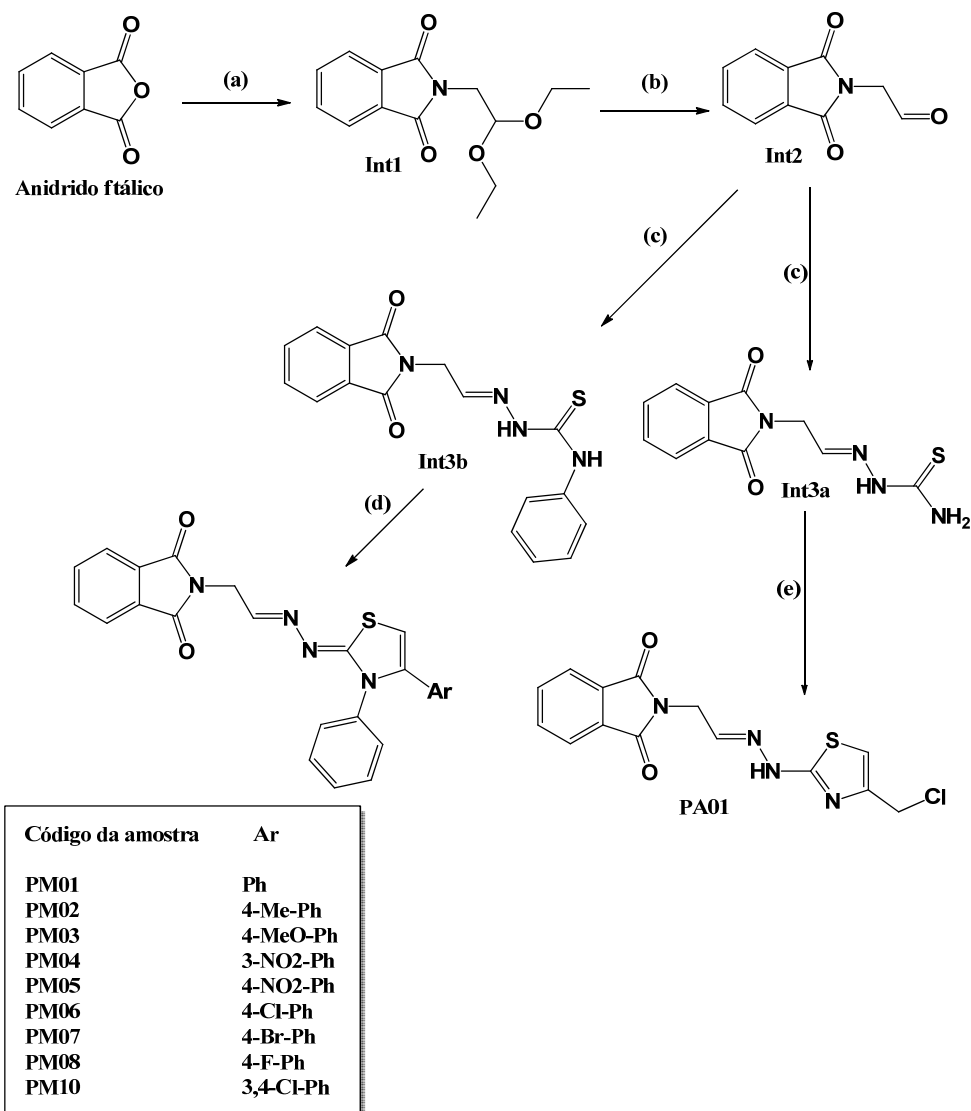


Cristais incolores. Rend.: 0.39 g (48 %). P.F.: 119 °C. **I.V., principais absorções:** 3414 e 3339 (NH₂), 3253 (N–H), 1609 (C=N) cm⁻¹. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 5.39 (s, 2H, CH₂), 6.92-6.95 (m, 2H, Ar), 6.99-7.10 (m, 5H, Ar), 7.32-7.42 (m, 5H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, Ar), 8.05 e 8.43 (dois s, 2H, NH₂), 10.73 (s, 1H, NH). **RMN ¹³C (75.5 MHz, DMSO-*d*₆),** δ: 61.9 (CH₂), 116.6 (CH, Ar), 117.3 (CH, Ar), 120.3 (CH, Ar), 122.6 (CH, Ar), 126.9 (CH, Ar), 128.1 (CH, Ar), 129.7 (CH, Ar), 135.6 (Ar), 144.2 (C=N), 150.2 (Ar), 157.6 (C–O, Ar), 179.1 (C=S).

2. Síntese das ftalimidas

A figura 39 apresenta o planejamento da síntese da série ftalil-hidrazona-tiazol. A síntese da série ftalil-hidrazona tiazol teve como grupamentos base a ftalimida e a tiazoli-hidrazona (bioisótero cíclico da tiossemicarbazona). De posse desses grupos farmacofóricos foi utilizada a ferramenta química de hibridação molecular. Somado a esta técnica foi empregado o bioisosterismo, onde foram utilizados variados substituintes químicos como grupo metil, metóxi, nitro, halogênios (F, Cl, Br).

Figura 39 - Planejamento sintético da série ftali-hidrazona-tiazol



Fonte: Elaborado por Paulo André Teixeira

Nota: Reagentes e condições: (a) 1-aminoacetaldeído dietil acetal, tolueno, refluxo, 4h; (b): Água, H₂SO₄, refluxo, 1h; (c) tiossemicarbazida (para obtenção de do Int 3a) ou 4-fenil-3-tiossemicarbazida (para obtenção do Int3b), EtOH, HCl, refluxo, 3h; (d) respectiva acetofenona, isopropanol, ultrassom.

As metodologias de síntese propostas foram eficazes na obtenção dos produtos desejados, com bons rendimentos e tempo reacional variando em torno de três horas, além de serem utilizados reagentes economicamente viáveis.

Os reagentes foram adquiridos da Acros Organics, Fluka, Vetec ou Sigma-Aldrich, enquanto que os solventes foram provenientes da Vetec ou Dinâmica. Os solventes deuterados (DMSO- d_6 , $CDCl_3$, D_2O) são da marca CIL (Tédia Brazil).

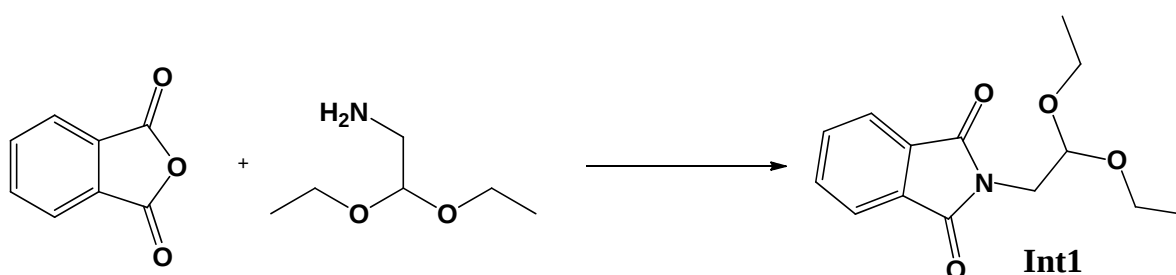
As reações foram acompanhadas em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica-gel 60 contendo indicador fluorescente F_{254} . As placas cromatográficas foram visualizadas em uma lâmpada ultravioleta (com duplo comprimento de onda 365 ou 254nm).

As reações mediadas pela irradiação no ultrassom foram realizadas em banho de ultrassom modelo Unique EM-804 TGR usando frequência de 40 KHz (180 W). Em todas as reações no ultrassom, não houve aquecimento externo. Os pontos de fusão foram medidos em capilares usando um aparelho de Thomas Hoover e os valores não foram posteriormente corrigidos.

Para todos os compostos inéditos, foram feitas as análises de RMN de 1H e ^{13}C e quando necessário, análises bidimensionais (DEPT, HSQC e HMBC) bem como a adição de D_2O para a localização dos sinais de NH. Todos os compostos foram solubilizados em DMSO- d_6 . Os espectros de RMN 1H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para 1H ; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para 1H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN 1H foi designada da seguinte forma: s / singleto; d / dubleto; t / tripleto; dd / duplo dupleto; q / quarteto; m / multipeto. Para os espectros no infravermelho, utilizou-se o instrumento Bruker (Modelo IFS 66) usando pastilhas de KBr.

2.1 Metodologias sintéticas dos compostos intermediários

- a) Síntese do composto intermediário 1 (Int1), 2-(2,2-dietoxietil)isoindolina-1,3-diona: a partir do anidrido ftálico, obtido comercialmente, foi sintetizado primeiramente o produto intermediário Int1 com função dietóxi através de uma reação de imidificação com o reagente aminoacetaldeído-dietil-acetal.

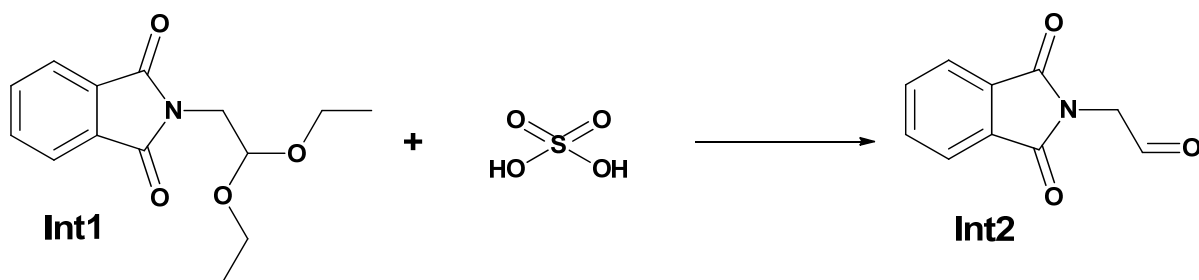


Em balão de fundo redondo, adicionou-se o anidrido ftálico, o aminoacetaldeído dietil acetal, dimetil-amino-piridina (DMAP) e quantidade suficiente para solubilizar(q.s.p.s) de tolueno. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada. Após o término da reação, foram realizadas três extrações tendo como fase orgânica o tolueno. Em seguida realizou-se uma secagem do tolueno com sulfato de sódio anidro. Por fim, o tolueno foi evaporado à vácuo, obtendo-se precipitado puro.

Int1 = 13,5 mmols de anidrido ftálico, 16,2 mmols de aminoacetaldeído dietil acetal, 0,82 mmols de dimetil-amino-piridina (DMAP)

$C_{14}H_{17}NO_4$. Rend: 33,35%. P.F.: 74 a 76°C. R_f = (6:4 – Hexano:Acetato de etila): 0,82. **I.V., principais absorções:** (KBr, cm^{-1}): 1772 e 1717 (C=O), 1070(C-O)

- b) Síntese do composto intermediário 2 (Int2), 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído: através da hidrólise em meio ácido catalítico do Int1



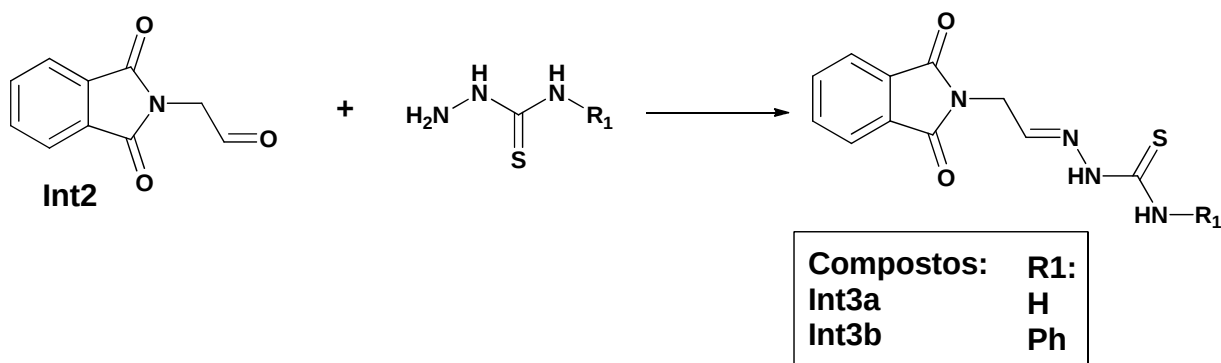
Em balão de fundo redondo, adicionou-se Int1, ácido sulfúrico catalítico e q.s.p.s. de água como solvente. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por placa cromatográfica de camada delgada. Após o término da reação, aguardou-se atingir a temperatura ambiente e foi colocada sob resfriamento para indução da precipitação. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

Int2 = 4,5 mmols de Int1, 7 gotas de H₂SO₄

C₁₀H₇NO₃. Rend: 86,82%. P.F.: 93°C. R_f= (6:4 – Hexano:Acetato de etila): 0,65

I.V., principais absorções: (KBr, cm⁻¹): 1774 e 1699 (C=O).

c) Síntese dos compostos intermediários 3a e 3b (Int3a e Int3b): foram obtidos através de uma reação de aminação em meio ácido com etanol como solvente, onde o nitrogênio 4 da tiossemicarbazida (Int3a) ou da 4-fenil-3-tiossemicarbazida (Int3b) ataca o carbono da carbonila do 2-(1,3-dioxoisindol-2-il)acetaldeído (Int2) e como resultado da desidratação subsequente obtém-se as ftalil-tiossemicarbazonas. Os dois produtos apresentaram tempos reacionais de até 6 horas e rendimentos superiores a 54%.



Em balão de fundo redondo, adicionou-se o Int2, a tiossemicarbazida (na proporção de 1:1), etanol (q.s.p.s) e HCl. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética e refluxo por 4 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com etanol, obtendo-se o produto puro.

Int3a = 3,85 mmols Int2, 3,85mmols tiossemicarbazida, 7 gotas de HCl;

$C_{11}H_{10}N_4O_2S$. Rend: 76%. Rf= (6:4 - Hexano:Acetato de etila): 0,45

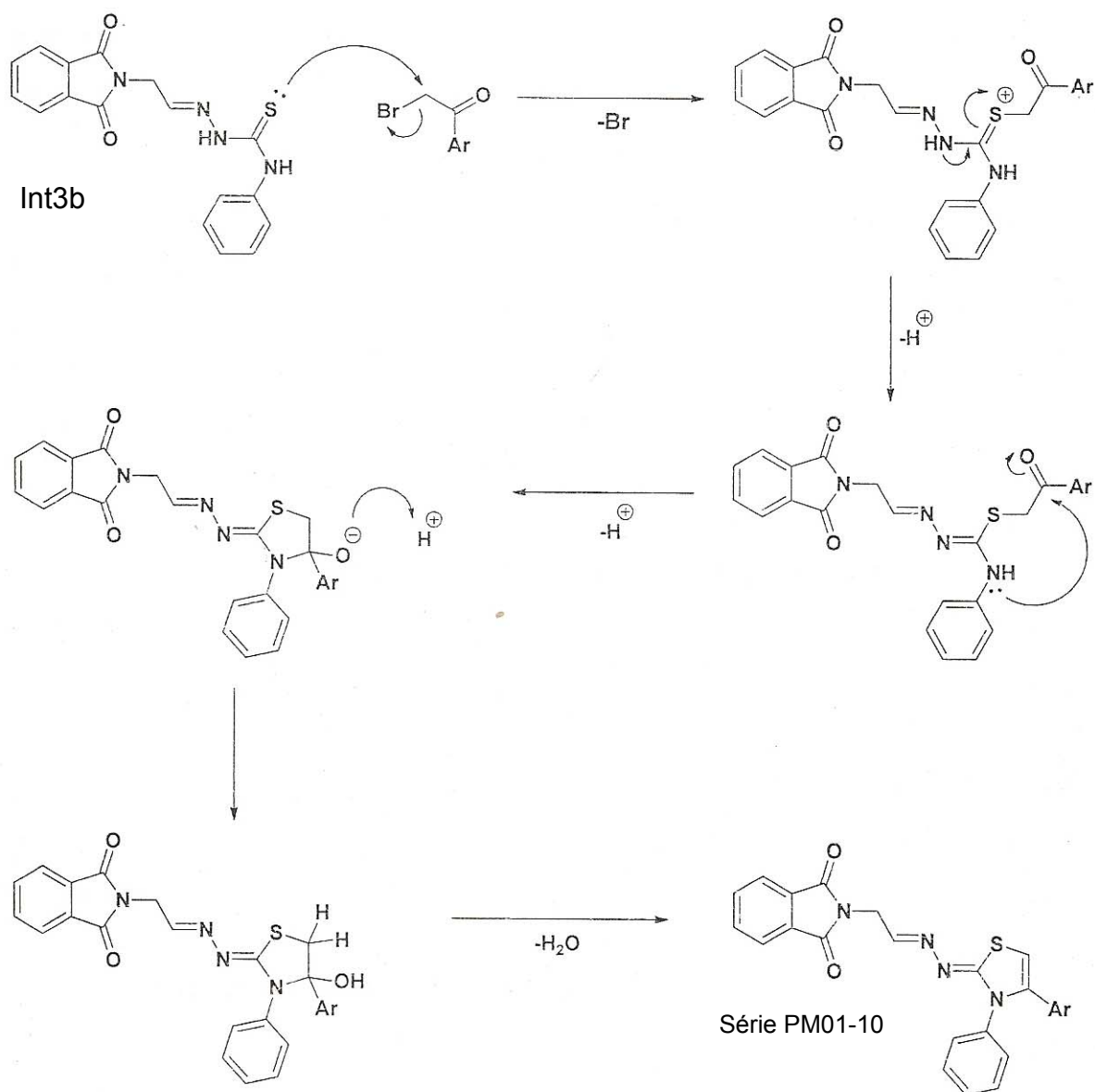
PF: 220 a 224°C. I.V., **principais absorções:** (KBr, cm^{-1}): 3423 e 3308 (N-H), 1769 e 1713 (C=O), 1602 (C=N). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ :** 6.61 (s, 1H, NH₂), 7.54-7.68 (m, 4H, Ar), 9.13 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ :** 122.5 (Ar), 123.2 (Ar), 129.6 (Ar), 130.3 (Ar), 174.5 (C=O), 176.9 (C=O).

Int3b = 3,85 mmols Int2, 3,85mmols 4-fenil-3-tiossemicarbazida, 7 gotas de HCl; $C_{17}H_{14}N_4O_2S$. Rend: 70%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,52. PF:173 - 176°C.

RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ : 4.454 e 4.468 (d, 2H, CH₃), 7.144 (t, 1H, Ar), 7.297 (t, 2H, Ar), 7.481 (t, 2H), 7.518 (t, 1H, Ar), 7.845-7.999 (m, 4H, Ar), 9.660 (s, 1H, NH), 11.718 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ :** 40 (Alif), 129.228 - 138.711 (Ar), 140.917 (C=N), 167.610 (C=O), 175.790 ((NH)₂C=S).

Na síntese da série das ftalil-hidrazona-tiazol o enxofre do Int3 faz ataque nucleofílico ao carbono ligado ao halogênio. Posteriormente ocorre um rearranjo eletrônico da estrutura formada, após perda do hidrogênio ligado ao nitrogênio. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do nitrogênio ao carbono da carbonila. Esta etapa é finalizada com perda de uma molécula de água e o carbono vizinho perde um hidrogênio. Como resultado, ocorre a formação de uma ligação π entre carbonos e ciclização do anel (Figura 40). Nesta série, foi utilizado apenas Int3b.

Figura 40 - Reação da série PM01-10



R=

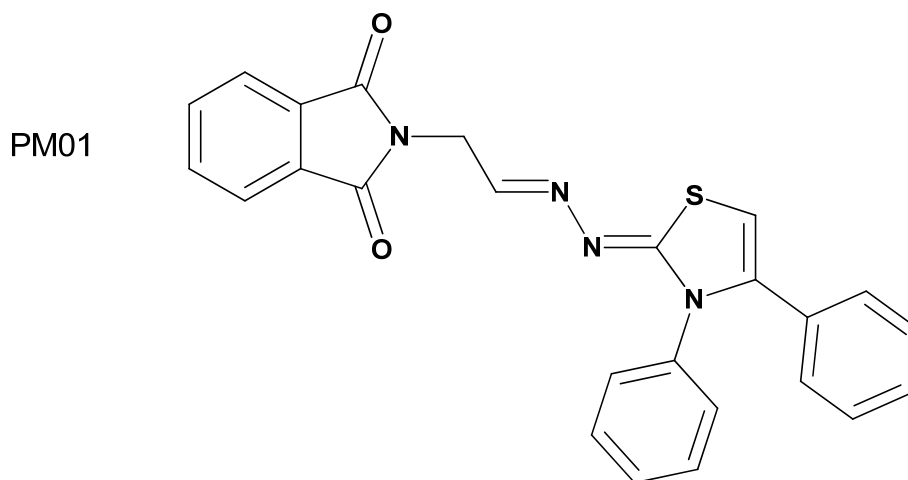
- PM01: Ph
- PM02: 4-Me-Ph
- PM03: 4MeO-Ph
- PM04: 3-NO₂-Ph
- PM05: 4-NO₂-Ph
- PM06: 4-Cl-Ph
- PM07: 4-Br-Ph
- PM08: 4-F-Ph
- PM10: 3,4-Cl-Ph

2.2 Metodologias sintéticas das ftalimidas

Em balão de fundo redondo adicionou-se o Int3b, a respectiva cetona halogenada e isopropanol (q.s.p.s). A mistura reacional foi mantida em ultrassom por 1-2 horas. As reações foram acompanhadas por placa cromatográfica de camada delgada. O precipitado formado foi filtrado em funil sinterizado com água destilada, obtendo-se o produto puro.

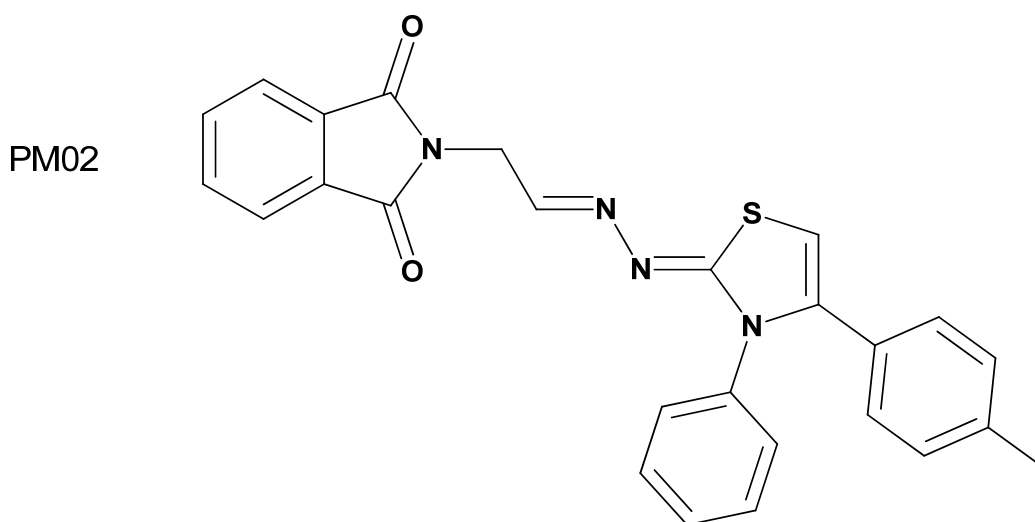
- **PM01**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-acetofenona;
- **PM02**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-metil-acetofenona;
- **PM03**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-metoxi-acetofenona;
- **PM04**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-3'-nitro-acetofenona;
- **PM05**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-nitro-acetofenona;
- **PM06**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-cloro-acetofenona;
- **PM07**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2,4'-dibromo-acetofenona;
- **PM08**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-4'-fluor-acetofenona;
- **PM10**= 1,14 mmol de Int3b, 1,14mmol de 2-bromo-3',4'-dicloro-acetofenona;

a) PM01: 2-(2-((3,4-difeniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindolina-1,3-diona



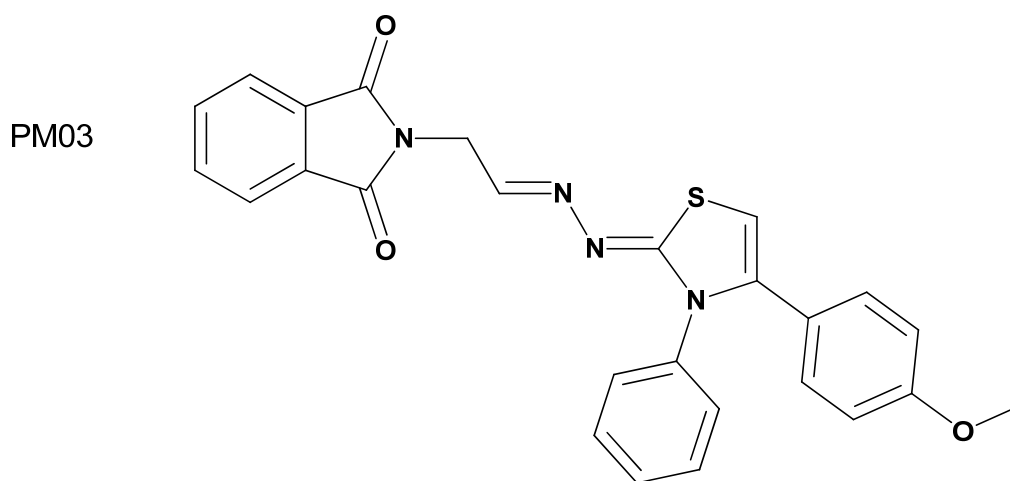
$C_{25}H_{18}N_4O_2S$. Rend: 56%. **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 4.419 (s, 2H, CH₂), 6.450 (s, 1H, CH, tiazol), 7.091-7.320 (m, 10H, CH Ar), 7.442 (t, 1H, HC=N), 7.912-7.883 (m, 4H, CH Ar, ftalimida). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 40.057 (CH₂), 104.240 (Tiazol), 128.124-144.561 (CH, Ar), 148.239 (Tiazol), 165.965 (Tiazol), 167.514 (C=N), 169.987 (C=O).

- b) PM02: 2-(2-((3- fenil-4-(p-tolil)tiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina-1 ,3-diona



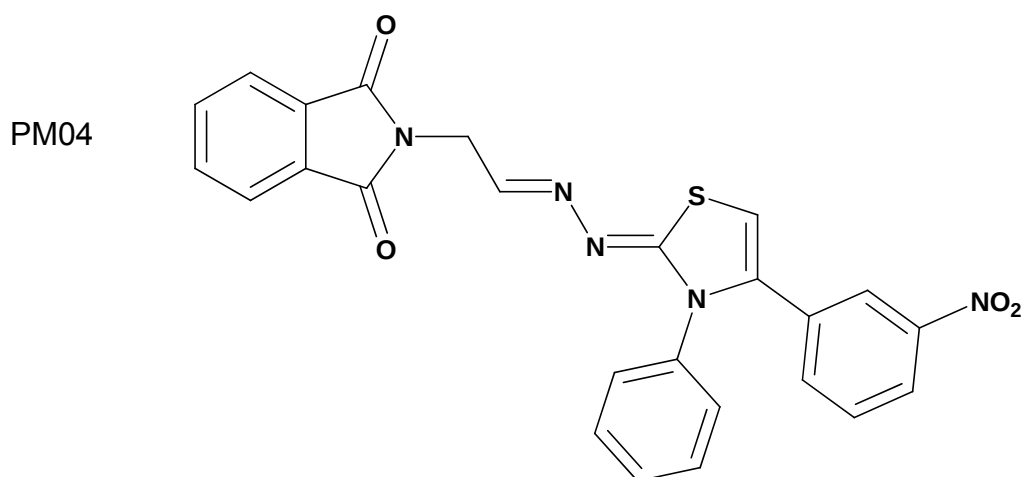
$C_{26}H_{20}N_4O_2S$. Rend: 52%. R_f (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,7. PF: 154- 158°C. **I.V., principais absorções:** (KBr, cm⁻¹): 1712.39 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 2.190 (s, 3H,CH₃), 4.418 (s, 2H, CH₂), 6.409 (s, 1H, CH tiazol), 6.945-6.986 (m, 4H, CH Ar), 7.167-7.445 (m, 6H, CH Ar), 7.881-7.948 (m, 4H, CH Ar ftalimida); **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 20.660 (CH₃), 38.867 (CH₂), 100.669 (CH, tiazol), 123.096-139.456 (CH, Ar), 148.208 (C=N).

- c) PM03: 2-(2-((4-(4-metoxifenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno) hidrazona) etil)isoindolina-1,3-diona



$C_{26}H_{20}N_4O_3S$. Rend: 54%. PF: 173-175°C. I.V., **principais absorções:** (KBr, cm^{-1}): 1713.83 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ :** 4.177 (s, 3H, CH₃), 4.436-4.446 (d, 2H, CH₂), 6.826-8.104 (m, 14H, Ar). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ :** 40.057 (CH₂), 123.073-137.536 (Ar), 146.782 (Tiazol), 167.492 (C=N), 169.643 (C=O).

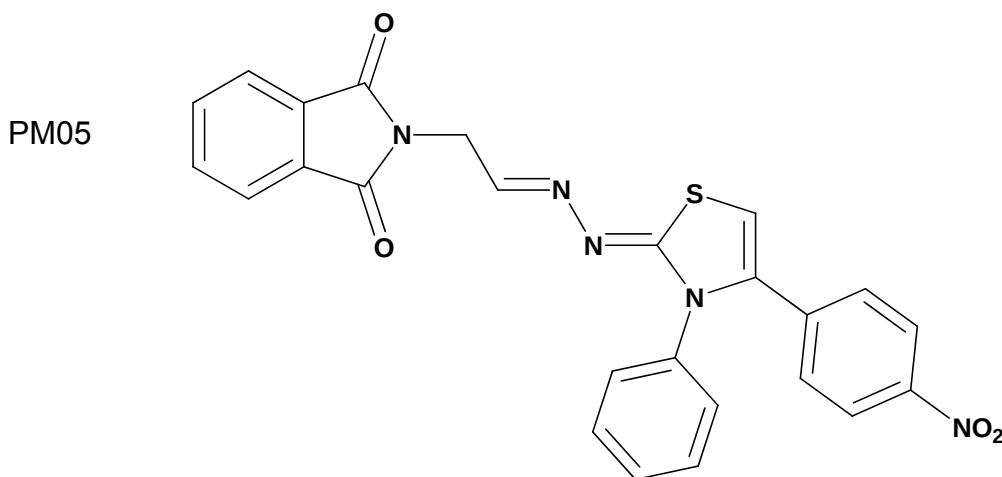
- d) PM04: 2-(2-((4-(3-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona) etil) isoindolina-1,3- diona



$C_{25}H_{17}N_5O_4S$. Rend: 49%. Rf (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,64. PF: 154-154°C.

I.V., principais absorções: (KBr, cm^{-1}): 1712.80 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ :** 4.427-4.436 (d, 2H, CH_2), 6.758 (s, 1H, CH tiazol), 7.250-7.377 (m, 5H, CH Ar), 7.477-7.511 (m, 3H, CH Ar), 7.859-7.947 (m, SR, CH Ar), 8.069 (t, 1H, HC=N).

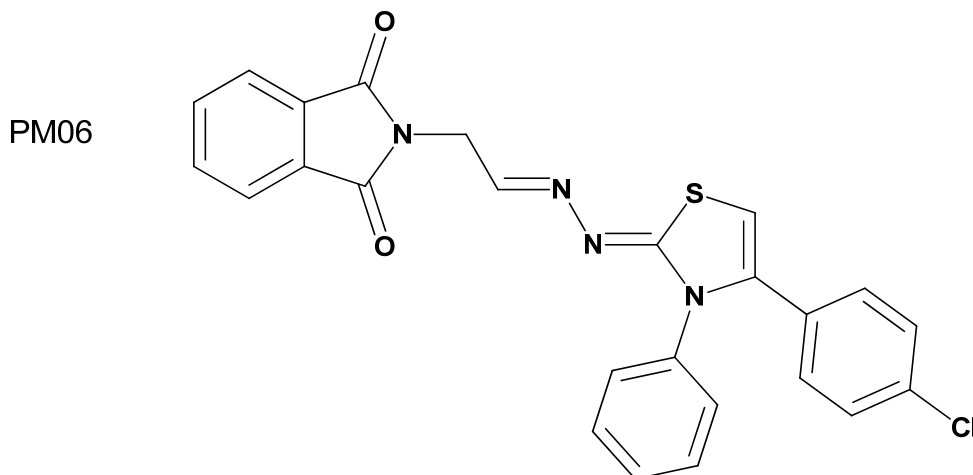
e) PM05: 2-(2-((4-(4-nitrofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindol-1,3-diona



$C_{25}H_{17}N_5O_4S$. Rend. 46%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,75. PF: 186-189°C.

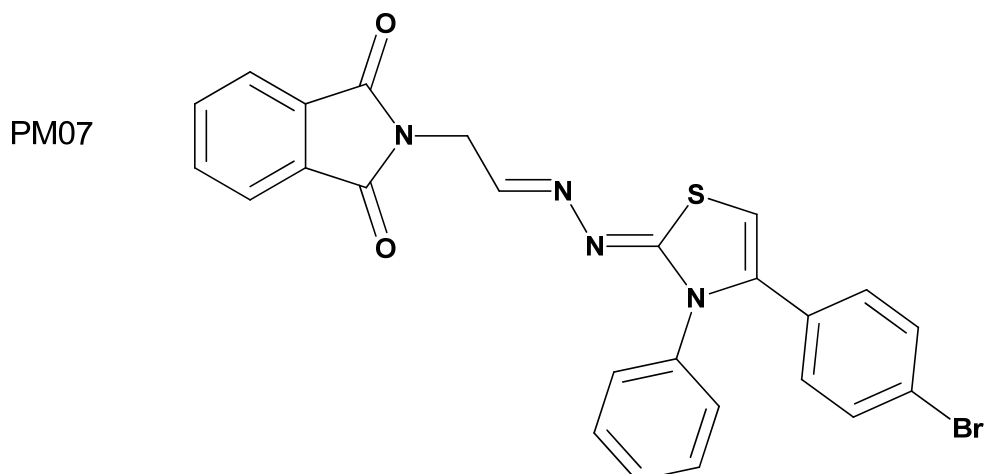
I.V., principais absorções: (KBr, cm^{-1}): 1713.38 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ :** 4.438 e 4.471 (d, 2H, CH_2), 6.778-8.102 (m, 15H, Ar). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ :** 40.057 (CH_2), 123.027- 146.689 (CH_2 , Ar), 167.484 C=N, Tiazol), 169.605 (C=N), 175.748 (C=O).

- f) PM06: 2-(2-((4-(4-chlorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindol-1,3-diona



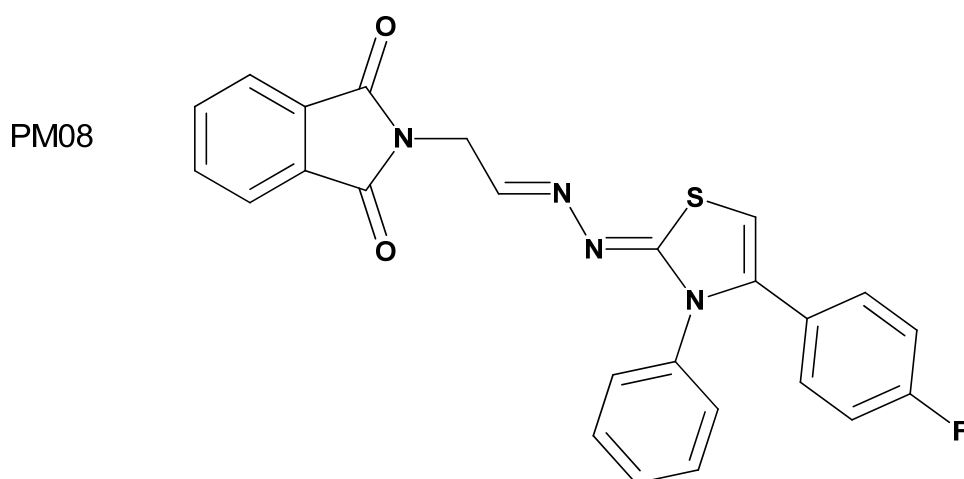
$C_{25}H_{17}ClN_4O_2S$. Rend. 58%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,844. PF: 176-179°C. I.V., **principais absorções**: (KBr, cm^{-1}): 1717.30 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 4.412 e 4.422 (d, 2H, CH_2), 6.503-7.940 (m, 15H, Ar). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6)**, δ : 56.021 (CH_2), 101.844 (Tiazol), 123.088-138.682 (Ar). 167.575 (C=N), 169.888 (C=O).

- g) PM07: 2-(2-((4-(4-brómfenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil)isoindol-1,3-diona



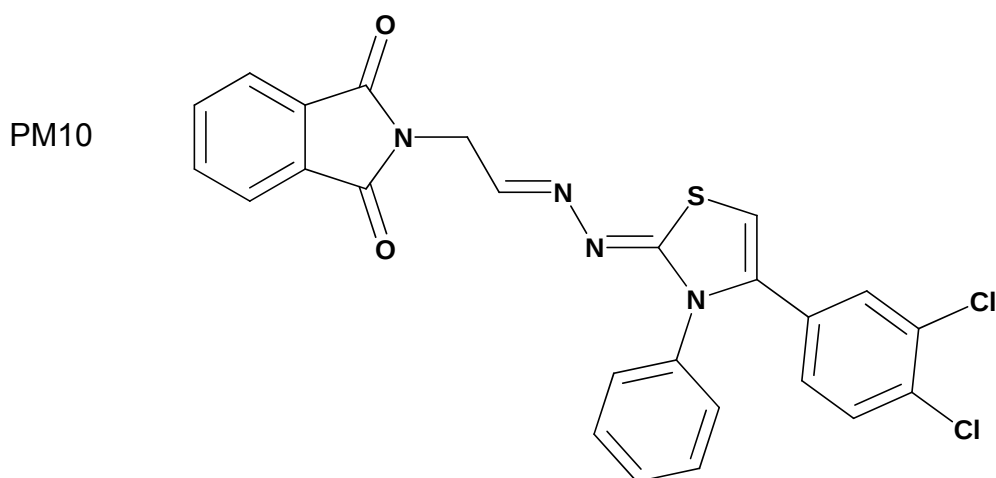
$C_{25}H_{17}BrN_4O_2S$. Rend. 55%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,73. PF: 189-193°C. I.V., **principais absorções:** (KBr, cm^{-1}): 1717.05 (C=O).

h) PM08: 2-(2-((4-(4-fluorofenil)-3-feniltiazol-2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina-1,3- diona



$C_{25}H_{17}FN_4O_2S$. Rend. 50%. Rf= (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,63. PF: 176-179°C. I.V., **principais absorções:** (KBr, cm^{-1}): 1714.47 (C=O). **RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6),** δ : 4.430 e 4.420 (d, 2H, CH₂), 6.465 (s, 1H, CH tiazol), 7.022-7.359 (m, 9H, CH Ar), 7.446 (t, 1H, CH), 7.860-7.947 (m, 4H, CH Ar ftalimida). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6),** δ : 38.875 (CH₂), 101.279 (CH tiazol), 115.060-138.304 (CH Ar), 148.323 (C=N), 160.151 e 163.417 (C-F), 167.583 (C=O), 169.933 (S-C=N).

- i) PM10: 2-(2-((4-(3,4-diclorofenil)-3- feniltiazol- 2(3H)-ilideno)hidrazona)etil) isoindolina- 1,3-diona

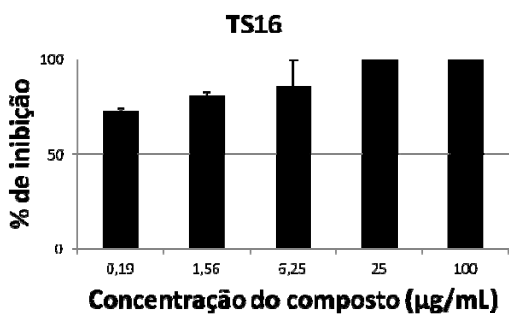
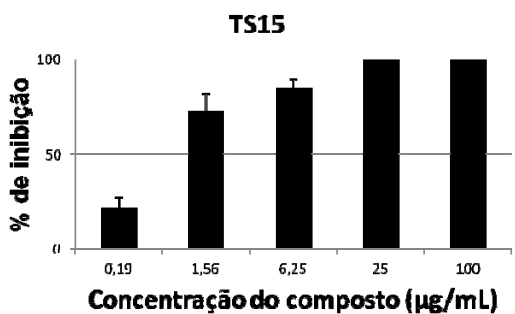
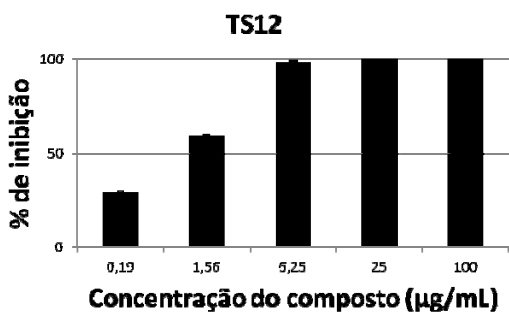
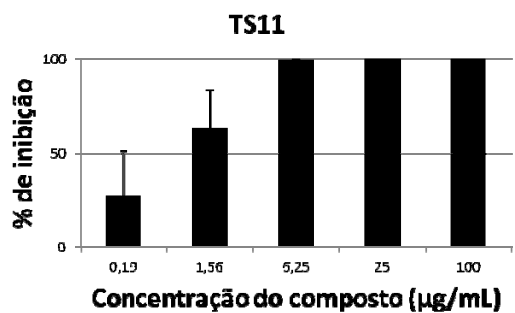
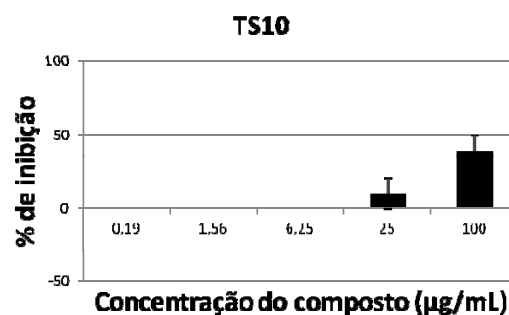
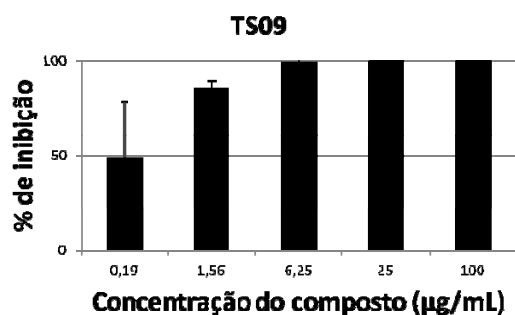
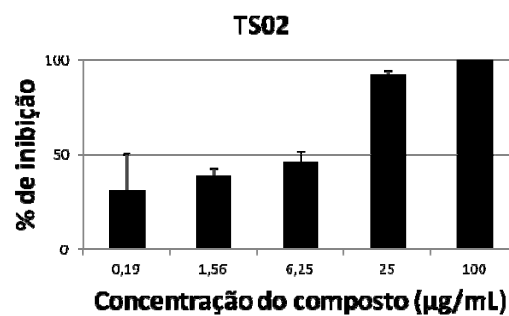
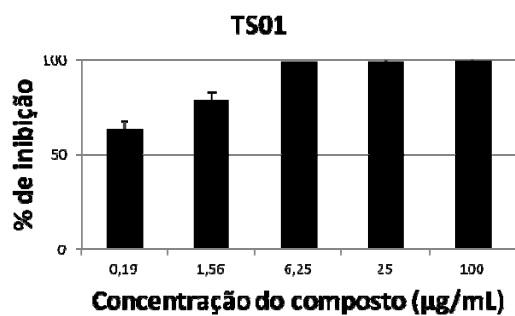


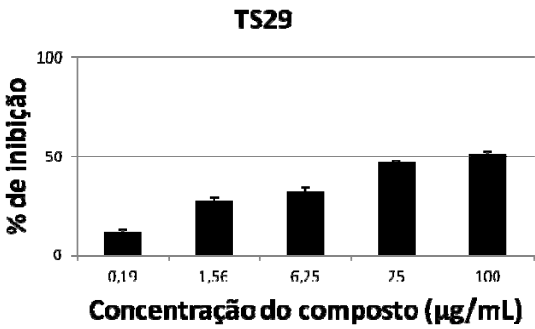
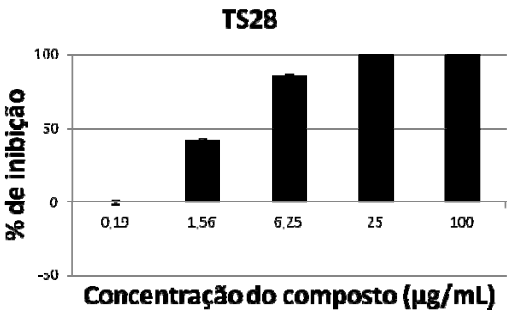
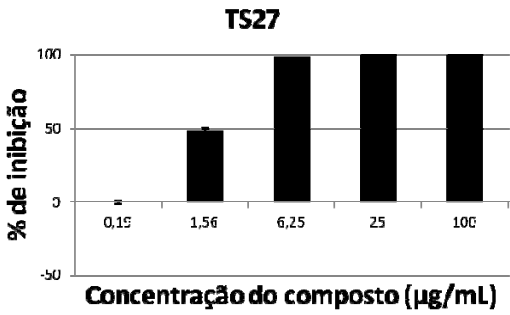
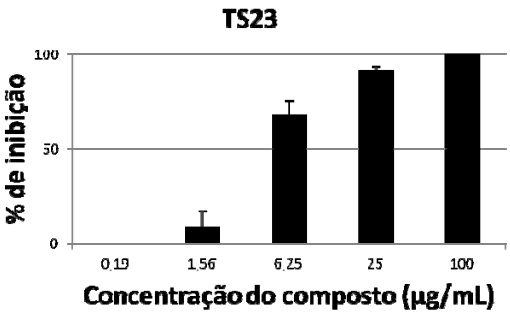
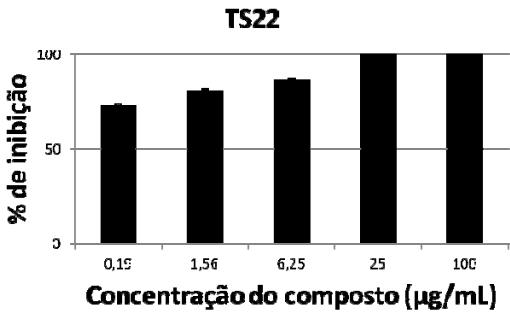
$C_{25}H_{16}Cl_2N_4O_2S$. Rend. 48%. R_f = (6:4-Hexano:Acetato de etila): 0,89. PF: 154-157°C. I.V., principais absorções: (KBr, cm^{-1}): 1714.45 (C=O). RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6), δ : 4.448 (s, 2H, CH_2), 6.807-7.918 (m, 14H, Ar). RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO- d_6), δ : 40.127 (CH_2), 104.590 (Tiazol), 123.109-137.337 (CH, Ar), 149.249 (Tiazol), 167.489 (C=N), 169.619 (C=O).

APÊNDICE 2

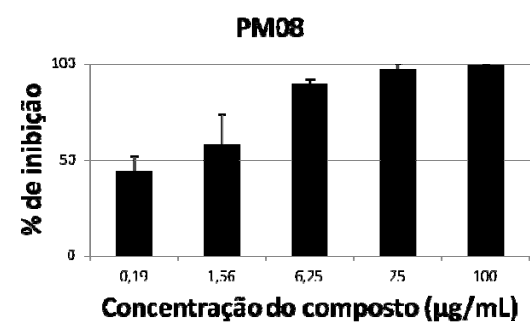
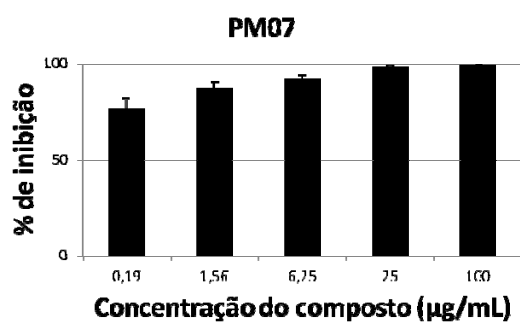
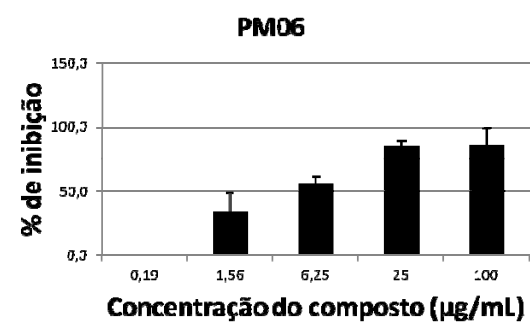
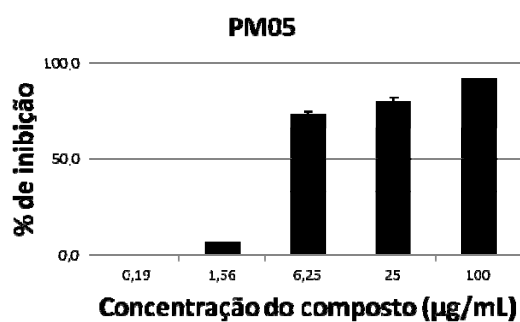
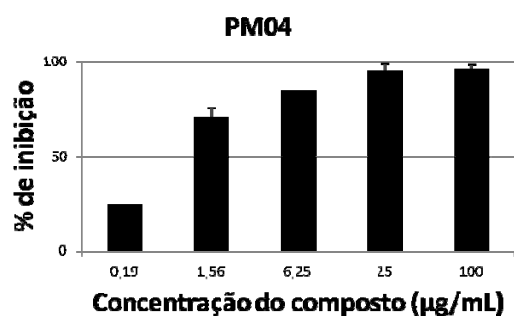
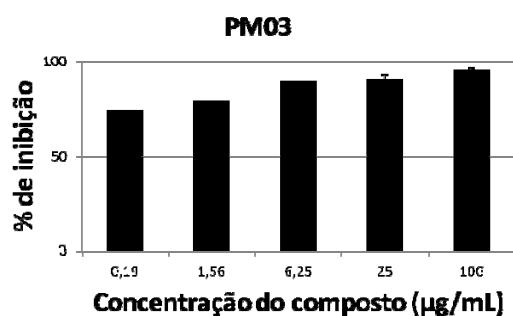
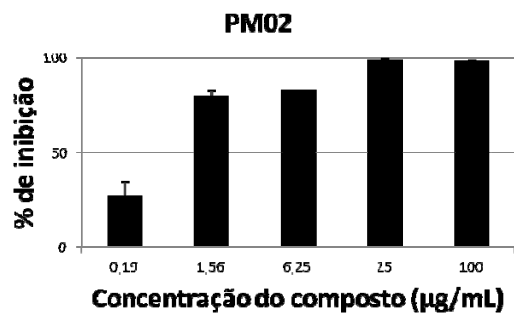
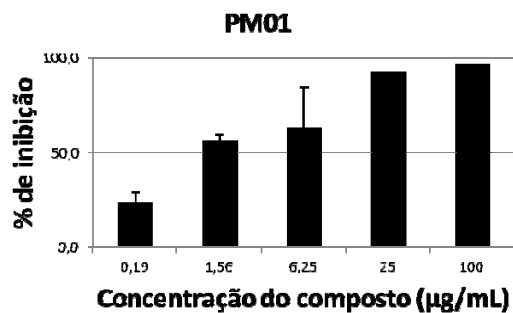
Gráficos de inibição de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* submetidas ao tratamento com os compostos.

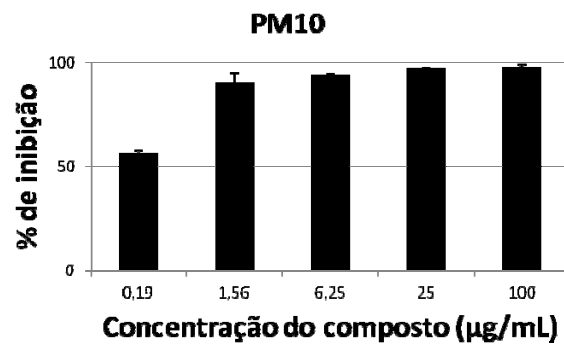
1. Tiossemicarbazona (TS)





2. Ftalil-hidrazona-tiazol (PM)

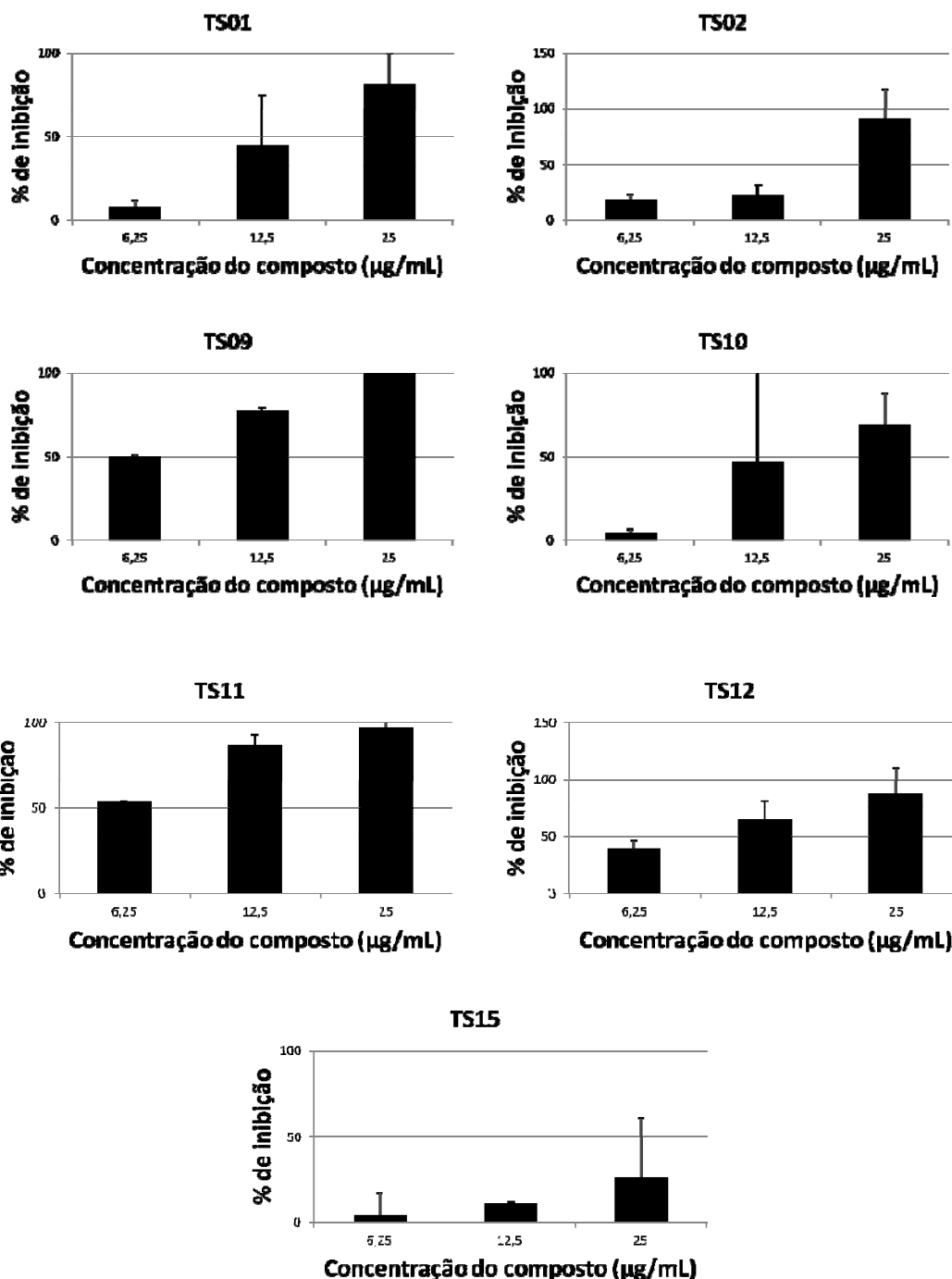




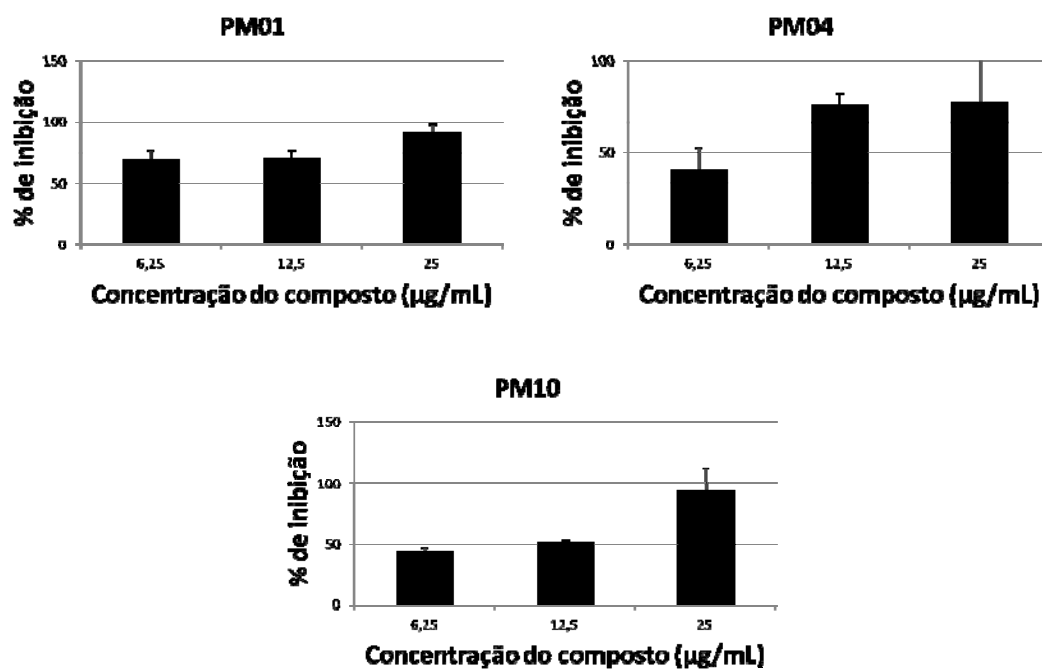
APÊNDICE 3

Gráficos de inibição do número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* submetidas ao tratamento com os compostos.

1. Tiossemicarbazona



2. Ftalil-hidrazona-tiazol



ANEXO 1



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

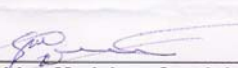
Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA Protocolado sob o Nº 26/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 09/02/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS BALB/c 60 dias 20g	600
	TOTAL 600

We certify that the project entitled AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA (CEUA Protocol Nº 26/2011), coordinated by VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on February 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until February, 2016

Recife (Pe, Brazil) april 16, 2012.


Dr^a. Eridan Medeiros Coutinho

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

 Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
Pesquisadora Emérita da FIOCRUZ
Coordenadora da CEUA/CPqAM
Recife - Brasil

ANEXO 2

Artigo submetido ao Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Structural redesign of thiazolidinones as a strategy to address potency enhancement of anti-*Trypanosoma cruzi* activity

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Moreira, Diogo Rodrigo; Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Imunologia (LETI) Leite, Ana Cristina; UFPE, Pharmaceutical Sciences Cardoso, Marcos Veríssimo; UFPE, Pharmaceutical Sciences Srivastava, Rajendra; UFPE, Chemistry Hernandes, Marcelo; UFPE, Pharmaceutical Sciences Rabello, Marcelo; UFPE, Pharmaceutical Sciences da Cruz, Luana; UFMG, Biochemistry and Immunology Ferreira, Rafaela Salgado; UFMG, Biochemistry and Immunology Meira, Cassio Santana; Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; Guimarães, Elisvalva Teixeira; Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Silva, Aline Caroline; Fiocruz, CPqAM dos Santos, Thiago André; Fiocruz, CPqAM Pereira, Valeria Rego; Fiocruz, CPqAM Pereira Soares, Milena; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia; Hospital São Rafael, Centro de Biotecnologia e Terapia Celular
Keywords:	<i>Trypanosoma cruzi</i> , Chagas- disease, Antioxidants, Antiparasitics, thiazolidinones

SCHOLARONE™
Manuscripts