UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ALINE CAROLINE DA SILVA SANTOS

Estudos *in vitro* de novos candidatos a fármacos anti-*Leishmania*

Recife

2017

ALINE CAROLINE DA SILVA SANTOS

Estudos *in vitro* de novos candidatos a fármacos anti-*Leishmania*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco

Orientadores:
Dra. Valéria Pereira Hernandes
Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Dra. Danielle Maria do Nascimento Moura

Recife

2017

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos, Aline Caroline da Silva
Estudos *in vitro* de novos candidatos a fármacos anti-*Leishmania* / Aline Caroline da Silva Santos. – Recife, 2017.

149 f.: il.

Orientadores: Valéria Pereira Hernandes, Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Danielle Maria do Nascimento Moura
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos

1. Leishmaniose 2. Farmacologia I. Hernandes, Valéria Pereira (orient.) II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio (coorient.) III. Moura, Danielle Maria do Nascimento (coorient.) VI. Título.

616.9364 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-418

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Aline Caroline da Silva Santos

Título: Estudos *in vitro* de novos candidatos a fármacos anti-*Leishmania*

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 09/08/2017

Banca Examinadora

Prof. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta (Titular interno)
Instituição: Depto. de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Dra. Christina Alves Peixoto (Titular externo)
Instituição: Depto. de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães
Assinatura:_____

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Titular externo)
Instituição: Depto. de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães
Assinatura:_____

Dr. Éden Ribeiro Freire (Titular externo)
Instituição: Depto. de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães
Assinatura:_____

Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes (Suplente interno)
Instituição: Depto. de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Suplente externo)
Instituição: Depto. de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães
Assinatura:_____

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, Severino e Luzinete, que não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida;

A meu esposo Thiago pelo companheirismo, incentivo, lealdade, cuidado e carinho em todo o tempo, nesses quase 10 anos de vida em comum e científica;

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

A Dra. Danielle Moura e ao Dr. Osvaldo Pompílio por toda orientação e conhecimento transferido na parte de Biologia Molecular;

A todos os amigos do Laboratório de Imunogenética (Ailton, Allana, Ana Catarina, Andresa, Beatriz, Carla, Lucas, Maria Carolina, Mayara, Sophia e Thiago) pelas conversas, ajudas e bons momentos de convivência;

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

A equipe do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM/UFPE) coordenado pela professora Dra. Ana Cristina Lima Leite, e aos alunos Diogo Moreira e Paulo André pela síntese dos compostos;

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 Instituto 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.

RESUMO

SANTOS, A.C.S. **Estudos *in vitro* de novos candidatos a fármacos anti-*Leishmania.*** 2017. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A leishmaniose é uma infecção causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente não existe vacina disponível para infecções por Leishmania em humanos 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 sobre *L. amazonensis* selvagem *in vitro*, a produção de óxido nítrico (NO), a secreção das citocinas IL-12, IL-10 e TNF e a indução da morte celular nos parasitas sob a influência de sete novos compostos sintéticos derivados da estrutura das Tiossemicarbazonas (TS01-TS07). Em paralelo, foi realizado o desenvolvimento de linhagens transgênicas de *L. amazonensis* e *L. Infantum* expressando constitutivamente a enzima beta-galactosidase para serem utilizadas em testes de atividade leishmanicida. A citotoxicidade das tiossemicarbazonas foi avaliada em macrófagos peritoneais através do método do MTT e o índice de seletividade foi determinado. Foi avaliado o efeito sobre o crescimento e o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, além de sua atividade sobre amastigotas intracelulares. A produção de NO, bem como de citocinas por macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* tratados ou não com os compostos foi avaliada pelo reagente de Griess e ELISA de captura, respectivamente. Foi realizada a ligação do gene da beta-galactosidase ao vetor para expressão em *Leishmania* sp. pLEXSY com posterior transfecção e confirmação fenotípica. As leishmanias transgênicas foram submetidas à Anfotericina B para validação de sua utilização em ensaios de atividade leishmanicida. Todos os compostos inibiram o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* selvagem, além de apresentarem baixa citotoxicidade em macrófagos. TS02 na cultura de promastigotas causou morte celular por apoptose e necrose, com efeito similar à Anfotericina B. Os compostos também se mostraram eficazes na modulação de mediadores imunológicos importantes para a doença: NO, TNF, IL-12 e IL-10. Quanto ao desenvolvimento da linhagem transgênica de *L. amazonensis* e *L. infantum*, foi confirmada por PCR e ensaio fenotípico a ligação do cassete de expressão contendo o gene da enzima beta-galactosidase ao genoma das leishmanias transfectadas. As linhagens transgênicas mostraram-se prontas para serem utilizadas em ensaios de teste de drogas *in vitro*, uma vez que promastigotas e amastigotas intracelulares tiveram seu uso validado frente à Anfotericina B. A baixa toxicidade aos macrófagos, a atividade leishmanicida e a presença de citocinas de perfil Th1 apresentadas sugerem a utilização destes compostos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona, como agentes promissores para o tratamento da leishmaniose cutânea. Já as linhagens de *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando a beta-galactosidase estão aptas para serem utilizadas na rotina laboratorial de avaliação de compostos com potencial atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Quimioterapia. Compostos sintéticos. Tiossemicarbazona.

ABSTRACT

SANTOS, A.C.S. ***In vitro*** **studies of new candidates for anti-Leishmania drugs.** 2017. Thesis (Doctorate). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Leishmaniasis is an infection caused by different protozoa belonging to the genus *Leishmania*. Currently there is no vaccine available for Leishmania infections in humans and conventional treatments are toxic to patients. For this reason, development of new antileishmanial drugs is an urgent need. In present study we evaluated cytotoxicity, *in vitro* activity on *L. amazonensis* wild-type, nitric oxide production (NO), IL-12, IL-10 and TNF secretion and cell death induction after incubation with seven new Thiosemicarbazone compounds (TS01- TS07). In parallel, was carried out the development of transgenic lines of *L. amazonensis* and *L. infantum* constitutively expressing beta-galactosidase enzyme, for use in leishmanicide activity tests. Cytotoxicity of compounds was evaluated in peritoneal macrophages by MTT method and selectivity index was determined. Effect of compounds on *L. amazonensis* promastigotes growth was evaluated and cell death mechanism induced determined by flow cytometry, besides its activity against intracellular amastigotes. NO and macrophage cytokine production was evaluated in macrophage infected or not with *L. amazonensis*, by Griess reagent and ELISA, respectively. The binding of beta-galactosidase gene to Leishmania sp. expression vector pLEXSY was done, with subsequent transfection and phenotypic confirmation. Transgenic leishmanias were submitted to Amphotericin B for validation of their use in leishmanicidal activity assays. All compounds inhibited promastigotes and amastigotes growth, besides having low cytotoxicity in macrophages. TS02 in promastigote culture caused cell death by apoptosis and necrosis, with similar results observed with Amphotericin B treatment. Compounds were able to modulate immune mediators relevant to disease as NO, TNF, IL-12 and IL-10. Regarding the development of the transgenic *L. amazonensis* and *L. infantum*, the binding of cassette expression containing beta-galactosidase gene to leishmania genome was confirmed by PCR and phenotypic assay. The transgenic leishmanias were ready to be used for in vitro drug test trials, since promastigotes and intracellular amastigotes use were validated against Amphotericin B. The low toxicity to macrophages, leishmanicidal activity and presence of Th1 cytokine profile presented suggest using of thiosemicarbazone derived compounds as promising agents for cutaneous leishmaniasis treatment. On the other hand, *L. amazonensis* and *L. infantum* expressing beta-galactosidase are apt to be used in the laboratory routine to evaluate compounds with potential leishmanicidal activity.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Chemotherapy. Synthetic compounds. Thiosemicarbazone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da LT no ano de 2015 24

Figura 2 - Distribuição da LTA no Brasil no ano de 2015 24

Figura 3 - Distribuição mundial da LV no ano de 2015 25

Figura 4 - Distribuição da LV no Brasil no ano de 2012 26

Figura 5 - Representação esquemática forma amastigota e promastigota de Leishmania sp. mostrando o núcleo (N), flagelo (F) e cinetoplasto (K). 27

Figura 6 - Distribuição de espécies de Leishmania responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar no Brasil 28

Figura 7 -Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo Lutzomyia sp. 29

Figura 8 - Ciclo de vida da Leishmania sp. 30

Figura 9 - Caracterização das diferentes manifestações clínicas da LTA. 32

Figura 10 - Manifestações clínicas da LV 33

Figura 11 - Perfis de resposta TCD4+ desenvolvidas frente à infecção por Leishmania sp. 35

Figura 12 - Esquema da indução da enzima NOS2 para a produção de óxido nítrico ou poliaminas a partir da presença de citocinas do perfil Th1 ou Th2. .. 39

Figura 13 - Estrutura genérica das tiossemicarbazonas R, R1, R2, R3 = H, grupos arila ou grupos alquila 46

Figura 14 - Planejamento sintético das tiossemicarbazonas 53

Figura 15 - Mapa do vetor de expressão em Leishmania sp. pLEXSY-hyg2 ... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos sintetizados e seus respectivos pesos moleculares. 55

Tabela 2 - Primers utilizados para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma da *L. amazonensis*. 66

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AmB	Amphotericin B (Anfotericina B)
ANOVA	Análise de variância
B.O.D.	Estufa com demanda bioquímica de Oxigênio
BGal	Enzima beta-galactosidase
CC_{50}	Concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Cluster de diferenciação
CPRG	Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-linkedimmunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático*)*
EMAR	Espectro de massa de alta resolução
ESI	Ionização por electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluorescein di--D-galactopyranoside
FITC	Fluorocromo isotiocinato de fluoresceína
eGFP	Enhanced green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente aprimorada)
GFP	Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)
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
Lac-Z	Gene da beta-galactosidase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
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 (*Protein data bank*)
PI	Iodeto de propídio
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	Time-of-flight
TPP	Enzima pirofosfato de tiamina

TS	Série Tiossemicarbazonas
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. OBJETIVOS 21

2.1 Geral 21

2.2 Específicos 21

3. REVISÃO DA LITERATURA 23

3.1 Epidemiologia das Leishmanioses 23

3.2 Agentes etiológicos e vetores 26

3.3 Ciclo de vida da Leishmania sp. 29

3.4 Manifestações clínicas e diagnóstico das leishmanioses 31

3.6 Aspectos imunológicos 35

3.6.1 Resposta celular e humoral 35
3.6.2 Óxido nítrico 38
3.6.3 Suscetibilidade e resistência à infecção 39
3.7 Medidas de controle e tratamento 40

3.8 Tiossemicarbazonas 45

3.9 Utilização de gene repórter em ensaios de atividade leishmanicida ... 48

4. MATERIAL E MÉTODOS 52

4.1 Compostos sintéticos 52

4.1.1 Síntese das tiossemicarbazonas 52
4.2 Coleta de macrófagos peritoniais 55
4.3 Ensaios de citoxicidade em macrófagos peritoniais 55
4.4 Cultivo de macrófagos RAW 264.7 e parasitas 56
4.5 Atividade biológica em promastigotas de *L. amazonensis* selvagens 57
4.6 Ensaio de marcação Anexina-FITC e PI em promastigotas de *L. amazonensis* selvagens 58
4.7 Atividade biológica em amastigotas de *L. amazonensis* selvagens ... 58
4.8 Cultura de macrófagos peritoneais para obtenção de sobrenadantes 59
4.9 Análise da produção de óxido nítrico 60
4.10 Dosagens de citocinas em sobrenadantes 60
4.11 Desenvolvimento de linhagens de *L. amazonensis* e *L. infatum* expressando beta-galactosidase 61
4.11.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR), clonagem e subclonagem ... 62
4.11.2 Transfecção, seleção não-clonal e clonal das leishmanias recombinantes 64
4.11.3 Confirmação da integração do cassete de Bgal no genoma 65
4.11.4 Ensaio de atividade da beta-galactosidase em promastigotas 66
4.11.5 Ensaio de atividade da beta-galactosidase em amastigotas 67
4.11.6 Ensaios de validação da cepa transgênica frente à Anfotericina B 67
4.11.7 Detecção da beta-galactosidase por citometria de fluxo 68
4.12 Análise estatística 69
5. RESULTADOS 70
5.1 Artigo publicado na revista Experimental Parasitology 71

5.2 Artigo submetido à revista Diagnostic Microbiology and Infectious Disease..... 84

6 DISCUSSÃO 117

7 CONCLUSÕES 128

REFERÊNCIAS..... 130

APÊNDICE A 141

ANEXO 1..... 148

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear. Estas doenças estão presentes em mais de 90 países, com 310 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e cerca de 1,3 milhões de novos casos registrados a cada ano (WHO, 2015). 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, 2010).

Um espectro de formas clínicas pode se desenvolver na dependência da resposta imune do hospedeiro e da espécie de parasita infectante: cutânea, mucocutânea e visceral (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). No Brasil, as principais espécies encontradas são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*, causando a forma tegumentar e *L.(L) infantum* causando a forma visceral. No presente trabalho foram utilizadas a *Leishmania amazonensis*, espécie encontrada na maioria dos estados brasileiros e comumente associada à forma tegumentar da doença (BRASIL, 2010) e a *Leishmania infantum*, responsável pela forma visceral da doença nas Américas (BRASIL, 2014).

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, drogas utilizadas há mais de 70 anos no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, sendo relatados casos de resistência do parasita há cerca de 20 anos (BOER et al., 2011; TIUMAN et al., 2011a). 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; OLLIARO, 2011; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2012; SEN; CHATTERJEE, 2011).

Neste contexto estão inseridos os compostos derivados da estrutura da tiossemicarbazona, 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; GAMBINO, 2004). Dentre as atividades biológicas promissoras, foi demonstrado o potencial anticonvulsivante, antimicrobiano, antiviral, antiparasitário e antitumoral destes compostos (BERALDO; GAMBINO, 2004; HENG et al., 2015; LESSA et al., 2011a, 2011b; SANTIAGO et al., 2014)

A atividade de compostos derivados a partir da estrutura das tiossemicarbazonas sobre *Trypanossoma cruzi* está associada à inibição da cruzaína, uma cisteína protease encontrada abundantemente em tripanossomatídeos, que recebeu esse nome por de ter sido identificada inicialmente em *T. cruzi* (GREENBAUM et al., 2004; ZALDINI 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 cruzaína de *T. cruzi* 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; COOMBS; ALEXANDER, 2004).

A identificação de novas moléculas é considerada um dos gargalos na geração de novos fármacos com atividade antiparasitária. Com relação às leishmanioses, essa identificação é baseada numa série de experimentos realizados in vitro, inicialmente sobre a forma promastigota do parasita.

Os ensaios *in vitro*, quando realizados em larga escala, necessitam de testes de fácil execução, reprodutíveis, facilmente quantificáveis e que reflitam as condições encontradas pelo parasito na célula hospedeira (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009; MUYLDER et al., 2011). Embora a forma promastigota do parasito seja de fácil manipulação, a validade dos resultados é limitada em

virtude da pouca relevância clínica desta forma, sendo as formas amastigotas intracelulares ideal para ser utilizada em métodos de triagem. Já são relatadas as diferenças encontradas entre promastigotas e amastigotas, dentre elas: diferenças no metabolismo, transporte intracelular e resposta ao estresse oxidativo, além das funções executadas pela célula do hospedeiro (MUYLDER et al., 2011).

Apesar dos avanços já relatados em se tratando de métodos de triagem de alto rendimento, o desenvolvimento de uma metodologia que viabilize a avaliação de novos compostos com atividade leishmanicida, de um modo simples, rápido, reprodutível e economicamente viável é uma grande contribuição nesse campo de estudo. Uma das alternativas possíveis consiste na utilização de genes repórter.

Gene repórter é um termo tipicamente usado para designar aquele que produz um fenótipo prontamente mensurável e distinguível do sinal endógeno inespecífico. A utilização do gene Lac-Z, cuja transcrição e tradução leva à produção da enzima beta-galactosidase é uma das alternativas possíveis de ser utilizado como gene repórter (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009).

A obtenção de parasitas geneticamente modificados para expressar a enzima beta-galactosidase e seu emprego para teste de atividade de compostos possui grande relevância farmacêutica e biotecnológica para a prospecção de novas moléculas leishmanicidas. Tendo em vista o fato de ainda não existir 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, e a utilização desses parasitas geneticamente modificados pode auxiliar nessa tarefa.

Neste estudo avaliamos a atividade leishmanicida de sete produtos sintéticos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona. Foi determinada a toxicidade desses compostos sobre macrófagos e a atividade sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* selvagens, além da avaliação do potencial imunomodulatório sobre macrófagos infectados e não infectados com os parasitas.

Aliado à descoberta de novos compostos com atividade leishmanicida, este trabalho também propôs, paralelamente, o desenvolvimento de linhagem transgênica de *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando constitutivamente a enzima beta-galactosidase de *E. coli*. A expressão dessa enzima será utilizada para quantificação dos parasitas nos ensaios de atividade de novos compostos. Esperamos com o desenvolvimento do presente projeto poder contribuir efetivamente para a busca de novos quimioterápicos contra a leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a potencial atividade leishmanicida e imunomoduladora de compostos sintéticos.

2.2 Específicos

a) Avaliar em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos a atividade citotóxica das tiossemicarbazonas, estimando o índice de seletividade para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* selvagens;
b) Determinar a concentração dos diferentes compostos capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50}) em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* selvagens
c) Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos nas formas promastigotas de *L. amazonensis* selvagens;
d) Avaliar *in vitro* o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* selvagens durante o tratamento com os compostos, determinado a concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50});
e) Analisar o efeito das tiossemicarbazonas sobre a produção de óxido nítrico e das citocinas TNF (fator de necrose tumoral), IL(interleucina)-12 e IL-10 em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* selvagens;
f) Desenvolver linhagens de *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando o gene da beta-galactosidase;

g) Avaliar a utilização das cepas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* em ensaios de atividade leishmanicida *in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia das Leishmanioses

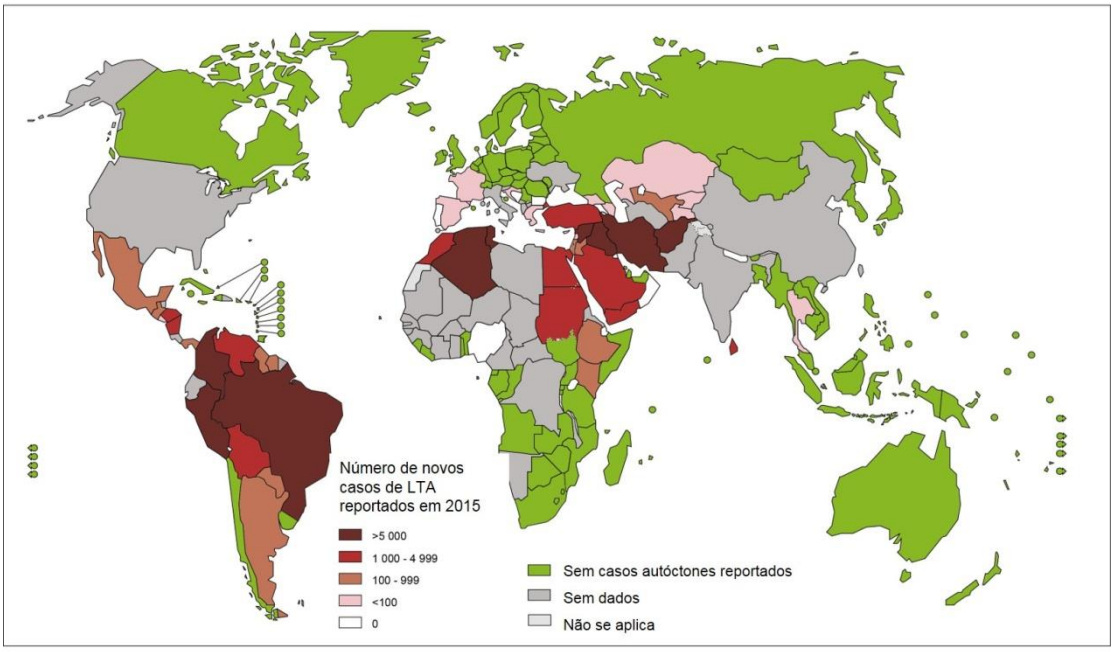
As Leishmanioses pertencem à classe de doenças negligenciadas e são causadas por protozoários pertencentes ao gênero Leishmania. Esses parasitas se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, determinando as formas clínicas cutânea, mucocutânea e visceral, na dependência da espécie de Leishmania e da resposta imune do hospedeiro (WHO, 2015).

A leishmaniose tegumentar (LT) acomete a pele e estruturas cartilaginosas da nasofaringe, de forma localizada ou difusa. 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 98 países da Europa, Ásia, África e América (**Figura 1**). Cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central, estando 2/3 dos casos presentes em apenas seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Nas Américas, a LT ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; WHO, 2015).

Estima-se que a LT tenha 0,7 a 1,3 milhões de novos casos a cada ano e que haja cerca de 12 milhões de pessoas atualmente infectadas (WHO, 2015). No entanto, a subnotificação ainda é um fato presente, pois dos 98 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 (GONZÁLEZ et al., 2012; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2010).

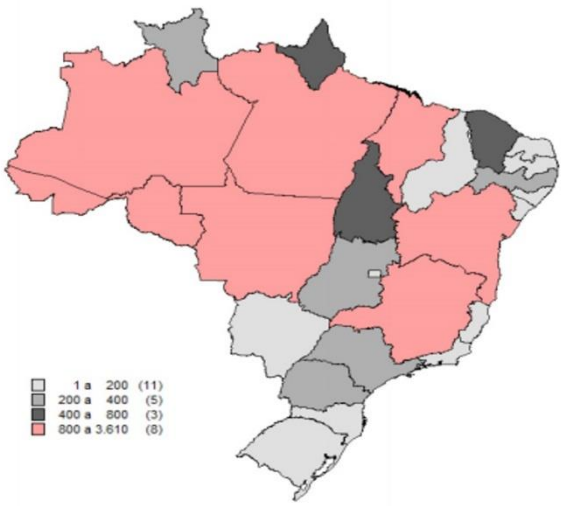
No Brasil, na década de 80 foram registrados casos em 20 estados, e, a partir do ano de 2001 em todos os estados foram notificados casos da doença. A partir de 2003 a doença tornou-se presente em todos os estados brasileiros devido à expansão geográfica acentuada (BRASIL, 2017) (**Figura 2**).

Figura 1 - Distribuição mundial da LT no ano de 2015



Fonte: WHO- World Health Organization (2015)

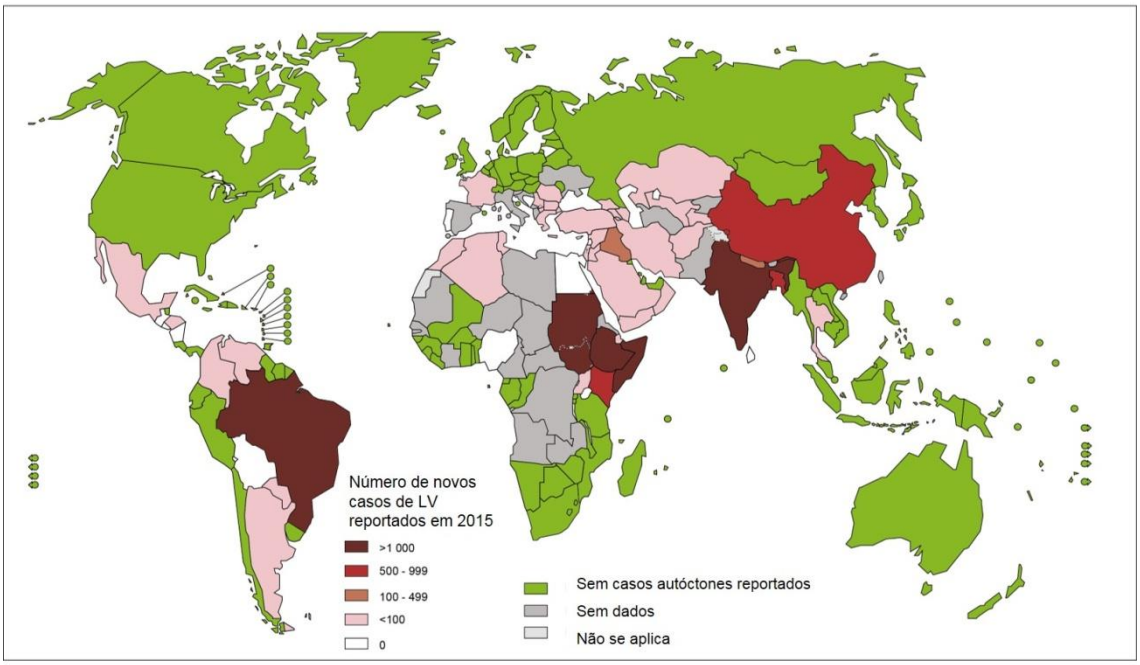
Figura 2 - Distribuição da LTA no Brasil no ano de 2015



Fonte: Sinan/SVS/MS

Quanto à leishmaniose visceral (LV), a doença é considerada uma epidemia recorrente no leste da África, com elevada morbidade e mortalidade. Possui alta letalidade em indivíduos não tratados e imunocomprometidos, tornando-se uma doença importante devido ao aumento de casos de coinfecção com HIV. Estima-se que anualmente surjam 200 a 400 mil novos casos de LV, sendo mais de 90% desses em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2015) (**Figura 3**).

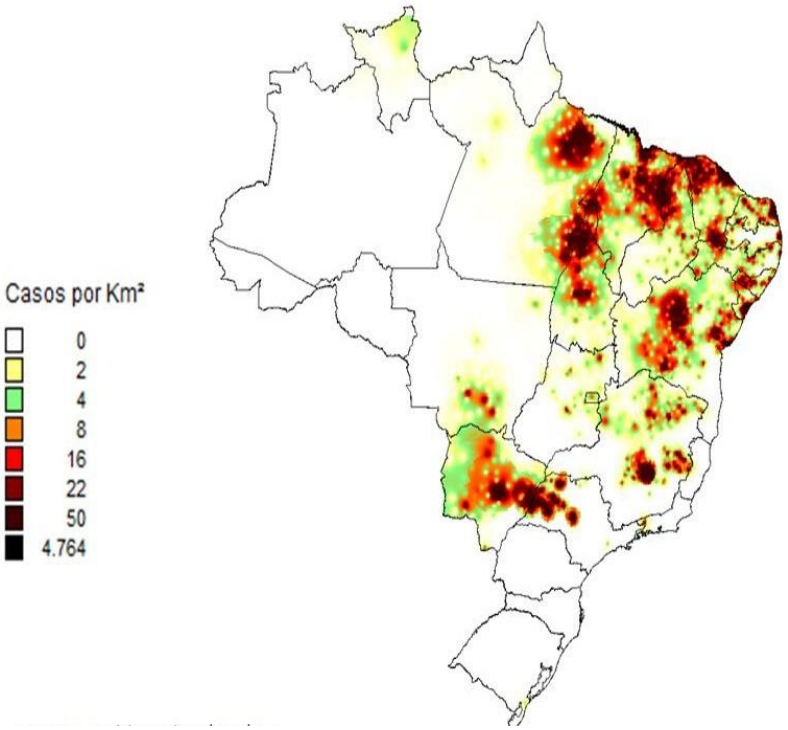
Figura 3 - Distribuição mundial da LV no ano de 2015



Fonte: WHO- World Health Organization (2015)

No Brasil a LV já foi relatada em todas as regiões, exceto na região Sul. Anteriormente considerada uma doença rural, a LV vem se expandido para os grandes centros urbanos. De todos os casos da doença notificados até 2002, 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (BRASIL, 2014) (**Figura 4**).

Figura 4 - Distribuição da LV no Brasil no ano de 2012



Fonte: Sinan/SVS/MS

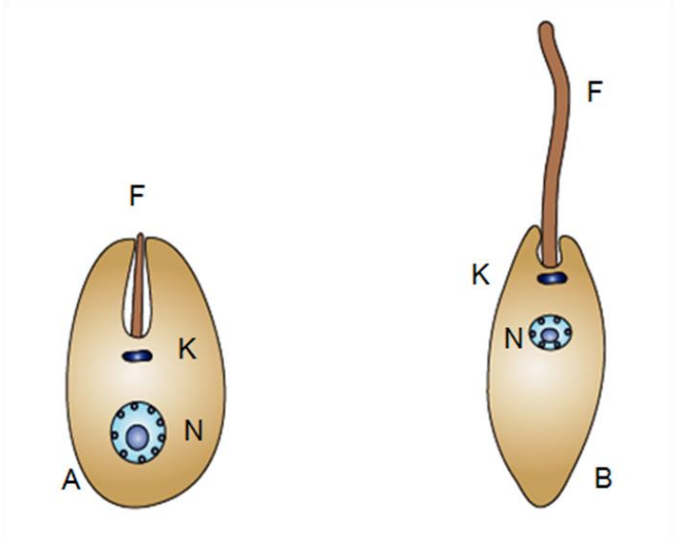
3.2 Agentes etiológicos e vetores

O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos. Os parasitas do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania,* sendo esta classificação baseada no desenvolvimento do parasita no inseto vetor (BRASIL, 2011, 2017).

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) (BATES, 2007; LAINSON, 2010).

Os parasitas do gênero *Leishmania* sp. apresentam duas formas evolutivas: a forma flagelada promastigota, com motilidade flagelar e encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e forma amastigota, forma não móvel, encontrada no interior de células fagocitárias do hospedeiro mamífero (GOTO; LINDOSO, 2010; SEN; CHATTERJEE, 2011) (**Figura 5**).

Figura 5 - Representação esquemática forma amastigota e promastigota de *Leishmania* sp. mostrando o núcleo (N), flagelo (F) e cinetoplasto (K).

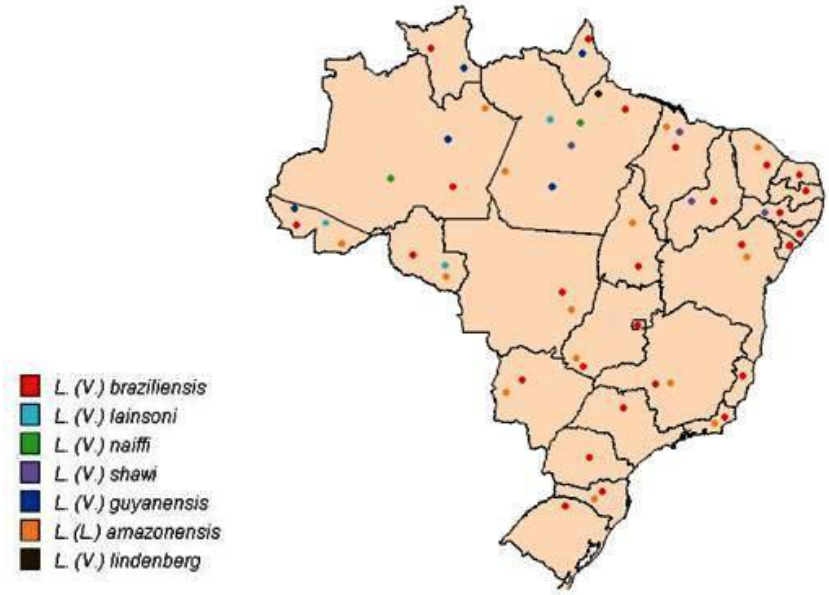


A- Forma amastigota e B- Forma promastigota. Fonte: Modificado de DOCAMPO et al., 2005.

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* causadoras de LT. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo uma do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. Posteriormente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi, L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017)(**Figura 6**). A *L. (L.) infantum* é a espécie causadora da forma visceral nas américas (BRASIL, 2014). Ocasionalmente espécies causadoras da forma tegumentar, como *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. major* são isoladas em pacientes com manifestações da forma visceral, bem como *L.*

infantum já foi isolada de pacientes com manifestações cutânea (SALVIONI; SANDER; GÓMEZ, 2017; SILVA-LÓPEZ, 2010). As espécies de leishmania alvos deste trabalho são a *L.(L.) amazonensis* e *L. (L) infantum*.

Figura 6 - Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar no Brasil



Fonte: BRASIL, 2007

As espécies de *Leishmania* sp. que são 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 (BRASIL, 2011; LAURA; ALMEIDA, 2011). Estes insetos pertencem à ordem Díptera, família Psychodidae e gênero *Lutzomyia* (**Figura 7**).

Aproximadamente 30 espécies de *Lutzomyia* têm a sua capacidade de transmissão da *Leishmania* sp. comprovada nas Américas (JACOBSON, 2011; LAINSON, 2010). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Lutzomyia flaviscutellata, L. whitmani, L. umbratilis, L. intermedia, L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2017). Já as espécies envolvidas na

transmissão da LV são: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2014).

Figura 7 -Inseto vetor da leishmaniose, flebotomíneo *Lutzomyia* sp.

Fonte: Agência FIOCRUZ

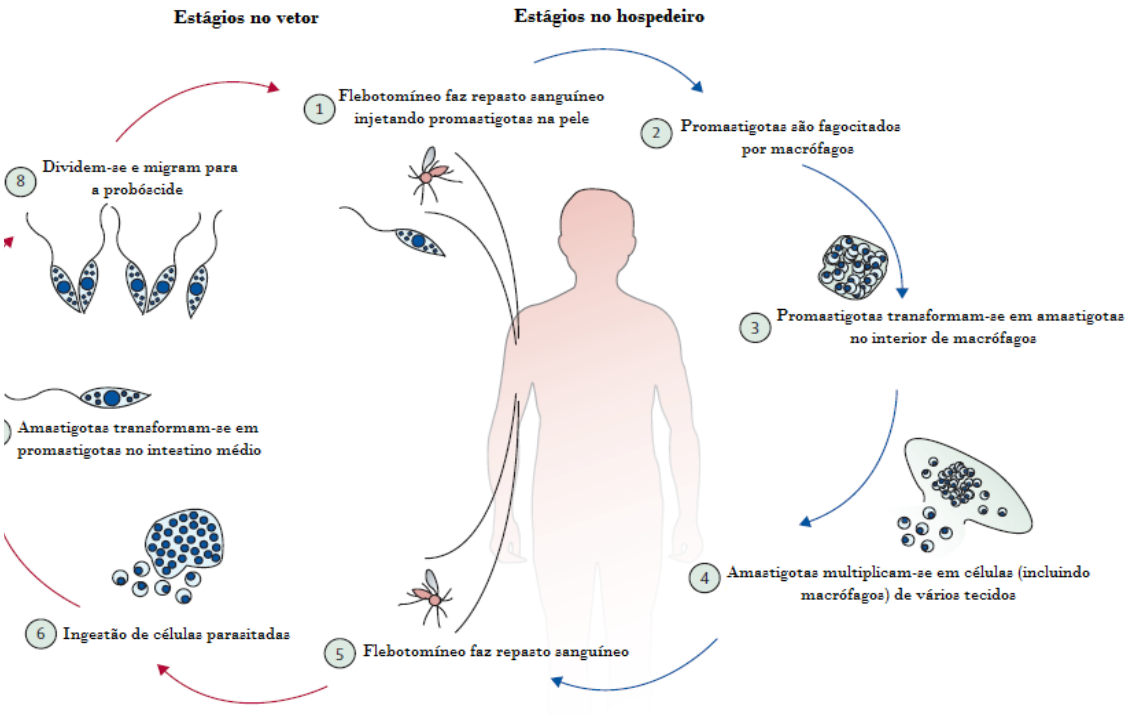
3.3 Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

O ciclo evolutivo do parasita, independente da espécie inicia-se quando o vetor, até então não infectado, 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, 2004; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; TIUMAN et al., 2011b). No momento do repasto sanguíneo a fêmea do flebotomíneo 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 metacíclicas 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, 2004; BATES, 2007).

O vetor, agora infectado, faz o repasto sanguíneo, ocorrendo a transmissão do parasita. Formas promastigotas são inoculadas através da picada e, após um período de quatro a oito horas, são interiorizadas por células fagocíticas do hospedeiro, diferenciando-se novamente em formas amastigotas. Estas se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (**Figura 8**) (BRASIL, 2011; REITHINGER et al., 2007).

Figura 8 - Ciclo de vida da Leishmania sp.



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

3.4 Manifestações clínicas e diagnóstico das leishmanioses

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem, dentre outros fatores, da espécie de leishmania infectante. Algumas espécies de parasita apresenta tropismo por macrófagos na pele (causando leishmaniose cutânea), tecido mucocutâneo (leishmaniose mucocutânea) e órgão do sistema reticuloendotelial (leishmaniose visceral) (KULKARNI et al., 2014).

A LT, que abrange a leishmaniose cutânea e mucocutânea, 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 LT costuma apresentar-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 9**) (BRASIL, 2017).

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 número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal (BRASIL, 2011; REITHINGER et al., 2007).

Em virtude das diversas manifestações clínicas, o diagnóstico da LT 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 (GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007; REZVAN, 2014).

Figura 9 - Caracterização das diferentes manifestações clínicas da LTA.

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

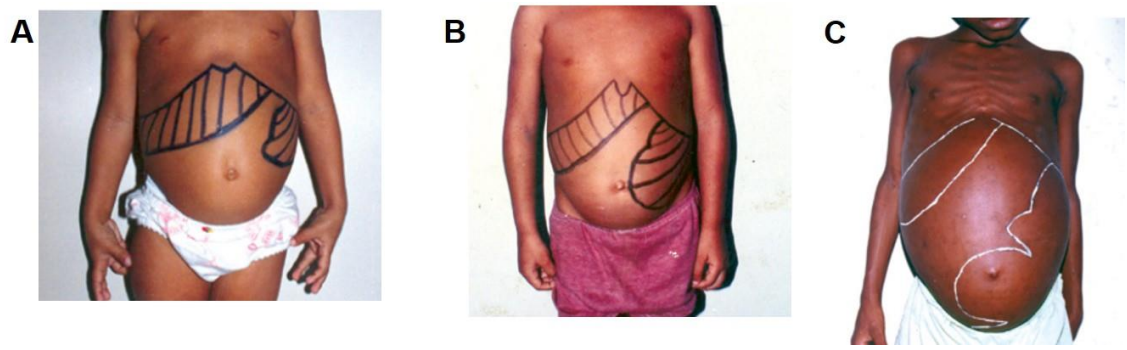
Fonte: BRASIL, 2017.

A LV também caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar desde as manifestações clínicas discretas (oligossintomáticas, comuns em adultos imunocompetentes), moderadas e graves, e, uma vez que não haja tratamento, possui mortalidade elevada (KULKARNI et al., 2014; MAKALA; BABAN, 2014).

A suspeita de LV deve ser investigada em pacientes com febre e esplenomegalia associadas ou não à hepatomegalia. No início da doença (fase aguda) o indivíduo acometido apresenta febre com período inferior a quatro semanas, além de palidez e hepatoesplenomegalia. Nessa fase aguda da doença, é possível a evolução para cura espontânea (extremamente raro) ou para o chamado período de estado, quando há a progressão da doença e aparecimento de novos sintomas. Nesse período de estado, com duração de dois meses, em média, há a presença de febre irregular, emagrecimento

progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Não havendo o tratamento do indivíduo, a doença avança para o chamado período final, com febre frequente, desnutrição, edema dos membros inferiores, ascite, anasarca, hemorragias e icterícia, evoluindo para o óbito (BRASIL, 2014; MAKALA; BABAN, 2014) (**Figura 10**).

Figura 10 - Manifestações clínicas da LV



Legenda: (A) Forma aguda, (B) Período de Estado e (C) Período final.
Fonte: BRASIL, 2014.

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, 2007; REITHINGER et al., 2007).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) apresenta uma alta sensibilidade e uma especificidade que varia de acordo com o antígeno utilizado. Embora apresente resultado positivo na maioria dos casos de LT

(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 na LTA, 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* (DE OLIVEIRA et al., 2013).

Para o diagnóstico de LV, é utilizada a IFI atrelada à análise de manifestações clínicas. A IDRM geralmente, não é utilizada, uma vez que é negativa durante a fase de estado, tornando-se positiva apenas após a cura clínica (6 meses a 3 anos após o final do tratamento). O diagnóstico de LV é facilmente confirmado após a realização da pesquisa de parasitas em aspirado de baço, medula óssea, linfonodos e biópsia hepática. Nesta pesquisa é possível a visualização de formas amastigotas do parasita (BRASIL, 2014).

Técnicas de diagnóstico molecular baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido extensivamente desenvolvidas para a aplicação no diagnóstico das leishmanioses. Com alta sensibilidade e especificidade, são particularmente úteis em amostras contendo poucos parasitas, como na forma mucosa da LT, além de permitir o monitoramento da terapia da leishmaniose. (GOMES et al., 2012).

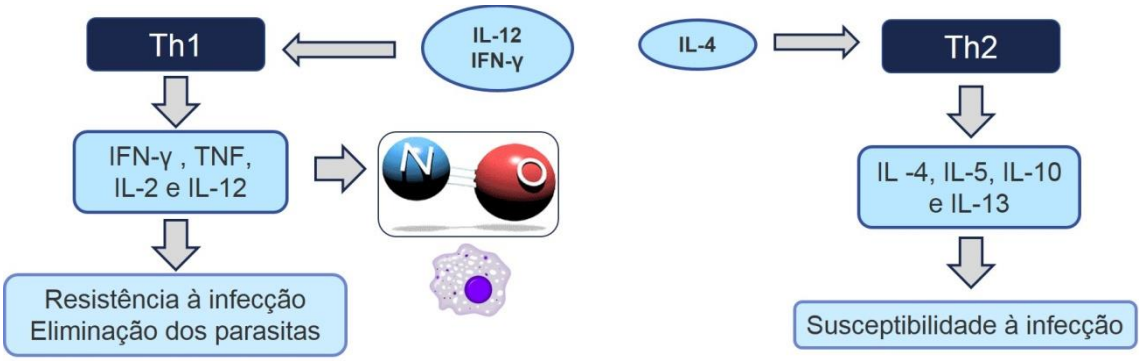
Há a necessidade da associação de parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais com a finalidade de se obter um diagnóstico fidedigno. No exame clínico, é interessante associar as informações coletadas através da anamnese do paciente a dados epidemiológicos. Dentre eles estão a existência de casos de leishmanioses na região, referência de cães com lesões residindo nas proximidades, procedência de área endêmica e inserção de áreas florestais (BRASIL, 2014).

3.6 Aspectos imunológicos

3.6.1 Resposta celular e humoral

A elevação dos títulos de anticorpos são observados em todas as manifestações clínicas das leishmanioses, porém, a resolução da infecção é dependente de linfócitos T (CASTÉS; AGNELLI; RONDÓN, 1984; RAI et al., 2012). Sabe-se que, nas infecções por *Leishmania*, há o desenvolvimento de resposta imune predominantemente celular por parte do hospedeiro, ocorrendo uma expansão caracterizada por células T CD4+, que apresenta perfis de citocinas Th1 ou Th2 (PINHEIRO, 2004; REIS et al., 2006) (**Figura 11**).

Figura 11 - Perfis de resposta TCD4+ desenvolvidas frente à infecção por Leishmania sp.



Fonte: a autora

No perfil Th1, citocinas como interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral (TNF) estão envolvidas na resistência e eliminação dos parasitas, enquanto citocinas do tipo Th2, como as interleucinas (IL) -4 e IL-10 estão ligadas à susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (ALEXANDER; BRYSON, 2005; STEBUT, 2007).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada nos últimos 30 anos para elucidar aspectos da relação parasita-hospedeiro na leishmaniose, como fenótipos 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). Apesar dos avanços no conhecimento da imunopatologia das leishmanioses através dessas infecções experimentais em modelo murino, em humanos, a dicotomia Th1 e Th2 não é tão distinta como em camundongos, não representando estritamente a leishmaniose humana (MAKALA; BABAN, 2014).

Na leishmaniose, 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(REITHINGER et al., 2007; SCOTT; FARRELL, 1981).

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 (SAKAGUCHI et al., 2008).

A linhagem de camundongos BALB/c mostra-se susceptível à infecção com *L. amazonensis* (CALABRESE et al., 2013; DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2010), 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, 2012; PADIGEL; ALEXANDER; FARRELL, 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 (GOLLOB et al., 2008; NATEGHI ROSTAMI et al., 2010; REINER et al., 1994). Já a IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrofágica 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, 2012).

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 (BRELAZ et al., 2012; REIS et al., 2006). 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). 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 efetoras 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).

Estudos 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, além de ser responsável pelo aumento da produção de múltiplos mediadores

inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF e NOS2 (OUKKA, 2007; SCHMIDT-WEBER; AKDIS; AKDIS, 2007).

As células Th17 diferenciam-se a partir de linfócitos T $CD4^+$ *naïve* na presença de TGF-β e IL-6 (DONG, 2008). O TGF-β é também responsável pela indução de Foxp3, porém a IL-6 atua na supressão da indução deste fator de transcrição. Deste modo, as duas citocinas em conjunto atuam na diferenciação de células Th17 (DONG, 2008; ZAMBRANO-ZARAGOZA, 2014).

3.6.2 Óxido nítrico

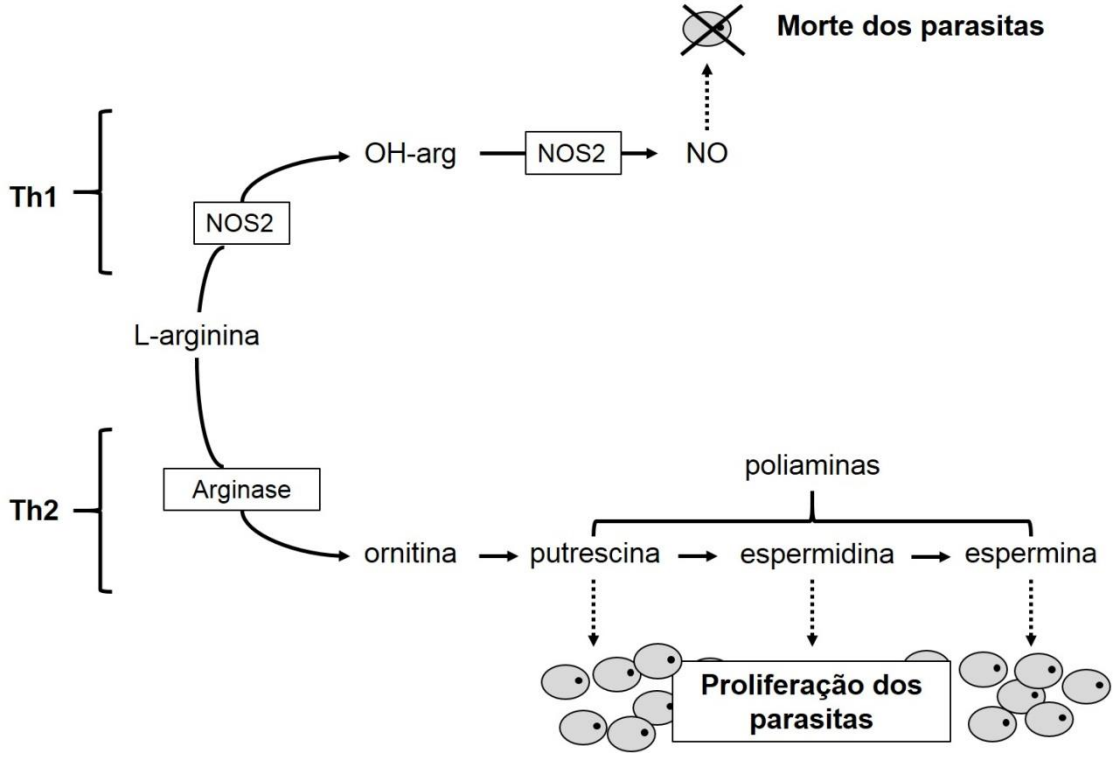
O controle da leishmaniose via resposta Th1 através da ação das citocinas IFN-γ e TNF conduz à ativação de macrófagos e eliminação de parasitas intracelulares através da indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2), com consequente síntese de NO a partir de L-arginina (GREEN et al., 1994; HOLZMULLER et al., 2002; ROGERS, 2012) (**Figura 12**). 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 (HOLZMULLER et al., 2002; T G EVANS, L THAI, 1993; VOULDOUKIS et al., 1997).

O NO tem a capacidade de inativar numerosas enzimas metabólicas do parasita a partir da formação de complexos ferro-ditrinosil-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 (JAMES, 1995; LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997).

A produção de NO pode ser regulada pelo fator β de crescimento e transformação (TGF-β) e, 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, 2004). Linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ atuam como fonte produtora dessas citocinas envolvidas no processo de ativação de macrófagos (BRELAZ et al., 2012).

Figura 12 - Esquema da indução da enzima NOS2 para a produção de óxido nítrico ou poliaminas a partir da presença de citocinas do perfil Th1 ou Th2.



Fonte: Adaptado de ROGERS (2012)

3.6.3 Suscetibilidade e resistência à infecção

As manifestações clínicas das leishmanioses são variáveis e dependentes de características do parasita, do vetor, e do hospedeiro vertebrado, incluindo a sua constituição genética e estado imunológico. 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 (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Há estudos que também levam em consideração a saliva do inseto vetor no perfil imunológico da doença, que tem apresentado papel 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 com *L. infantum* (MURRAY et al., 2005).

A base imunológica para essas descobertas não é totalmente compreendida, mas uma das hipóteses é a que as proteínas da saliva podem mudar a resposta imune adaptativa de Th1 para uma resposta 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 e mobilização social, diagnóstico e tratamento precoce das formas clínicas, controle de animais reservatórios e vetores, este último envolvendo a pulverização de residências com inseticidas residuais (REITHINGER et al., 2007; WHO, 2015).

A falta de uma vacina para humanos, 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 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, 2017).

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, 2017; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Sendo os antimoniais pentavalentes a principal droga utilizada para o tratamento da leishmaniose há 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; OLLIARO et al., 2012; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

A resistência dos parasitas possivelmente está envolvida com os prováveis mecanismos de ação dos antimoniais, dentre eles o mecanismo de oxirredução, onde há a redução *in vivo* de complexos Sb^{+5} para compostos mais tóxicos de Sb^{+3} (CHAI et al., 2005; DEMICHELI et al., 2002; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). 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 quando se relaciona 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 há aumento da suscetibilidade a drogas de segunda escolha como pentamidina e anfotericina B (CUNY et al., 2001).

No caso de não haver uma boa resposta ao tratamento com Glucantime® ou na impossibilidade de seu uso, a Anfotericina B (AmB) 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. 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, hipocalemia e flebite no local da infusão (BRASIL, 2017). Apesar de ser bastante efetiva, a AmB tem seu uso limitado por seus efeitos adversos (MAKALA; BABAN, 2014).

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, 2017).

O sucesso do tratamento da leishmaniose está sujeito à imunidade celular, independentemente da droga utilizada, e em pacientes com coinfecção HIV- leishmaniose o tratamento tende mais ainda ao insucesso - entre 40% e 65% (BRASIL, 2011; KARP; AUWAERTER, 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, reduzindo 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. (1994) 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, causando 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.

Dentre esses imunomoduladores pode-se citar estudos com Imiquimode, que têm 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, consequentemente, sua toxicidade (ALMEIDA et al., 1999).

As vacinas também estão presentes entre as opções terapêuticas. Ensaios 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, em coinfecção com HIV ou que apresentassem a forma difusa da doença. A vacina possivelmente é capaz de induzir resposta Th1 pelo aumento de IFN-γ e 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 na 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; WILSON; CARVALHO, 2008).

Atualmente, alguns testes clínicos com protótipos candidatos a vacinas podem ser encontrados. A vacina Leish-111f está na fase II de testes clínicos (eficácia, segurança, tolerância e imunogenicidade) (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00121862?term=leishmania+vaccine&rank=5). 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) (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309?term=leishmania+vaccine&rank=8). 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 (dosagem e imunogenicidade (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00429780). Apesar dos avanços e promessas, principalmente em modelos animais, ainda não se tem disponível uma vacina humana. Um dos principais entraves para o seu desenvolvimento está justamente na complexidade da resposta imune humana frente ao parasita. (KEDZIERSKI et al., 2009; ROBERTS, 2006; SINGH; SUNDAR, 2012).

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 a Leish-Tec, do laboratório Hertape, em que, após vacinação, o animal continua negativo no exame de IFI, diferente da vacina Fort Dodge. A vacina confere proteção superior a 92% e já protegeu mais de 70.000 cães vacinados em todo o Brasil.

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, 2015).

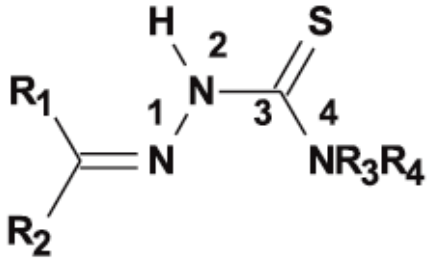
3.8 Tiossemicarbazonas

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 13**) (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; GAMBINO, 2004; FINCH et al., 2000;

GREENBAUM et al., 2004; HENG et al., 2015; LESSA et al., 2011a; PACCA et al., 2017; SANTIAGO et al., 2014)

Figura 13 - Estrutura genérica das tiossemicarbazonas R, R1, R2, R3 = H, grupos arila ou grupos alquila



Fonte: TERNÓRIO et al., 2005

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.

Não necessitam de armazenamento especial, não são sensíveis à luz e não exigem alto grau de cuidado durante a manipulação. Elas se apresentam como sistemas com extrema deslocalização eletrônica e possuem excelentes propriedades para formarem complexos metálicos, comportando-se como agentes quelantes (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-acetamidobenzaldeido 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 cruzaína, uma cisteína protease encontrada abundantemente em tripanossomatídeos, que recebeu esse nome devido ao fato de ter sido identificada inicialmente em *T. cruzi*. A cruzaína 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).

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 (KEDZIERSKI et al., 2009).

A atividade proteolítica em parasitas do gênero *Leishmania* foi primeiramente reportada por PUPKIS 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 cruzaína, 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 (BRYSON et al., 2009; MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004).

Ensaios *in silico* demonstrando a ação das tiossemicarbazonas inibindo cisteína protease de *Leishmania mexicana* já foi descrita por SCHRODER et al. (2013), que considera essa inibição uma abordagem bastante promissora no desenvolvimento de drogas antiparasitárias. Outros estudos demonstraram a ação de uma tiossemicarbazona inibindo promastigotas e amastigotas de L. amazonensis levando a alterações mitocondriais (BRITTA et al., 2014).

3.9 Utilização de gene repórter em ensaios de atividade leishmanicida

A identificação de compostos potentes é um dos fatores limitantes no processo de descoberta de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, uma vez que essa triagem é composta por múltiplas etapas (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009). A identificação e caracterização de uma molécula "*hit*", com confirmada potencial atividade leishmanicida é um processo que pode tornar-se bastante demorado. Quando se parte do princípio que a molécula foi sintetizada para atuar diretamente sobre o parasita, uma etapa crucial é avaliar atividade direta desta molécula, *in vitro*, sobre o parasita (MUYLDER et al., 2011).

O método clássico para a triagem de uma série de novas moléculas sobre promastigotas é a contagem direta da cultura de parasitas, submetida ao tratamento com essas novas moléculas ou não (controle negativo), em câmara de Neubauer. Nesse método, é levada em consideração a motilidade flagelar para determinar se o parasita está viável ou não. Esse método, apesar de ser considerado de fácil execução e baixo custo, é sabidamente pouco reprodutível, pouco sensível e laborioso, uma vez que os resultados da

contagem podem variar de acordo com a experiência de quem está executando. Além disso, a motilidade flagelar pode não ser suficiente para determinar se o parasita está viável ou não e, quando se está a frente de uma grande biblioteca de compostos a testar, pode-se levar bastante tempo para a incubação dos parasitas com os compostos, em várias concentrações e em triplicata, e posterior contagem e análise dos dados por regressão linear (GUPTA; NISHI, 2011; MUYLDER et al., 2011).

Dentre as abordagens mais recentes utilizadas como alternativa para melhorar a eficiência do estudo de fármacos está a utilização de genes repórter. Gene repórter é um termo tipicamente usado para designar aquele que produz um fenótipo prontamente mensurável e distinguível do sinal endógeno inespecífico. A utilização da tecnologia de genes repórter em parasitos geneticamente modificados foi sugerida como alternativa para facilitar este processo, pois podem produzir dados quantitativos, deixando o método mais rápido e reduzindo o trabalho manual (MUYLDER et al., 2011; PULIDO et al., 2012; RODRIGUEZ; TARLETON, 2012).

São características de um gene repórter ideal: ausência na célula hospedeiro, ser inerte, não afetando a fisiologia do parasita e a quantificação da sua expressão deve ser simples, sensível e de baixo custo. Esses genes utilizados geralmente são classificados como intracelular e extracelular. Nos genes intracelulares, seu produto é expresso e retido no interior da célula hospedeira. São exemplos: chloramphenicol acetyltransferase (CAT), beta-galactosidase, green fluorescent protein (GFP) e luciferase. Por outro lado, nos genes extracelulares seu produto é secretado no meio externo, como exemplos temos o hormônio de crescimento humano (HGH) e a fosfatase alcalina secretada (SEAP) (D'AIUTO et al., 2008; DUBE; GUPTA; SINGH, 2009).

A escolha de um gene repórter depende de fatores como a linhagem de célula hospedeira utilizada, a natureza do experimento e a adaptabilidade do ensaio à detecção da expressão desse gene (NEW; MILLER-MARTINI; WONG, 2003).

A transfecção de protozoários, dentre eles os do gênero *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma* com construções contendo genes

repórter revolucionou estudos que buscavam entender interações parasita-hospedeiro e no desenvolvimento de novos métodos de triagem de compostos antiparasitários (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009).

Várias opções de genes repórter e vetores de expressão estão disponíveis e já têm sua eficiência relatada na literatura. Alguns dos que há relatos na literatura de terem sido utilizados como repórter em *Leishmania* sp. são: GFP/eGFP, beta-galactosidase, beta-lactamase e luciferase (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009; GUPTA; NISHI, 2011).

GFP (e sua variante eGFP) é uma proteína autofluorescente originada da água-viva *Aequorea victoria*. Sua utilização tem como vantagens a visualização e quantificação em tempo real e segurança na sua manipulação. Porém os parasitas transfectados nem sempre produzem uma fluorescência suficiente para ser captada pelo espectrofluorômetro, sendo necessário o uso do eGFP que melhora a captação do sinal de fluorescência. Ainda assim, relatos de variações de fluorescência entre parasitas de uma mesma populção é possível, o que torna seu uso limitado em testes de drogas (GUPTA; NISHI, 2011; PULIDO et al., 2012).

O gene da Luciferase pode ser obtido de várias espécies de vagalume, besouro e cnidários, sendo mais comumente utilizada a orinda de vagalume. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina na presença de Mg^{+2} e ATP em oxiluciferina, produzindo luminescência de vida curta, que é diretamente proporcional à quantidade de luciferase presente (REIMÃO et al., 2013). Já foi utilizada para transfecção de vários gêneros de parasitas: Leishmania, Plasmodium, Trypanosoma, Toxoplasma e Entamoeba. Apesar da sua elevada sensibilidade, seu uso é dificultado pelo custo elevado do substrato (luciferina) (GUPTA; NISHI, 2011).

A beta-lactamase é uma enzima bacteriana que cliva penicilina e cefalosporina, não está presente em eucariotos e é considerada um excelente repórter. Possui diversos substratos para uma reação colorimétrica e parasitas que expressão beta-lactamase são excelentes para uso intracelular (TIUMAN et al., 2011a).

Já a beta-galactosidase é o produto do gene Lac-Z (aproximadamente 3000 pb). A beta-galactosidase possui o tamanho de 116kDa e seu uso já foi relatado em vários gêneros de parasitas: Leishmania, Plasmodium, Trypanosoma e Toxoplasma (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009). O Lac-Z é amplamente utilizado como gene repórter por oferecer várias opções de detecção, dependendo do substrato utilizado, podendo se tornar uma detecção colorimétrica ou fluorimétrica (PLOVINS; ALVAREZ, 1994).

Na detecção colorimétrica podem ser utilizados os substratos ONPG (*ortho*-Nitrophenyl-β-galactoside) ou o CPRG (Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) que é considerado 10 vezes mais sensível que o primeiro (EUSTICE et al., 1991). Por outro lado, com o substrato FDG (Fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside) e sua versão mais lipofílica C12-FDG há a detecção de fluorescência que pode ser quantificada por citometria de fluxo (PLOVINS; ALVAREZ, 1994).

Neste trabalho, desenvolvemos linhagens transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* que expressando constitutivamente o gene da beta-galactosidase. Foi utilizado o pLEXSY-hyg2 que é um vetor de *Leishmania,* de expressão constitutiva ou induzida e que permite a inserção do gene de interesse, de uma maneira que a proteína a ser expressa possa ser secretada ou não. Essas leishmanias transgênicas, umas vez que tiveram seu uso validado para ensaios in vitro, serão utilizadas na rotina de laboratório para triagem de compostos com potencial atividade leishmanicida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos sintéticos

Os compostos testados, provenientes do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM) 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.

4.1.1 Síntese das tiossemicarbazonas

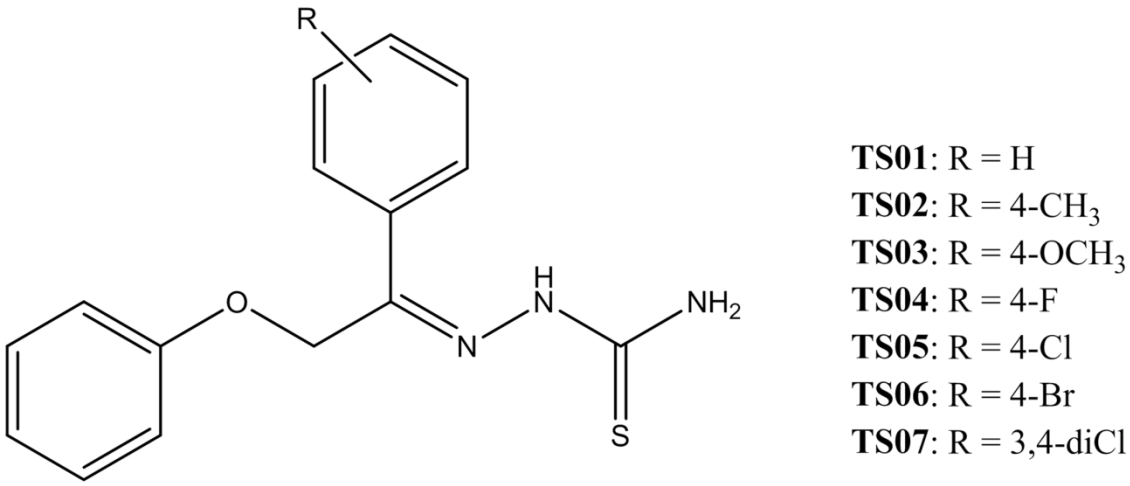
A **figura 13** apresenta a sequência das reações envolvidas na síntese das aril-tiossemicarbazonas. As aril-tiossemicarbazonas foram planejadas pela introdução da subunidade fenila em C1. Inspirados pelas características estruturais previamente identificadas na série, o grupo etila foi introduzido na posição C5 no anel tiazolidínico. 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, -^{t}Bu e -Ph.

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

Nos espectros de RMN de ^{1}H 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*).

Figura 14 - Planejamento sintético das tiossemicarbazonas



Fonte: Elaborado por Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

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). 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 254 nm. 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 ^{1}H 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 ^{1}H e ^{13}C foram adquiridos nos instrumentos Varian modelo Unity Plus (400 MHz para ^{1}H; 100 MHz para ^{13}C) ou Bruker AMX (300 MHz para ^{1}H e 75.5 MHz para o ^{13}C), usando o tetrametilsilano como padrão interno. A multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^{1}H foi designada da seguinte forma: s/singleto; d/dubleto; t/tripleto; dd/duplo dupleto; q/quarteto; m/multipleto.

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. Os detalhes da síntese dos compostos podem ser visualizados no **Apêndice A**. Na **tabela 1** podem ser visualizados os compostos com seus respectivos pesos moleculares.

Tabela 1- Compostos sintetizados e seus respectivos pesos moleculares.

Tiossemicarbazonas	Peso Molecular (g/mol)
TS-01	286.1
TS-02	300.1
TS-09	315.1
TS-10	303.1
TS-11	320.1
TS-12	364.0
TS-15	352.1

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 CO_2 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 (Cultilab) suplementado com 10% de SFB (meio completo), 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 trypan 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 e 103/2016) (**Anexo 1**).

4.3 Ensaios de citoxicidade 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 ($3x10^5$/mL) em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO_2, 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 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 (CC_{50}) 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 CC_{50} e IC_{50} para cada composto analisado.

4.4 Cultivo de macrófagos RAW 264.7 e parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. No cultivo dos parasitas transgênicos, o meio Schneider's foi ainda suplementado com 2,5 µg/mL de hemina (Sigma) e 50 µg/mL de Higromicina (Invitrogen). Os macrófagos da linhagem RAW 264.7, utilizados para obtenção de amastigotas com as linhagens de Leishmania transgênicas, foram mantidos em meio RPMI completo, a 37ºC e 5% de CO_2. Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas, em culturas de macrófagos murinos (peritoneais ou da linhagem RAW 264.7) e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos compostos conforme descritos a seguir.

4.5 Atividade biológica em promastigotas de *L. amazonensis* selvagens

Para o ensaio de atividade leishmanicida, formas promastigotas foram contadas e diluídas em meio Schneider's (Sigma) completo a 1 x 10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos derivados da estrutura das tiossemicarbazonas (0,19 a 100µg/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 IC_{50}/96h foi determinada por análise de regressão. As concentrações usadas para a determinação da IC_{50} 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* selvagens

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 $X10^7$ células/mL) foram tratadas com a IC_{50} 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 (IC_{50}) e com Saponina (0,5%) foram utilizados como controle positivo. Após a incubação os parasitas foram lavados em PBS e ressuspendidos em tampão de ligação (Annexin V Binding Buffer- BD Pharmingen™). A marcação foi realizada com 10 µL de Iodeto de Propídeo (50µg/mL) e 5µL 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 CellQuest Pro (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.

4.7 Atividade biológica em amastigotas de *L. amazonensis* selvagens

Os compostos mais promissores levando-se em consideração o baixo valor de IC_{50} sobre o parasita e a alta CC_{50} sobre macrófagos peritoneais murinos foram avaliados quanto à sua atividade sobre a forma amastigota intracelular de *L. amazonensis*. Para esta avaliação, macrófagos peritoneais coletados como anteriormente descrito foram distribuídos em placas de 24

poços (4 x 10^5 célula/mL) contendo uma lamínula redonda estéril. Os macrófagos foram incubados para aderência por 48h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO_2. 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 CO_2. 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 CO_2. Estas concentrações foram determinadas com base nos resultados obtidos dos efeitos dos compostos sobre as formas promastigotas e em macrófagos peritoneais. Levou-se em consideração uma faixa de concentração que compreendesse os valores de IC_{50} no parasita e CC_{50} 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 peritoniais de camundongos obtidos conforme anteriormente também foram incubados na concentração de 4 x 10^5 células/mL, a 37°C e 5%

de CO_2 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 CO_2. Passados os períodos de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para quantificação de óxido nítrico e citocinas. Ensaio 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 peritoniais 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 peritoniais não infectados, em condições descritas no item 4.7 e 4.8. 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 (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 Desenvolvimento de linhagens de *L. amazonensis* e *L. infatum* expressando beta-galactosidase

4.11.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR), clonagem e subclonagem

O gene da beta-galactosidase de *E. coli* (Bgal) foi gentilmente cedido pelo Dr. Osvaldo Pompílio, clonado no plasmídeo pSV2. Para a amplificação do gene a partir do pSV2 foram desenhados primers (forward 5' – TCTCCATGGATGCTAGAGGATCCCGTCGTTTTACAACGTC-3' e reverse 5'– CTCGCGGCCGCTTATTTTTGACACCAGACCAAC-3') contendo sítios de restrição para as enzimas NotI e NcoI.

Foi utilizada a enzima Accuprime Taq DNA Polymerase™ (Invitrogen™). Todas as eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1% corado com SYBR Green (Thermo Fisher) e analisadas em fotodocumentador L-PIX (Loccus). As condições da reação de PCR foram 94 °C por 2 min para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos (94 °C – 30 s / 55 °C – 30 s/ 68 °C – 3 mim e 30s) e 7 min a 68°C para extensão final. O fragmento amplificado, purificado e inicialmente clonado num vetor TA (pGEM®-T Easy - Promega) e posteriormente utilizado para a transformação em *E. coli* quimiocompetente por choque térmico, seguido da seleção em meio LB-AMP (100µg/mL) contendo IPTG (1 µL a 100mM) e X-Gal (1 µL a 20mg/mL).

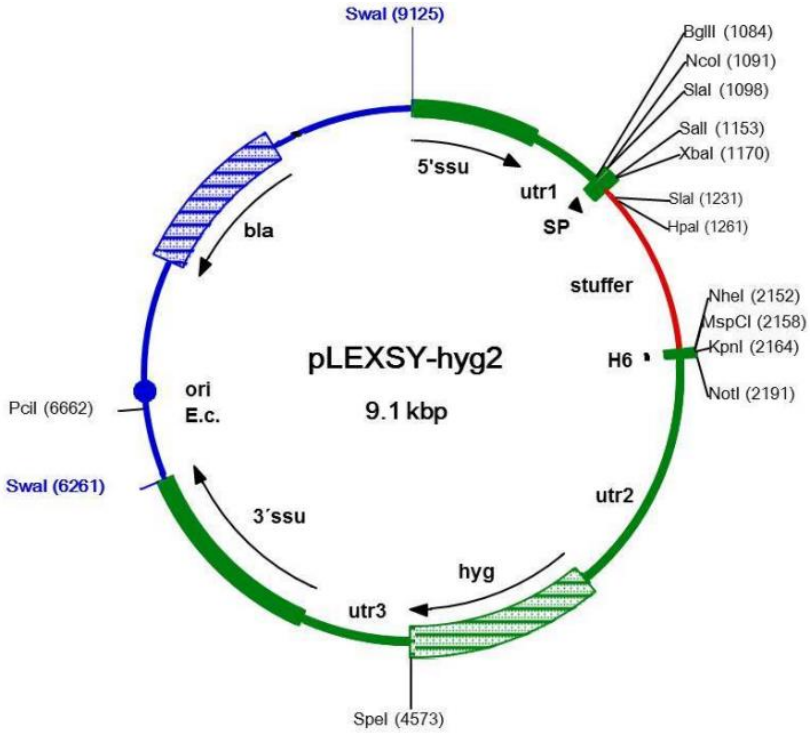
As colônias positivas para o plasmídeo foram expandidas em meio líquido LB-AMP e o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina. Alíquotas dos DNAs da construção pGEMTeasy-Bgal, foram enviadas para análise em sequenciador automático, modelo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), no setor de Sequenciamento de DNA-PE da rede de Plataformas Tecnológicas do PDTIS. As sequências obtidas foram analisadas através do DNASTAR®, Lasergene, versão 4.01, Inc., Madison, WI.

O plasmídeo pGEM-T Easy- Bgal purificado foi utilizado numa reação de digestão com as enzimas de restrição Not1 e Nco1 (New England Biolabs), para liberação do cassete contendo o gene Bgal. O produto da digestão foi

purificado do gel de agarose com o kit *illustra*^{TM} *GFX*^{TM} *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Helthcare).

O vetor de expressão pLEXSY-Hyg2 (**Figura 14**) foi digerido com as enzimas Nco1 e Not1 a 37°C por 4 horas, seguida de 65°C por 20 minutos. Em seguida, foi realizada uma reação de desfosforilação do vetor pela adição de 1U de fosfatase alcalina (1U/µl) (Promega).

Figura 15 - Mapa do vetor de expressão em Leishmania sp. pLEXSY-hyg2



Fonte: http://www.jenabioscience.com/images/ae3a4f50f1/EGE-1300.pdf

O cassete de expressão de Bgal foi então ligado ao vetor pLEXSY-Hyg2 com a T4 DNA ligase. Foi realizada uma reação do controle da ligação contendo apenas o plasmídeo desfosforilado, sem o inserto. Após a ligação, o produto da ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* quimiocompetentes, por choque térmico. Para a seleção das colônias recombinantes, as células foram então plaqueadas em ágar LB-AMP (100µg/mL) e as colônias selecionadas pela presença de IPTG e X-Gal.

O plasmídeo pLEXSY-Hyg2 é um vetor de *Leishmania* de expressão constitutiva que permite a inserção do gene de interesse em diferentes sítios de clonagem, de uma maneira que a proteína a ser expressa possa ser secretada ou não. O plasmídeo linearizado contendo o cassete de expressão se integra ao genoma da *Leishmania* por recombinação homóloga, no locus *ssu* do gene RNAr subunidade 18S. Para a expressão constitutiva e citoplasmática da ORF do gene Bgal, foi utilizado o sítio de clonagem 5'-Nco1 e 3'-Not1 de pLEXSY-Hyg2.

Uma vez construído o vetor de expressão com gene da beta-galactosidase, este foi utilizado para transformar em *E. coli* quimiocompetente por choque térmico, seguido de seleção em placa com meio LB-AMP. Cinco clones obtidos foram expandidos em meio líquido LB-AMP e foi realizada a extração do DNA plasmidial por kit de Midiprep (illustra plasmidPrep Midi Flow Kit, GE Healthcare). Foi realizada PCR para confirmação do inserto nesses 5 clones, seguida da análise por eletroforese em gel. A banda de um dos clones foi purificada (illustra^{TM} GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Helthcare) e realizada a digestão com a enzima SwaI (New England Biolabs) para linearização e liberação das regiões para recombinação homóloga ao genoma do parasita. A digestão foi purificada com acetato de potássio (3M) e isoprapanol, seguido de lavagem em etanol 70% e eluição em água estéril, sendo utilizado para a transfecção de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

4.11.2 Transfecção, seleção não-clonal e clonal das leishmanias recombinantes

Promastigotas de *L. amazonensis* selvagem e *L. infatum* foram expandidas em meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, a 26°C, por 3 dias. Os protocolos de transfecção, seleção não-clonal e seleção clonal foram realizados de acordo com o manual do fabricante do pLEXSY-Hyg2 (Jena Bioscience, Jena, Germany). Os parasitas foram contados e seu número

ajustado para 2 x 10^8, lavados com tampão HEPES-NaCl pH 7.05 e centrifugados (2000xg, 10 minutos). O *pellet* foi ressuspendido em 400 µL de tampão HEPES-NaCl pH 7.05 e colocado em cuveta de eletroporação (d=2mm). Foi utilizado 2,5 µg de DNA para a transfecção e controle negativo com o mesmo volume de água estéril, sem DNA. As suspensões de células, com e sem DNA, foram deixadas em gelo por 10 minutos e em seguida eletroporadas no *Gene Pulser XcellTM Electroporation Systems* (BIO-RAD) (500 µF, 450 V e tempo de pulso 3–5 ms). As células eletroporadas foram então transferidas para meio Schneider completo contendo 2,5µg/ml de hemina e deixadas *overnight* a 26°C em B.O.D.

A seleção não-clonal iniciou 18h após a eletroporação com a adição de Higromicina B (100 µg/mL) na cultura transfectada e no controle negativo. Os parasitas foram avaliados quanto a forma e a motilidade diariamente, pelo período de 7 dias. Durante a seleção não-clonal, os parasitas do controle negativo morrem durante o período de seleção, enquanto que os transfectados sobrevivem e se multiplicam no meio de cultura.

Os parasitas obtidos após a seleção não-clonal foram submetidos à seleção clonal, sendo plaqueados em meio Schneider's completo sólido contendo 100µg/mL de Higromicina. As placas foram incubadas a 26°C em estufa de B.O.D. por 5 dias. Cinco clones foram isolados e inoculados em meio líquido Schneider's completo e com 100µg/mL de Higromicina e incubados a 26°C em B.O.D. por 7 dias. Os clones crescidos foram expandidos para congelamento e para confirmação da integração do cassete de Bgal.

4.11.3 Confirmação da integração do cassete de Bgal no genoma

Em uma alíquota de 1,5 mL da cultura, obtida no item 4.12.2 foi realizada a extração de DNA genômico com DNAzol (Invitrogen). Esse DNA foi utilizado numa reação de PCR para confirmação da sequência do gene da beta-galactosidase e da integração no locus *ssu* do gene RNAr (primers **Tabela**

2). Em todas as reações foram utilizadas a enzima polimerase GoTaq Flexi DNA (Promega).

Tabela 2 - Primers utilizados para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma da *L. amazonensis*.

Primer	Sequência
5'ssu forward (F3001)	5'-GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG-3'
aprt reverse - utr1 (A1715)	5'-TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC-3'
hyg forward (A3804)	5'-CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG-3'
ssu reverse primer (F3002)	5'-CTGCAGGTTCACCTACAGCTAC-3'
Bgal forward	5'-TCTCCATGGATGCTAGAGGATCCCGTCGTTTTACAACGTC-3'
Bgal reverse	5'-CGCTGATGTGCCCGGCTTCTG-3'

4.11.4 Ensaio de atividade da beta-galactosidase em promastigotas

Promastigotas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram quantificadas em Câmara de Neubauer e distribuídas em placa de 96 poços nas concentrações de $4x10^8$ a $0,7x10^1$ parasitas/poço, num volume de 100 µL/poço. Adicionou-se, em seguida, 50 µL de uma solução contendo 500 µM de CPRG (Sigma-Aldrich) e o detergente Nonidet P-40 (Amresco) a 0,5% (v/v)

diluídos em PBS. O CPRG é clivado pela beta-galactosidase produzindo uma coloração avermelhada, detectável por espectrofotometria. Para melhorar o limite de detecção, os parasitas foram lisados pelo Nonidet P-40 presente na solução de CPRG. A reação foi desenvolvida durante 20 minutos, a temperatura ambiente (23ºC) e lida a 570 nm em espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11.5 Ensaio de atividade da beta-galactosidase em amastigotas

Macrófagos peritoneais e da linhagem RAW 264.7 foram utilizados para a obtenção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. infantum* transgênicas. Os macrófagos foram contados e ajustados para a concentração de $4x10^5$ células/mL e aderidos em placa de 96 poços num volume de 200 µL, por 2h, a 37ºC e 5% de CO_2. Os parasitas foram adicionados em várias proporções parasitas:macrófagos: 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1 e 50:1. A interação entre parasitas e macrófagos foi realizada por 3h, também a a 37ºC e 5% de CO_2. Após esse período, os poços foram lavados com meio de cultura para remoção das promastigotas não internalizadas. O meio foi reposto e as placas foram mantidas nas mesmas condições anteriormente citadas. Foram avaliados 3 tempos de manutenção das amastigotas intracelulares: 24, 48 e 72h. Após cada tempo, parte dos poços foram lavados e parte não, como uma variação de protocolo, onde pudemos avaliar a ação da solução de CPRG apenas nas amastigotas intracelulares aderidas (poços lavados) e no conteúdo total do poço (poços não lavados, onde há, além das amastigotas dentro dos macrófagos aderidos, amastigotas livres). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11.6 Ensaios de validação da cepa transgênica frente à Anfotericina B

Para avaliar a possibilidade do uso das linhagens transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* em ensaios de atividade leishmanicida, testamos os parasitas frente à Anfotericina B, uma das drogas de referência no tratamento

da leishmaniose. Promastigotas foram distribuídas em placa de 96 poços e submetidas a diferentes concentrações de Anfotericina B (0,019-10 µg/mL), incubada por 72h, a 26 ºC. Parasitas sem tratamento foram utilizados como controle negativo. Após a incubação os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, como num tradicional ensaio de teste de droga, e posteriormente submetidos à presença da solução de CPRG para realizarmos uma comparação dos dois métodos -contagem e absorbância- na obtenção de valores de inibição de crescimento. Esses valores são utilizados para a determinação da IC_{50} da droga através da análise de regressão. O ensaio foi realizado em triplicata.

Amastigotas intracelulares com a proporção de 15 parasitas por macrófago também foram submetidas a várias concentrações de AmB (0,0039-2 µg/mL). Foram avaliados 3 tempos de tratamento: 24, 48 e 72h. Após cada tempo de tratamento, os poços foram lavados, o meio reposto, a solução de CPRG adicionada e a absorbância lida a 570nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11.7 Detecção da beta-galactosidase por citometria de fluxo

Para realizar a detecção da beta-galactosidase por citometria de fluxo, foi utilizado como substrato o FDG (Fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside) através da adaptação de protocolos de Bachy et al. (1999) e Nolan et al.(1988). Para este ensaio, 100µL de parasitas a 10^7/mL foram transferidos para tubo de poliestireno e incubados em banho-maria (37ºC) por 5 minutos. Após isso, foi adicionado 200 µL da solução de FDG (2mM em H_2O), seguida de nova incubação a 37ºC por 30 minutos. Em seguida os tubos foram colocados no gelo e 1800 µL de PBS (com 2% SFB) foi adicionado. Os tubos foram mantidos no gelo para evitar a degradação da fluoresceína. Foram analisados 20.000 eventos por tubo, utilizando o citômetro FACSCalibur e o software CellQuest Pro. Foram analisados parasitas selvagens e transgênicos incubados com FDG ou apenas com PBS.

4.12 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, sempre considerando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Artigo publicado na revista Experimental Parasitology

Aryl thiosemicarbazones: *In vitro* and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*.

Experimental Parasitology 177 (2017) 57–65

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*

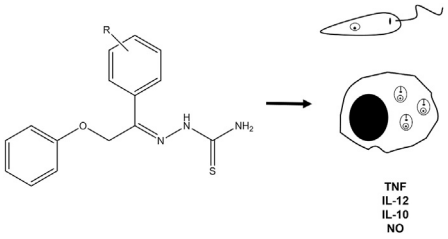
Aline Caroline da Silva [a, *], Thiago André Ramos dos Santos [a], Isis Viviane Bezerra da Silva [a], Marcos Victor Gregório de Oliveira [c], Diogo Rodrigo Magalhães Moreira [b], Ana Cristina Lima Leite [c], Valéria Rêgo Alves Pereira [a]

[a] Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil
[b] Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil
[c] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

HIGHLIGHTS

- Aryl thiosemicarbazone derivatives have low toxicity to host cells.
- Aryl thiosemicarbazone demonstrated direct activity on *L. amazonensis* in vitro.
- Macrophage Modulation by cytokines TNF, IL-10, IL-12 and nitric oxide was detected.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 October 2016
Received in revised form
27 February 2017
Accepted 18 April 2017
Available online 19 April 2017

Keywords:
Cutaneous leishmaniasis
Chemotherapy
Synthetic compound
Thiosemicarbazone

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infection caused by different species of *Leishmania* genus. Currently, there is no vaccine available for Leishmania infections in humans and conventional treatments are limited due to side effects. Therefore, the development of new antileishmanial drugs is an urgent need. In present study, we evaluated the cytotoxicity in host cells, leishmanicidal activity and immunomodulatory potential of seven aryl thiosemicarbazones. Host cell cytotoxicity was determined in peritoneal macrophages of BALB/c mouse, antiparasitic activity was determined against promastigotes and amastigotes of WHOM/00LTB 0016 strain of *L. amazonensis*. Nitric oxide (NO) production, interleukin (IL)-12, IL-10 and TNF-alpha secretion were measured in the supernatant of uninfected and infected macrophage cultures. It was observed that aryl thiosemicarbazones presented in vitro antiparasitic activity against both extracellular and intracellular forms of *L. amazonensis*. However, unlike Amphotericin B, these compounds displayed low cytotoxicity towards host cells. In addition to observed antiparasitic activity, compounds exhibited modulatory properties in the secretion of cytokines and nitrite content from uninfected stimulated and *L. amazonensis*-infected macrophages. In conclusion, we demonstrated the in vitro antiparasitic activity against *L. amazonensis* for aryl thiosemicarbazones, which is possible achieved by Th1 cytokine profile modulation. These findings are potential useful for drug development against cutaneous leishmaniasis.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a chronic disease caused by kinetoplastid protozoa belonging to Leishmania genus, which are transmitted from

* Corresponding author.
E-mail address: aline.caroline.bm@gmail.com (A.C. da Silva).

http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.003
0014-4894/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

animals to humans by sandflies. The disease has diverse clinical manifestations depending on both infecting species of *Leishmania* and host immune response (Gurung and Kanneganti, 2015). According to World Health Organization (WHO), leishmaniasis is among the six most important tropical diseases. It is estimated that there are about 1.3 million new cases every year and that 310 million people under infection risk (WHO, 2015).

Among measures taken to disease control, the main ones are: vector and reservoir animals control, early diagnosis and treatment for human cases. On the past seventy years, pentavalent antimonials (SbV) have been the first-line drug in treatment for all types of leishmaniasis. Sodium stibogluconate (Pentostam®) and meglumine antimoniate (Glucantime®) are principally used. In view of their higher toxicity, AmB and Pentamidine are second-line drugs, which are recommended in cases of contraindication, intolerance or resistance to antimonials (de Vries et al., 2015).

Limitations of current treatment includes: hospital care, due to side effects, that make treatment expensive and drug non-responsive patients occurrence owing to either drug-resistant parasite strains or immunosuppression in HIV co-infection cases (Boer et al., 2011; Croft et al., 2006; Leprohon et al., 2015). Therefore, research to find alternatives more effective, with fewer side effects and low cost associated are extremely necessary and recommended by WHO (WHO, 2015, 2010).

A number of compounds obtained through synthesis have emerged in the last decades as antiparasitic agents, among them thiosemicarbazones are some of the most promising in terms of efficacy and action spectrum. Thiosemicarbazones stand out for their broad pharmacological profile, whose properties have been widely studied due to possible of handling their radicals, coordinating their mechanism of action. Among promising biological activities of these compounds can be highlighted: anticonvulsant, antimicrobial, antiviral, antiparasitic and antitumor activities (Beraldo, 2004; Heng et al., 2015; Lessa et al., 2011a, 2011b; Santiago et al., 2014).

Activity of compounds derived from thiosemicarbazone structure on *Trypanosoma cruzi* is associated with cruzain inhibition, a cysteine protease found abundantly in trypanosomatid, which was named after it was initially identified in *T. cruzi* (Zaldini et al., 2010). On *Leishmania* sp., cysteine proteases occurring in large amounts in megasome, organelle particularly abundant in amastigote form. These enzymes, likewise cruzain, play important roles in Leishmania as virulence, maintaining parasite viability and morphology, host mononuclear phagocyte invasion and modulating its immune response, thus constituting attractive chemotherapeutic target in leishmaniasis treatment (Mottram et al., 2004; Schad et al., 2016; Schroder et al., 2013).

The lack of compounds that act with more selectivity on leishmaniasis parasite, without causing much damage to man, reinforces the need of novel therapeutic agents. This study evaluated the leishmanicidal activity of seven synthetic products derived from thiosemicarbazone structure. It was determined toxicity of these compounds on macrophages and activity on promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, in addition to assessing their potential immunomodulatory effect on macrophages. Therefore, the aims of this study was the investigation of in vitro activity against *L. amazonensis* and immunomodulatory effects for a class of aryl thiosemicarbazones.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of compounds

Aryl thiosemicarbazone compounds (Fig. 1) were synthesized at Laboratory of Planning and Medicinal Chemistry in Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil as previously described (Magalhaes Moreira et al., 2014). All reagents used for synthesis were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Vetec, or Fluka). Progress of the reactions was followed by thin-layer chromatography (silica gel 60 F254 in aluminum foil). IR was determined in KBr pellets. For NMR, it was used a Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ^{1}H and 75.5 MHz for ^{13}C) instrument. DMSO-d_6 was purchased from CIL. Mass spectrometry experiments were performed on a Q-TOF spectrometer LC-IT-TOF (Shimadzu). After chemical characterization, compounds were solubilized in DMSO (Sigma) and dissolved in culture medium (RPMI (Cultilab, Brazil) or Schneider's(Sigma, USA)) before use in experiments.

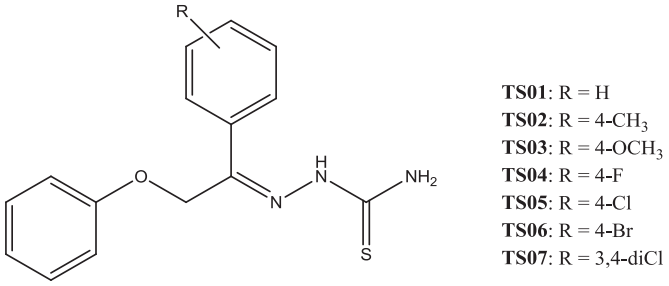


Fig. 1. Structures of aryl thiosemicarbazones studied here.

2.2. Animals, peritoneal macrophages and parasites

Male BALB/c mice, at 6–8 weeks of age and between 20 and 25 g were provide by animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at animal facilities of Aggeu Magalhães Research Center of Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. Animals were maintained under standard conditions on a constant 12 h light/dark cycle with controlled temperature (22 ± 2 °C). Food and water were given *ad libitum*. The procedures performed on animals in this study have approval by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA/FIOCRUZ 26/2011).

For peritoneal macrophages obtaining, animals were euthanized and peritoneal cavity was washed with complete RPMI 1640 medium (100μ g/ml streptomycin (Cultilab, Brazil), 100 U/ml penicillin (Cultilab, Brazil) and 10% de fetal calf serum (FCS; Cultilab, Brazil)). Cells were counted and concentration was adjusted for each experiment.

L. amazonensis promastigotes (WHOM/00 LTB 0016) were grown at 26 °C in Schneider's medium with 10% FCS. Intracellular amastigotes forms were obtained inoculating infective promastigotes in murine macrophages cultures at 8:1 parasites:macrophage ratio.

2.3. Macrophages cytotoxicity

Peritoneal macrophages were used to assess cell cytotoxicity by MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma, USA) assay (Leite et al., 2013). Cells (1×10^5 cells/well) were plated in 96 well plates and incubated for 24 h (37 °C, 5% CO2). Then, compounds were added, in six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 μg/mL) and incubated for 48 h. Untreated (DMSO) and AmB were employed as controls. After incubation with compounds, MTT at 5 mg/mL in PBS, was added. Three hours after, cell culture medium was aspirated and 100 μL of DMSO was added, solubilizing formazan crystals. Optical density was measured at 540 nm (Thermo Scientific Multiskan®, USA). Cytotoxic Concentration for 50% inhibition of viability (CC_{50}) was also calculated by regression analysis using GraphPad Prism software. Assays were

done in triplicate. Selectivity Index (SI) was determined as the ratio of CC_{50} values (macrophages) and Inhibitory Concentration for 50% parasites (IC_{50}), for each compound.

2.4. Promastigotes and amastigotes assays

Promastigotes were used for an initial screening for leishmanicidal activity (de Mello et al., 2014). Cells were diluted (1×10^6 cells/mL) in Schneider's medium with 10% fetal calf serum. Briefly, cells were incubated in a 96 well plate with compounds in ten different concentrations (0.19–100 μg/mL) for 96 h at 26 °C. AmB (Sigma, USA) was used as a reference drug and DMSO as negative control. Cells without treatment were used as negative controls. Cell growth was assessed and IC_{50}/96 h was determined by regression analysis. Assays were conducted in triplicate.

For intracellular amastigotes culture, macrophages were harvested and plated (3×10^5 cell/mL) in a 24-well plate with a 13 mm glass cover slip and allowed to adhere for 48 h, at 37 °C in 5% CO_2 (de Mello et al., 2014). Adhered macrophages were then infected with promastigotes in the stationary growth phase using a ratio 8:1 at 37 °C for 4 h. Afterward, non-interiorized parasites were removed by washing and infected culture were incubated for 24 h in complete RPMI 1640 medium (negative control) and treated with three different compounds concentrations (6.25–25 μg/ml). The cover slips were collected and stained using Panótico staining kit (Laborclin, PR, Brazil). Percentage of infected macrophages was determined by counting 100 cells and its intracellular amastigotes, in triplicate. Leishmanial activity was assessed by decrease of infected macrophages and intracellular amastigotes in cultures treated (T) and non treated (NT), described by formula: % amastigotes = T x NT/100. From the reduction of infected macrophages and intracellular amastigotes, IC_{50} was determined by regression analysis.

2.5. Apoptosis and necrosis assessment

Annexin-FITC/Propidium Iodide labeling was used to characterize cell death modalities induced by incubation with compounds (Soflaei et al., 2012). Promastigotes (4×10^7 cells/mL) were treated with compounds in its respective IC_{50} values. AmB (IC_{50}) and Saponin (0.5%) were used as controls. After incubation, parasites were washed with PBS and ressupended in binding buffer (Annexin V Binding Buffer- BD Pharmingen™, USA). For labeling, 10 μL of propidium iodide (50 μg/mL) and 5 μL of Annexin-FITC (BD Pharmingen™, USA) were added for 15 min at room temperature in dark. Flow cytometry was conducted in FACSCalibur (Becton & Dickinson, USA) using Cell Quest software. For each compound we acquire 20,000 events. Assays were conducted in duplicates.

2.6. Collection of culture supernatants for cytokine quantification and nitric oxide production

Murine peritoneal macrophages obtained as previously mentioned were plated in 24-well plate (4×10^5 cell/mL) at 37 °C, 5% CO_2. Compounds (25, 12.5 e 6.25 μg/mL) or AmB (2, 1, 0.5, 0.25 e 0.125 μg/mL) were added and incubated for 24 and 48 h. Peritoneal macrophages infected with parasites were submitted at the same conditions (only 24 h of incubation) and compounds concentrations. After that time, supernatants were harvested for evaluation of nitric oxide (NO) and cytokine production. Assays were conducted in triplicate.

Griess reagent was used for indirect nitric oxide measurement production by macrophage. Culture supernatants described above were plated in 96 well plates. After that, Griess reagent was added and incubated for 10 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm using THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC spectrophotometer. Nitrite concentrations (μM) were determined using a standard curve. Assays were conducted in triplicate.

Macrophage culture supernatants were also used for measurement of cytokine production. OptEIA Kit (BDBiosciences, USA) was used for dosage of TNF, IL-10 and IL-12 production, according to the manufacturer's suggested protocols.

2.7. Statistical analysis

Linear regression and significance analysis were done using GraphPad Prism 5.0 software. For significance analysis was used ANOVA and Dunnett's test, taking into account $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of thiosemicarbazones on peritoneal macrophages

Compounds activity on peritoneal macrophages was evaluated by MTT assay. All compounds tested showed a higher cytotoxicity to parasites when compared to murine macrophages, presenting lower IC_{50} values than CC_{50} values. Some compounds showed no toxicity to macrophages in any concentration tested (Table 1). CC_{50} values ranged between 111.8 and 163.1 μM for TS**05** and TS**01**, respectively.

3.2. In vitro activities against L. amazonensis promastigotes and amastigotes

Our results in vitro with *L. amazonensis* promastigotes demonstrate that all compounds were able to inhibit cellular growth, with IC_{50} values ranging between 3.5 and 87.5 μM (Table 1). TS**03** was the most activity compound tested on promastigote.

Evaluated compounds showed lower IC_{50} values in promastigotes than in intracellular amastigotes, thus demonstrating greater effectiveness against the first. Intracellular amastigotes IC_{50} values ranged from 18.3 to 40.3 μM. Amastigotes SI ranged from 2.96 to 4.67. TS**06** was the most activity against amastigotes (IC_{50} = 18.3 μM) and TS**04** was the most selective compound.

Reference drug used in this work, AmB, presented strong effectiveness against the *L. amazonensis* strain used in trials, with low IC_{50} values for both parasite forms and high Selectivity Index.

3.3. In vitro cytokines induction

3.3.1. Tumor necrosis factor (TNF)

TNF production on macrophages was significantly increased

Table 1
Activity of thiosemicarbazones on murine macrophages and *Leishmania amazonensis*.

Compound	CC_{50} (μM)	IC_{50}PRO (μM)	IC_{50}AMA (μM)	SI_{PRO}	SI_{AMA}
TS01	163.1 ± 37.6	6.0 ± 0.02	33.0 ± 12.8	27.13	3.64
TS02	>333.2	12.5 ± 1.4	37.8 ± 11.2	ND	ND
TS03	155.5 ± 10.8	3.5 ± 0.33	34.3 ± 1.23	44.96	3.95
TS04	154.4 ± 10.0	87.5 ± 2.14	25.1 ± 5.08	1.76	4.67
TS05	111.8 ± 12.1	4.9 ± 0.15	40.3 ± 0.42	22.94	2.96
TS06	>274.7	4.8 ± 0.21	18.3 ± 4.04	ND	ND
TS07	>284	3.6 ± 0.9	34.8 ± 0.03	ND	ND
AmB	8.1 ± 2.3	1.1 ± 0.15	0.23 ± 0.02	7.5	34.09

Note: CC_{50}: Cytotoxic Concentration for 50% of macrophages (μM). IC_{50}PRO: Inhibitory Concentration for 50% of *L. amazonensis* promastigotes (μM). IC_{50}AMA: Inhibitory Concentration for 50% of *L. amazonensis* amastigotes (μM). SI_{PRO}: Selectivity Index = CC_{50} Macrophages/IC_{50} Promastigotes. SI_{AMA}: Selectivity Index = CC_{50} Macrophages/IC_{50} Amastigotes.
ND: Not determined. No toxicity in any concentration tested.

under the influence of TS**01** (6.25 μg/mL), TS**03** (6.25 μg/mL), TS**04** (12.5 μg/mL), TS**05** (12.5 μg/mL) after 24 h of treatment (Fig. 2a). No production of TNF was detected after 48 h treatment in any situation, as expected.

Macrophage infection with *L. amazonensis*, applied to obtain intracellular amastigotes, caused a significant increase of TNF production in comparison to uninfected control. In presence of compounds, there was a greater increase in production of TNF only with TS**01**, at lowest concentration tested, and significant decrease of this cytokine in cultures treated with TS**05**, TS**06** and TS**07** in lower/or intermediate concentration when compared to infected and untreated control (Fig. 2b).

3.3.2. Interleukin-12 (IL-12)

Significant IL-12 production in supernatants of macrophages was detected after 24 h incubation with TS**01** (6.25 μg/ml), TS**02** (25 μg/ml) and TS**06** (25 and 12.5 μg/ml). On the other hand, after 48 h, significant production of this cytokine was detected in cultures stimulated with compounds TS**01** (12.5 and 6.25 μg/ml), TS**04** (6.25 μg/ml), TS**06** (25 μg/ml) and TS**07** (6.25 μg/ml) (Fig. 3a and b).

L. amazonensis infected macrophages presented a slight increase in IL-12 production, not statistically significant, after 24 h. When this culture was treated, only compounds TS**03** (6.25 μg/ml), TS**05** (6.25 μg/ml) and TS**07** (6.25 μg/ml) stimulated IL-12 production significantly compared to control (Fig. 3c).

3.3.3. Interleukin-10 (IL-10)

During a period of 24 h, there was a significant increase in IL-10 production in presence of compounds TS01 (12.5 and 6.25 μg/ml) and TS07 (12.5 and 6.25 μg/ml). On the other hand, there was a significant reduction in this cytokine production to TS01 (25 μg/ml), TS03 (25 and 12.5 μg/ml), TS04 (25 and 6.25 μg/ml), TS05 (12.5 μg/ml) and TS06 (12.5 μg/ml) (Fig. 4a).

After 48 h, only TS01 (12.5 and 6.25 μg/ml) and TS02 (25 μg/ml) significantly increased IL-10 production, whereas TS03 (6.25 μg/ml) and TS06 (25 μg/ml) reduced their production (Fig. 4b).

L. amazonensis infected macrophages showed a slight reduction in IL-10 production but not significantly. By the same way, different concentrations of compounds no presented significant difference in production of this cytokine (Fig. 4c).

3.4. In vitro nitric oxide production

Nitric Oxide production was evaluated in vitro in peritoneal macrophages stimulated or not with compounds after two incubation times: 24 h and 48 h. In both time was identified production

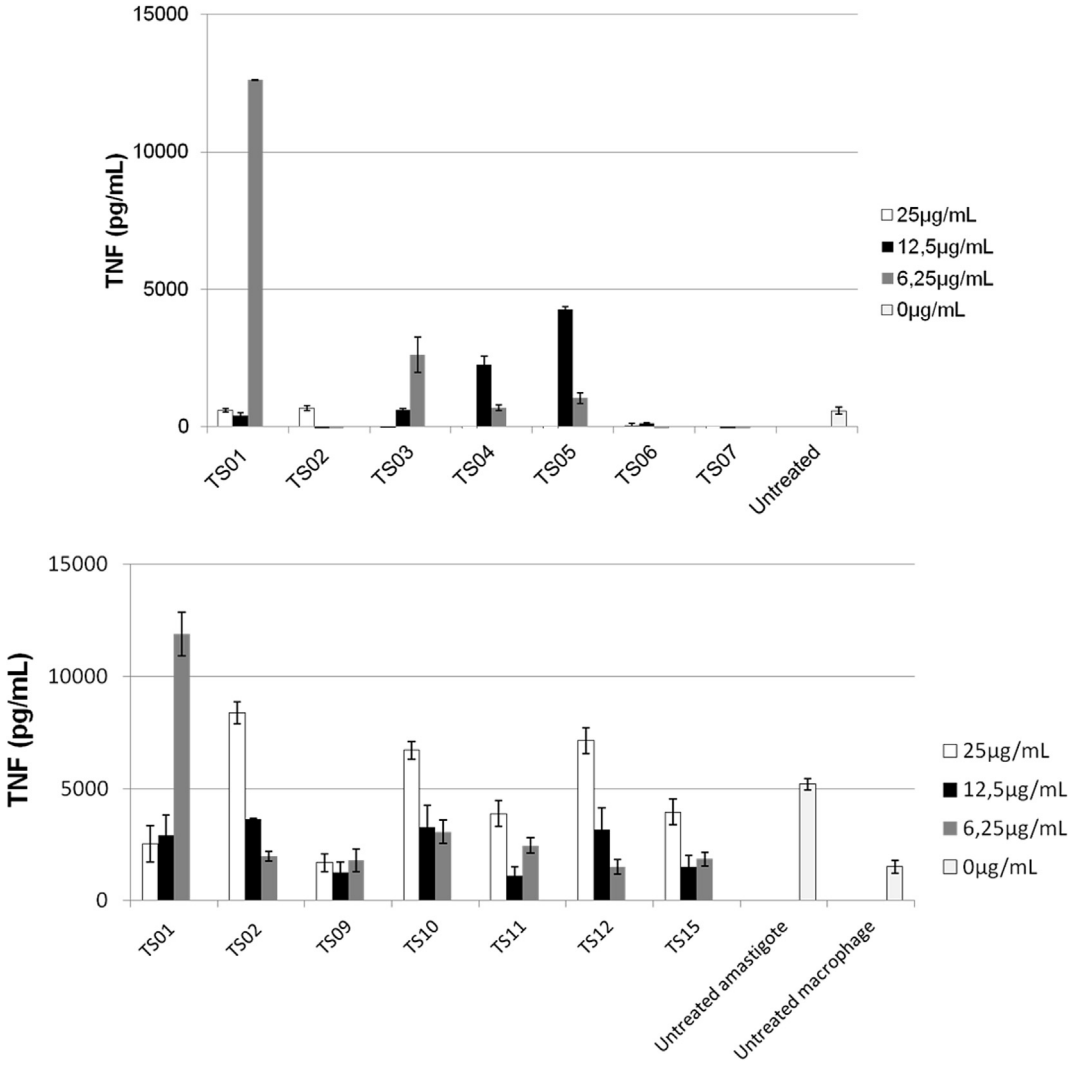


Fig. 2. Effect of thiosemicarbazones on TNF production in mouse macrophages (a) and *L. amazonensis* infected macrophages (b) after 24 h. Note: (A) Increase was significant for TS**01**, TS**03**, TS**04** and TS05. $P < 0.0001$. (B) Increase was significant for TS01. Decrease was significant for TS05, TS06 and TS07. $P = 0.0001$.

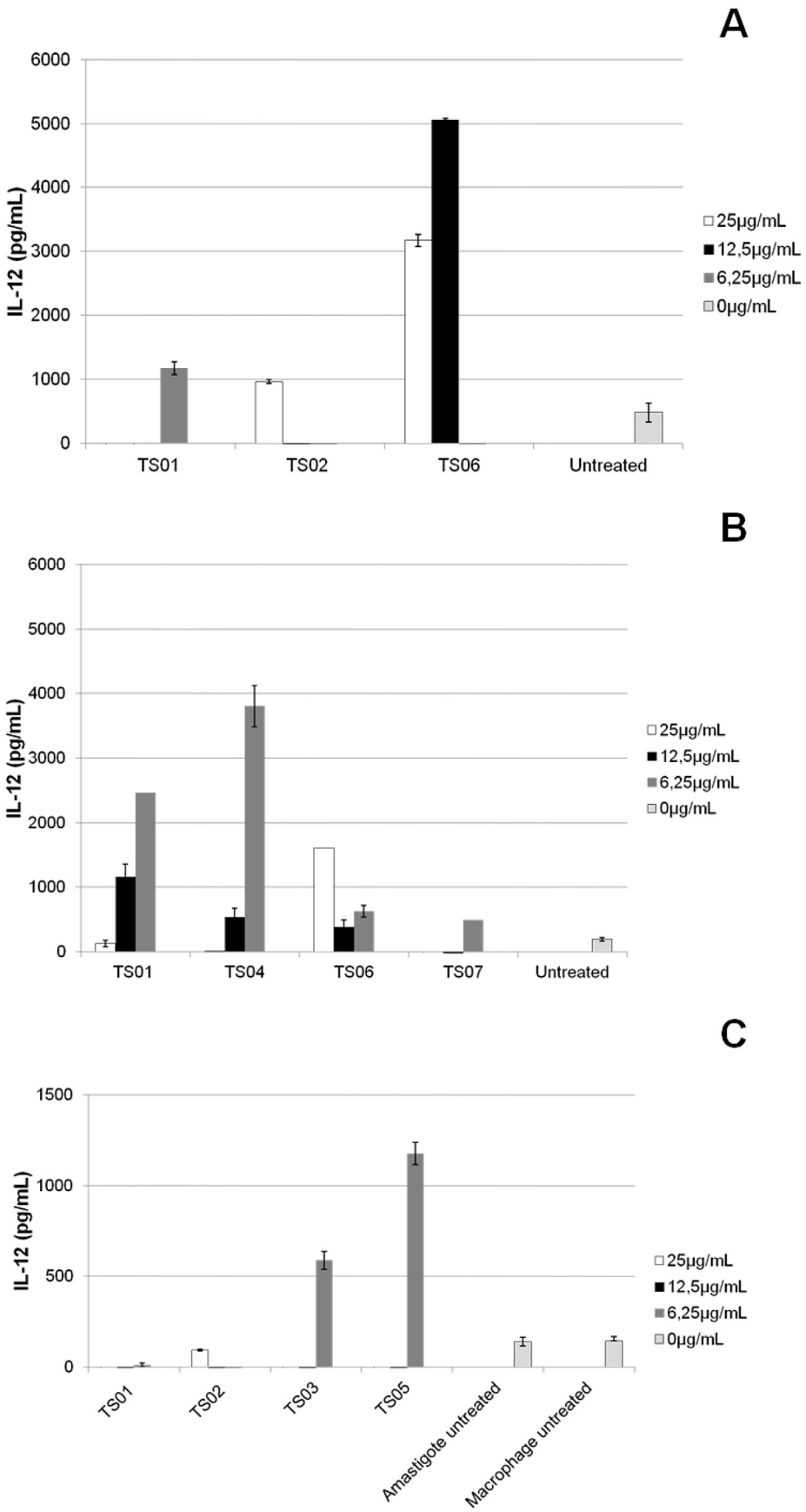


Fig. 3. Effect of thiosemicarbazones on IL-12 production in mouse macrophages after 24 h (a) and 48 h (b) and *L. amazonensis* infected macrophages after 24 h (c). Note: (A) Increase was significant for TS**01**, TS**02** and TS**06**. $P < 0.0001$. (B) Increase was significant for TS**01**, TS**04**, TS**06** and TS**07**. $P < 0.0001$. (C) Increase was significant for TS**03** and TS**05**. $P < 0.0001$.

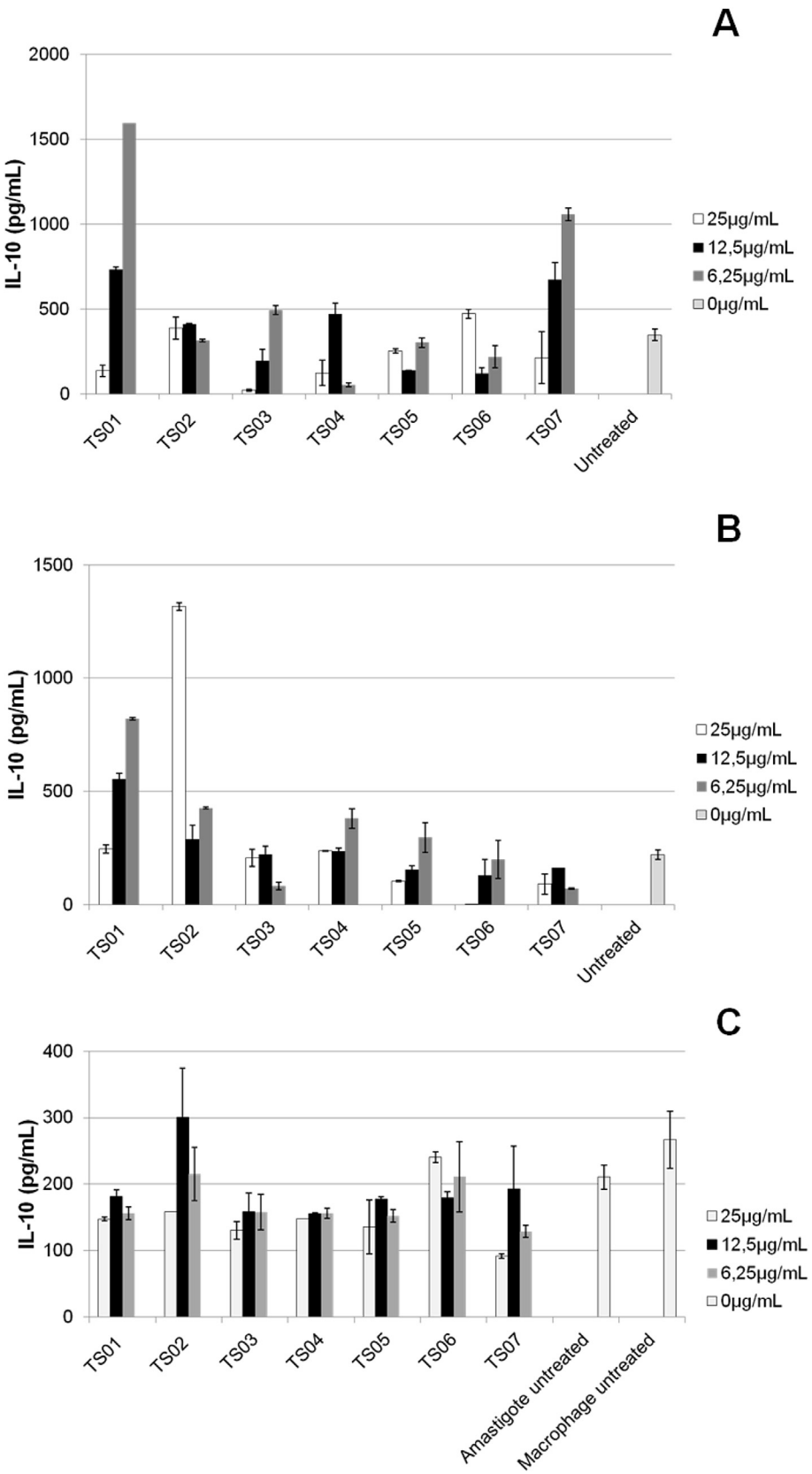


Fig. 4. Effect of thiosemicarbazones on IL-10 production in mouse macrophages after 24 h (a) and 48 h (b) and *L. amazonensis* infected macrophages after 24 h (c). Note: (A) Increase was significant for TS**01** and TS**07**. $P < 0.0001$. (B) Increase was significant for TS**01** and TS**02**. Decrease was significant for TS**03** and TS**06**. $P = 0.0002$. (C) No statistically significant difference. $P = 0.2306$.

Table 2
NO- production in murine macrophages.

Treatment	NO_2^- (μM)	
	24 h	48 h
Untreated Control	8.8 ± 0.23	9.26 ± 0.01
TS**01** (μg/mL)		
25	10.7 ± 0.02 *	7.7 ± 0.05 *
12.5	10.2 ± 0.07 *	8.6 ± 0.03 *
6.25	10.6 ± 0.35 *	8.6 ± 0.02
TS**02** (μg/mL)		
25	10.1 ± 0.07 *	8.6 ± 0.05 *
12.5	9.8 ± 0.13 *	8.5 ± 0.05 *
6.25	9.6 ± 0.23 *	8.5 ± 0.13 *
TS**03** (μg/mL)		
25	9.3 ± 0.2	8.2 ± 0.66 *
12.5	8.6 ± 0.05	8.6 ± 0.25 *
6.25	8.9 ± 0.7	8.9 ± 0.1
TS**04** (μg/mL)		
25	9.5 ± 0.13	8.9 ± 0.00
12.5	9.1 ± 0.13	8.9 ± 0.05
6.25	9.1 ± 0.8	9.1 ± 0.16
TS**05** (μg/mL)		
25	11.9 ± 0.3 *	12.3 ± 2.3
12.5	10.5 ± 0.76 *	11.8 ± 0.2
6.25	10.9 ± 0.03 *	10.6 ± 0.00
TS**06** (μg/mL)		
25	11.4 ± 0.17 *	11.7 ± 0.3
12.5	10.5 ± 0.23 *	10.5 ± 0.16
6.25	9.8 ± 0.16	9.6 ± 0.55
TS**07** (μg/mL)		
25	9.6 ± 0.3	9.0 ± 2.07
12.5	10.2 ± 0.21 *	9.0 ± 0.5
6.25	10.3 ± 0.02 *	9.7 ± 0.1

Note: (*) represents statistically significant values. Was used ANOVA and Dunnett's test.

of this mediator, and the most significant results were observed after incubation for 24 h. In 48 h, only TS**02** produced significant amounts of NO in all concentrations tested, compared to untreated control (Table 2).

3.5. Cell death analysis

Parasites incubated with TS**02** (IC_{50} value) for 24 h have significantly labelling compatible with necrosis and apoptosis. Similar labelling was observed with AmB treatment (Fig. 5), however TS**02** caused twice more labelling compatible with necrosis than AmB. On the other hand, TS**01**, TS**03**, TS**04**, TS**05**, TS**06** and TS**07** did not cause any significant changes in parasites, under experimental conditions applied (Data not shown).

4. Discussion

Cutaneous leishmaniasis is usually a debilitating disease, have no vaccine available, and chemotherapy, based on pentavalent antimonials, causes serious side effects with resistance to treatment related (WHO, 2015). Within this scenario, the search for new chemotherapeutic agents remains necessary. Medicinal chemistry has greatly contributed to generate structural changes in molecules to obtain new derivatives and has been a successful approach for new drugs design, based on known molecular targets in parasite (Monzote, 2009).

Thiosemicarbazones stand out for their broad pharmacological profile, whose properties have been widely studied due to possibility of handling their radicals, coordinating their mechanism of action. Among promising biological activities of these compounds can be highlight: anticonvulsant, antimicrobial, antiviral, antiparasitic and antitumor activities (Beraldo, 2004; Heng et al., 2015; Lessa et al., 2011a, 2011b; Santiago et al., 2014). Novel thiosemicarbazone synthesis was stimulated by its known inhibition activity on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. cysteine protease (Britta et al., 2012; Schroder et al., 2013).

In this work, we analyzed cytotoxicity compounds on mouse macrophages, since one of the main criteria in development of new compounds with leishmanicidal activity is low toxicity to mammalian cells and activity against parasite in low amounts (Liñares et al., 2006). Compounds demonstrated low toxicity on macrophages, and CC_{50} values were always lower than IC_{50} to promastigotas and amastigotes. The low toxicity of compounds towards macrophages had a direct effect on selectivity index values (SI), which were always more selective for parasites than to host cells.

Given that promastigote is parasite form present in insect vector, compounds activity in this form served as a starting point to determine leishmanicidal activity. IC_{50} values obtained for amastigotes were higher than promastigotes. However, it must be taken into consideration that action on amastigote form is complicated by the need for permeation across macrophage and parasitophorous

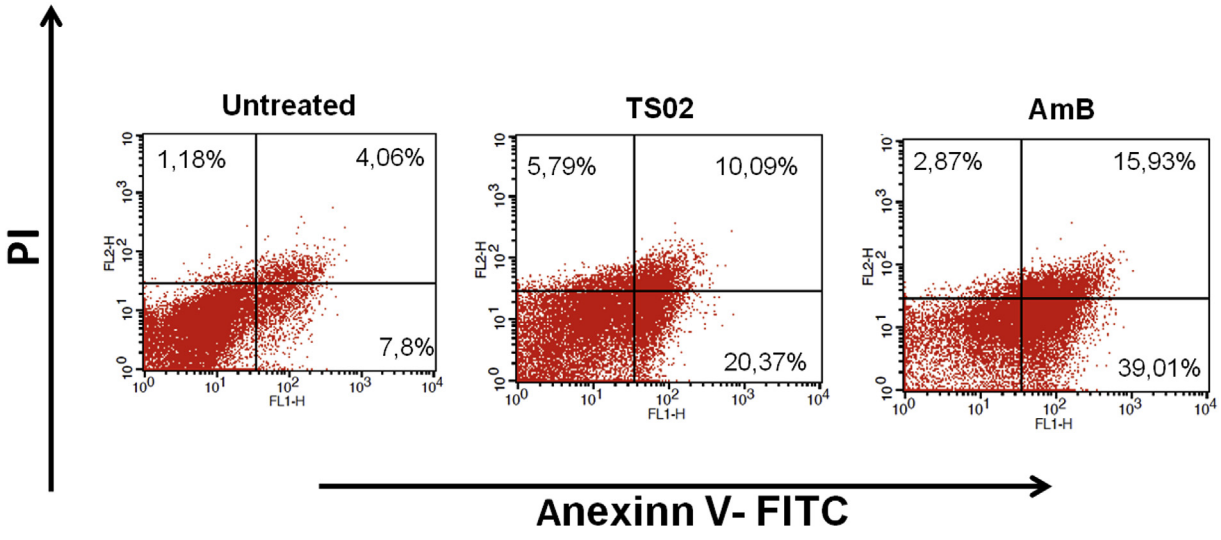


Fig. 5. Mechanisms of cell death induced by compound TS02. Note: TS**02** and AmB were statistically significant. Was used ANOVA and Dunnett's test.

vacuoles membranes before reaching parasite (Muylder et al., 2011).

Variations on leishmanicidal activity observed suggest that there is a structure-activity relationship for synthetic compounds tested, due to the variation in substituents added on scaffold molecule. On promastigotes, we observed that presence of ether (TS**03**) and dichloro (TS**07**) reduced IC_{50} values, while compounds with substitution by fluorine (TS**04**) and phenyl (TS**02**), have proved less effective against parasites.

To study the structure-antiparasitic activity relationships, we examined mono-substituents attached at 4-position of phenyl ring (CH3, OCH3, F, Cl, Br) in addition to a di-substituent (3,4-diCl). These substituents presented different electronic contribution to the phenyl group, allowing us to investigate the nature of each substituent for antiparasitic activity. In fact, the most selective compounds for promastigotes and amastigotes were TS**03** and TS**04**, respectively. In common, both compounds carry out small substituents and H-bond acceptors. The presence of a halogen in TS**04** possibly collaborated with this increased activity, as the use of halogen substituents contributes to halogen bond formation in pharmacological target, contributing to stability of drug-receptor binding (Zaldini et al., 2010). By comparing unsubstituted compound TS**01** and methyl compound TS**02**, it is observed that increasing lipophilicity decreases antiparasitic activity. Other compounds such as TS**05**, TS**06** and TS**07** also have halogens in their structure and had low IC_{50} values in comparison to unsubstituted thiosemicarbazone TS**01**.

Macrophages have importance on process of susceptibility or resistance to leishmaniasis, once parasites multiply inside them. A primary resistance mechanism to Leishmania infection is nitric oxide production by infected macrophages. Important cytokines, as IFN-γ and TNF, are produced on Th1 response and guide the induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS), leading to NO production from L-arginine (Holzmuller et al., 2002; Kückelhaus et al., 2013; Lima-Junior et al., 2013).

Stimulated macrophages showed increased on NO production in the presence of all compounds (except TS**04**) at any moment, after stimulation for 24 or 48 h. NO importance on parasite and course of leishmaniasis is known: parasite resistance to NO are correlated with larger lesions and absence of induction of TNF production, an important cytokine of Th1 profile, associated to leishmaniasis infection resistance (Giudice et al., 2007; Souza et al., 2010).

As cytokine production is closely related to patient's response to disease and treatment, in this work we analyze the influence of compounds on production of some cytokines important for leishmaniasis course, and which can be produced by macrophages: TNF, IL-12 and IL-10. In addition, thiosemicarbazones are known to regulate production of pro-inflammatory cytokines (as TNF and IL-12) and anti-inflammatory cytokines (as IL-10) (Freitas et al., 2012). Compounds TS**01**, TS**02**, TS**03**, TS**04**, TS**05** and TS**06** were able to induce the production of pro-inflammatory cytokines. On the other hand, the production of IL-10 (anti-inflammatory cytokine) varied after thiosemicarbazones stimulation.

Although IL-10 stimulation is detrimental for facilitating parasite replication in host cells, pro-inflammatory cytokines such as IFN-γ, TNF and IL-12 may be toxic when produced in high amounts. IL-10 will block the Th1 cells activation, which can prevent the overproduction of these cytokines, avoiding tissue damage (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Despite the importance of the Th1 on the cure of infection, it is worth emphasizing that the same cytokines involved in infection control may be related to the pathogenesis of disease. A balance is required with Th2-type cytokine producing cells: a Th1 x Th2 dichotomy (Reis et al., 2006).

Cell death mechanisms were evaluated on promastigotas and TS**02**, similar to AmB, was able to induct apoptosis and necrosis on parasites. Apoptosis, a process that can eliminate cells without causing an immune response is important in leishmaniasis pathogenesis context, is a process that can facilitate parasite survival inside macrophage (El-Hani et al., 2012) and it has been reported occurrence during the use of several reference drugs as antimonial, Miltefosine and AmB. On the other hand, necrotic process results in inflammation, consequence of action and activation of phagocytic cells, there recruitment of inflammatory cells associated with Th1 cytokines production which would result in disease remission. However with necrosis and increased pro-inflammatory cytokines in these lesions, there would also be the accumulation of neutrophils, which are related to increased levels of amastigotes and greater amount of drug to be healing of the lesions (Passero et al., 2010).

In conclusion, results demonstrated activity of thiosemicarbazone against *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes, with low toxicity to peritoneal macrophages in vitro. Compounds tested also showed immunomodulation activity that may be relevant in leishmaniasis treatment and progression. Cell death induction was a significant found since it plays a central role in disease progression. Results obtained in this study confirmed important antiparasitic activity of thiosemicarbazones.

Conflicts of interest

The authors hereby declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are thankful to FACEPE, CNPq for financial support and FIOCRUZ for the use of its facilities.

References

Beraldo, H., 2004. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. Quim. Nov. 27, 461–471.

Boer, M. Den, Argaw, D., Jannin, J., Alvar, J., 2011. Leishmaniasis Impact and Treatment Access. October.

Britta, E.A., Silva, A.P.B., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Silva, C.C., Sernaglia, R.L., Nakamura, C.V., 2012. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in Leishmania amazonensis. PLoS One 7, e41440. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041440.

Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J. Med. Res. 399–410.

de Mello, T.F.P., Bitencourt, H.R., Pedroso, R.B., Aristides, S.M. a, Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., 2014. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in Leishmania (Viannia) braziliensis. Exp. Parasitol. 136, 27–34. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.11.003.

de Vries, H.J.C., Reedijk, S.H., Schallig, H.D.F.H., 2015. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. Am. J. Clin. Dermatol 16, 99–109. http://dx.doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z.

El-Hani, C.N., Borges, V.M., Wanderley, J.L.M., Barcinski, M. a, 2012. Apoptosis and apoptotic mimicry in Leishmania: an evolutionary perspective. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2, 96. http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00096.

Freitas, M.L., De, Dalmolin, L., Oliveira, L.P., Moreira, R., Roman, S.S., Alexandre, F., Soares, A., Bresolin, L., Maria, M., Frescura, M., Brandão, R., 2012. Effects of Butane-2, 3-dione Thiosemicarbazone Oxime on Testicular Damage Induced by Cadmium in Mice, vol. 37, pp. 899–910.

Giudice, A., Camada, I., Leopoldo, P.T.G., Pereira, J.M.B., Riley, L.W., Wilson, M.E., Ho, J.L., Jesus, A.R., De, Carvalho, E.M., Almeida, R.P., 2007. Resistance of Leishmania (Leishmania) Amazonensis and Leishmania (Viannia) Braziliensis to Nitric Oxide Correlates with Disease Severity in Tegumentary Leishmaniasis, vol. 12, pp. 1–12. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-7-7.

Gurung, P., Kanneganti, T.-D., 2015. Innate immunity against *Leishmania* infections. Cell. Microbiol. n/a-n/a. http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12484.

Heng, M.P., Sinniah, S.K., Teoh, W.Y., Sim, K.S., Ng, S.W., Cheah, Y.K., Tan, K.W., 2015. Synthesis of a DNA-targeting nickel (II) complex with testosterone thiosemicarbazone which exhibits selective cytotoxicity towards human prostate cancer cells (LNCaP). Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 150, 360–372. http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.095.

Holzmuller, P., Sereno, D., Cavaleyra, M., Mangot, I., Daulouede, S., Vincendeau, P., Lemesre, J., 2002. Nitric Oxide-mediated DNA Fragmentation in Leishmania

Amazonensis Amastigotes Nitric Oxide-mediated Proteasome-dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in Leishmania Amazonensis Amastigotes. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.7.3727.

Kückelhaus, C.S., Kückelhaus, S. a S., Tosta, C.E., Muniz-Junqueira, M.I., 2013. Pravastatin modulates macrophage functions of Leishmania (L.) amazonensis-infected BALB/c mice. Exp. Parasitol. 134, 18–25. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.020.

Leite, A.C.L., Barbosa, F.F., Cardoso, M.V.D.O., Moreira, D.R.M., Coelho, L.C.D., da Silva, E.B., Filho, G.B.D.O., de Souza, V.M.O., Pereira, V.R. a, de C. Reis, L., Ferreira, P.M.P., Pessoa, C., Wanderley, A.G., Mota, F.V.B., da Silva, T.G., 2013. Phthaloyl amino acids as anti-inflammatory and immunomodulatory prototypes. Med. Chem. Res 1–8. http://dx.doi.org/10.1007/s00044-013-0730-1.

Leprohon, P., Fernandez-Prada, C., Gazanion, É., Monte-Neto, R., Ouellette, M., 2015. Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist 5, 26–35. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005.

Lessa, J.A., Guerra, J.C., de Miranda, L.F., Romeiro, C.F.D., Da Silva, J.G., Mendes, I.C., Speziali, N.L., Souza-Fagundes, E.M., Beraldo, H., 2011a. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. J. Inorg. Biochem. 105, 1729–1739. http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.008.

Lessa, J.A., Reis, D.C., Mendes, I.C., Speziali, N.L., Rocha, L.F., Pereira, V.R. a, Melo, C.M.L., Beraldo, H., 2011b. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. Polyhedron 30, 372–380. http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2010.11.004.

Lima-Junior, D.S., Costa, D.L., Carregaro, V., Cunha, L.D., Silva, A.L., Mineo, T.W., Gutierrez, F.R., Bellio, M., Bortoluci, K.R., Flavell, R.A., Bozza, M.T., Silva, J.S., Zamboni, D.S., 2013. Inflammasome-derived IL-1ß Production Induces Nitric Oxide-mediated Resistance to Leishmania.Pdf.

Liñares, G.E.G., Ravaschino, E.L., Rodriguez, J.B., 2006. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. Curr. Med. Chem. 13, 335–360.

Magalhaes Moreira, D.R., De Oliveira, A.D.T., Teixeira De Moraes Gomes, P.A., De Simone, C.A., Villela, F.S., Ferreira, R.S., Da Silva, A.C., Dos Santos, T.A.R., Brelaz De Castro, M.C.A., Pereira, V.R.A., Leite, A.C.L., 2014. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. Eur. J. Med. Chem. 75, 467–478. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.001.

Monzote, L., 2009. Current Treatment of Leishmaniasis: a Review, pp. 9–19.

Mottram, J.C., Coombs, G.H., Alexander, J., 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. Curr. Opin. Microbiol. 375–381. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.010.

Muylder, G., De, Ang, K.K.H., Chen, S., Arkin, M.R., Engel, J.C.,H.J., 2011. A screen against Leishmania intracellular Amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. Screening 5. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001253.

Passero, L.F.D., Marques, C., Vale-Gato, I., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., Santos-Gomes, G., 2010. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of Leishmania (Viannia) shawi. Parasitol. Int. 59, 159–165. http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2009.12.010.

Reis, L.D.C., Felinto De Brito, M.E., Souza, M.D.A., Pereira, V.R.A., 2006. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana, 35, 103–115.

Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O., Carvalho, E.M., 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 31, 143–148.

Santiago, E.D.F., Oliveira, A., De, Oliveira, B., De, Magalhaes, R., 2014. Eval. Anti-Schistosoma mansoni Activity Thiosemicarbazones Thiazoles 58, 352–363. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01900-13.

Schad, C., Baum, U., Frank, B., Dietzel, U., Mattern, F., Gomes, C., Ponte-sucre, A., Moll, H., 2016. Development of a New Antileishmanial Aziridine-2, 3-Dicarboxylate- based Inhibitor with High Selectivity for Parasite Cysteine Proteases, 60, pp. 797–805. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00426-15.Address.

Schroder, J., Noack, S., Marhofer, R.J., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Selzer, P.M., 2013. Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of Leishmania mexicana cysteine protease CPB. PLoS One 8, 1–12. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077460.

Soflaei, S., Dalimi, A., Ghaffarifar, F., Shakibaie, M., Shahverdi, A.R., Shafiepour, M., 2012. In Vitro antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on Leishmania infantum. J. Parasitol. Res. 756568. http://dx.doi.org/10.1155/2012/756568.

Souza, A.S., Giudice, A., Pereira, J.M.B., Guimarães, L.H., de Jesus, A.R., de Moura, T.R., Wilson, M.E., Carvalho, E.M., Almeida, R.P., 2010. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-α production. BMC Infect. Dis. 10, 209. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-209.

WHO, 2010. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the 22–26.

WHO, 2015. Leishmaniasis Fact Sheet.

Zaldini, M., Montenegro, M., Cristina, A., Leite, L., Veríssimo, M., Cardoso, O., Rodrigo, D., Moreira, M., José, D., Alberto, C., Campos, L., Assis, M., Rego, V., Pereira, A., Salgado, R., Hobson, J., 2010. Bioorganic & Medicinal Chemistry Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. Bioorg. Med. Chem. 18, 7826–7835. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.056.

5.2 Artigo submetido à revista Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Leishmania sp. high beta-galactosidase expression: an alternative model for drug screening assessment.

Leishmania sp. high beta-galactosidase expression: an alternative model for drug screening assessment.

Aline Caroline da Silva Santos[a*]
Danielle Maria Nascimento Moura[a]
Thiago André Ramos dos Santos[a]
Osvaldo Pompílio de Melo Neto[b]
Valéria Rêgo Alves Pereira[a]

a. Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brasil.
b. Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brasil.

Institution address: Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Av. Professor Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife/PE. CEP: 50.740-465.

*** Corresponding author at:** Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil.
Telefone number: +5581 2101 2631
Email adress: aline.caroline.bm@gmail.com (Aline Caroline da Silva Santos)

Abstract

Leishmaniasis is caused by protozoa belonging to the genus Leishmania and is an important public health problem, being present in more than 90 countries. Thus, the development of new antileishmanial drugs is an urgent need. Identification of new active compounds is one of the limiting factors in discovery and development of new drugs for leishmaniasis treatment, once this screening is composed of multiple steps and its process can be quite time consuming. In this work, we propose an alternative model for colorimetric drug screening assessment, based on the generation of *L. amazonensis* and *L. infantum* strains able to strongly express beta-galactosidase. Using these parasites, we validated in vitro assays against promastigotes and intracellular amastigotes. These models were tested against Amphotericin B, with satisfactory and reproducible results. With these recombinant parasites, is possible to quantify promastigotes and amastigotes colorimetrically, in an alternative model of drug screening against cutaneous and visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; *Leishmania infantum*; Beta-galactosidase; Drug screening; Chemotherapy.

1. Introduction

Leishmaniasis is caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania* that infects mammalian mononuclear phagocytic cells. Depending on the Leishmania specie and host immune response, the disease presents distinct clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). Leishmaniasis is transmitted by sandflies and it is present in more than 90 countries, with 310 million people at risk of infection and around 1.3 million new cases registered each year (WHO, 2015). Currently there is no vaccine available for Leishmania infections in humans and conventional treatments are toxic to patients, with long duration, and severe adverse reactions, which often lead to treatment abandonment. For this reason, development of new antileishmanial drugs is an urgent need (BEZERRA DE MENEZES et al., 2015; DEN BOER et al., 2011; TIUMAN et al., 2011a). Identification of active compounds is one of the limiting factors in discovery and development of new drugs for leishmaniasis treatment, once this screening is composed of multiple steps and its process can be quite time consuming (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009). When it is assumed that the molecule has been synthesized to act directly on the parasite, a crucial step is to evaluate molecule activity on parasite, in vitro (MUYLDER et al., 2011). A classical method for new molecules screening on promastigotes is parasite counting in a Neubauer's chamber, considering flagellar motility to determine if parasite is viable or not. Although this method is easy to implement and inexpensive, it is known to be poorly reproducible, non-sensitive and laborious, since the results of counting may vary according to executor's experience. In addition, flagellar motility may not be sufficient to determine whether the parasite is viable or not, and when one is faced with several compounds to test, parasite counting in a Neubauer's chamber can take a lot of time (GUPTA; NISHI, 2011; MUYLDER et al., 2011; RODRIGUEZ; TARLETON, 2012). Reporter genes are among the most recent approaches used as an alternative to improve the efficiency of drug screening. Gene reporter is a term used to designate one that produces a

phenotype readily measurable and distinguishable from non-specific endogenous signal. The use of reporter gene technology in genetically modified parasites has been suggested as an alternative to facilitate drug screening process, since they can produce quantitative data, turning the method faster and reducing manual labor (PULIDO et al., 2012; RODRIGUEZ; TARLETON, 2012). Transfection of protozoa, such as Plasmodium, Leishmania, Trypanosoma and Toxoplasma with constructs containing reporter genes revolutionized studies that sought to understand parasite-host interactions and development of new methods for antiparasitic compounds screening (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009). Several reporter genes and expression vectors are available and have already been reported efficiently in literature, some of them already used in Leishmania sp.: GFP / eGFP, iRFP, RFP, beta-galactosidase, beta-lactamase and luciferase (CALVO-ALVAREZ et al., 2015; DE RYCKER et al., 2013; GUPTA; NISHI, 2011; KHRAIWESH et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; PLOVINS; ALVAREZ, 1994; PULIDO et al., 2012; REIMÃO et al., 2013; ROCHA et al., 2013; SADEGHI et al., 2015). Here we report development of an alternative model for colorimetric drug screening assessment, using *L. amazonensis* or *L. infantum* with high, stable and constitutive beta-galactosidase expression. With this model, it is possible to quantify promastigotes and intracellular amastigotes in an in vitro drug screening against cutaneous and visceral leishmaniasis.

2. Material and Methods

2.1. Parasite and macrophage cultivation

L. amazonensis and *L. infantum* promastigotes (WHOM/00LTB0016 and MHOM/MA/67/ITMAP-263) were grown at 26 ºC in Schneider's medium with 10% fetal calf serum (FCS; Cultilab). For transgenic parasites cultivation, Schneider's medium was supplemented with 2,5 µg/mL hemin (Sigma) and 50 µg/mL hygromycin (Invitrogen).

Murine peritoneal macrophages were obtained according to da Silva et al., 2017. Experimental protocol used in this study was evaluated and approved (approval number 103/2016) by the Ethics Committee on Animal Use of Aggeu Magalhães Institute (IAM/FIOCRUZ, Recife, Brazil), and was performed according to the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Ministry of Science and Technology, Brazil). Peritoneal macrophages and RAW 264.7 cell line were maintained in RPMI 1640 medium, supplemented with 100mg/ml streptomycin (Cultilab), 100 U/ml penicillin (Cultilab) and 10% FCS. These cells were used to intracellular amastigotes obtainment. Macrophages and intracellular amastigotes were maintained at 37ºC and 5%CO_2 atmosphere.

2.2. Cloning procedures and parasites transfection

Beta-galactosidase (Bgal) gene from *E. coli* (LacZ) was amplified by conventional PCR from pSV-β-betagalactosidase plasmid (Promega), using the enzyme Accuprime Taq DNA Polymerase™ (Thermo Fisher Scientific™) and primers flanked by sites for *Nco*I and *Not*I (forward 5' – TCTCCATGGATGCTAGAGGATCCCGTCGTTTTACAACGTC-3' e reverse 5'– CTCGCGGCCGCTTATTTTTGACACCAGACCAAC-3'). Expected PCR product (3075 bp) was purified with *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Helthcare), cloned into pGEM®-T Easy (Promega) cloning vector and sequence identity was confirmed by sequencing.

To express in *Leishmania*, Bgal gene was subcloned between the restriction sites of the enzymes *Nco*I and *Not*I of pLEXSY-Hyg2 (Jena Bio- science) according to manufacturer's instructions. For that, both pLEXSY-Hyg2 and Bgal/pGEMT easy were digested with *Nco*I and *Not*I enzymes (NewEngland BioLabs). Electrophoresis of digestion products was performed in 1% agarose (Invitrogen) gel in 1× TAE (tris- acetate-EDTA) in presence of SYBR™ Green for 50 min, 120 V and fragments of interest were purified and ligated with T4 DNA ligase (NewEngland Biolabs). The ligation mix was used to transform *Escherichia coli* Top10 by heat shock and the transformants were selected on Luria Bertani (LB) medium with ampicillin (100 µg/mL). After clone screening, plasmid extraction was done, followed by digestion with *Swa* I enzyme for linearization. Expression cassette was electroporated using Bio-Rad Gene Pulser Xcell™Electroporation System (BioRad Laboratories) into *L. amazonensis* and *L. infantum* promastigotes (500 µF, 450 V and pulse time 3–5 ms). Transfected cells were selected with 100 µg/mL hygromycin, for clonal and non-clonal selection. All procedures for transfection, recombination and selection of positive Leishmania clones were followed according to plasmid (pLEXSY-Hyg2) manufacturer's instructions.

To confirm correct genomic integration, total genomic DNA was extracted from transfected *Leishmania* sp. promastigotes by DNAzol Reagent (Thermo) and PCR reactions were performed using specific primers for *Leishmania* ssu sequence and hygromycin gene sequence, which were respectively, the ssu reverse primer (F3002) and Hyg forward primer (A3804) (Jena Bioscience). Another PCR reaction was done to confirm the presence of the Bgal gene, using the following primers (forward 5’ – TCTCCATGGATGCTAGAGGATCCCGTCGTTTTACAACGTC-3’ e reverse 5’ – CGAAACCGCCAAGACTG – 3’) and pSV-β-betagalactosidase plasmid was used as positive control.

2.3. Promastigote colorimetric detection

After confirmation of genome integration of the expression cassete, transfected parasites were tested regarding their viability through colorimetric detection. For this, promastigotes were counted and the concentration adjusted for $4x10^8$ cells/mL. Parasites were 2-fold serially diluted in a 96-well plate, until reach the concentration of approximately $7X10^1$ parasites/ well, in a final volume of 100µL of culture medium. To each well were added 50µL of CPRG (Chlorophenol Red-β-D-galactopyranoside) (Sigma) solution (CPRG 500 µM, 0.5% NP-40, in PBS). Plates were incubated at 23ºC for 20 minutes, and read at 570 nm using Multiskan FC (Thermo). Blank reaction wells received same volume of culture medium and CPRG solution only. This experiment was performed in triplicate.

2.4. Intracellular amastigote colorimetric detection

Murine peritoneal macrophage and RAW 264.7 cell line were used to obtain intracellular amastigotes of transfected *L. amazonensis* and *L. infantum*. For this, macrophages were counted and adjusted to the concentration of $4x10^5$ cells/mL, plated in a 96-well plate, in a volume of 200µL and maintained for 2 h, 37ºC and 5% CO_2 for adhesion. Then transfected promastigotes were added at different parasite/macrophage ratios: 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1 and 50:1. Interaction parasite:macrophage was performed for 3 h, 37ºC and 5% CO_2. After that, wells were washed, fresh culture medium was added and plates were incubated at 37ºC and 5% CO_2, for 24, 48 and 72 h. After each time point, some wells were washed and some were not, before addition of CPRG solution, as a protocol variation for CPRG incubation. This experiment was performed in triplicate.

2.5. Amphotericin B assay

To validate and confirm the use of recombinant *L. amazonensis* and *L. infantum* promastigotes and amastigotes in drug screening, a traditional 96-well plate assay with Amphotericin B (AmB) was conducted. Promastigotes were diluted at $1x10^6$ cells/mL in Schneider's medium with 10% FCS. Briefly, cells were incubated in a 96-well plate with AmB (Sigma) in ten different concentrations (0.019-10 µg/mL) for 72 h, at 26ºC. Cells without treatment were used as negative controls. Cell growth was assessed by counting in Neubauer chamber or by CPRG protocol. IC_{50}/72h was determined by regression analysis. Assays were conducted in triplicate.

Intracellular amastigotes, obtained by macrophage infection at 15:1 promastigote:macrophage ratio, were submitted to ten different AmB concentrations (0.0039-2 µg/mL). Three times points were evaluated: 24, 48 and 72 h. After each time point, wells were washed and CPRG protocol followed as described above. This experiment was performed in triplicate.

2.6. Detection by flow cytometry

For use of FDG (Fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside) as beta-galactosidase substrate and subsequent analysis by flow cytometry, an adaptation of Bachy et al. (1999) and Nolan et al.(1988) was performed. Thereby, 100 µL of parasites at 10^7/mL were added in a polystyrene tube and incubated in a water bath (37ºC, 5 min). Then 200µL of 2 mM FDG solution pre-warmed to 37ºC were added and mixed and the tubes incubated again in a water bath (37ºC, 30 min). After incubation, tubes were placed on ice and 1800µL of PBS (with 2% FCS) added. Cells were then kept on ice to avoid degradation of the fluorescein. A total of 20,000 events were analyzed per sample using a FACSCalibur cytometer, and numeric data were processed with Cellquest pro software (both from Becton Dickinson).

2.7. Statistical analysis

Linear regression and significance analysis were done using GraphPad Prism 5.0 software. Data comparing differences between two groups were assessed using Student's t test ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Generation of *L. amazonensis* (LaBgal) and *L. infantum* (LiBgal) expressing beta-galactosidase

To obtain LaBgal and LiBgal strains we cloned the open reading frame of beta-galactosidase gene into the *Leishmania* expression vector (pLEXSY-Hyg2) and transfected the expression cassette in wild-type strains of Leishmania sp. For constitutive gene expression and non-secretion of beta-galactosidase, the gene was cloned into the 5′-*Nco*I e 3′-*Not*I cloning sites of pLEXSY-Hyg2. Integrative cassette linearized with *Swa*I, containing the encoding region, was integrated into the chromosomal 18S rRNA locus (ssu) of Leishmania through homologous recombination (Fig 1A). After clonal and non-clonal selection of LaBgal and LiBgal with hygromycin, expression cassette integration into *ssu* locus of Leishmania was confirmed by PCR using total genomic DNA. A unique and expected product of approximately 1600 bp from bgal gene was observed (Fig. 1B). Fragments of 1100 and 1800 bp were also amplified, corresponding to the correct integration in the 18S rRNA locus. (Fig 1B).

After clonal selection, to observe if transfection led to changes in leishmania growth, we observed the growth kinetics, morphology and motility of both transgenic promastigote species, and compared to the wild type in a time course. Figure 2 shows a slight difference in growth kinetics between the two strains of both leishmania species, but not statistically relevant, thus demonstrating that transfection did not impact parasites growth. In addition, morphology and motility variation were not detected by light microscopy.

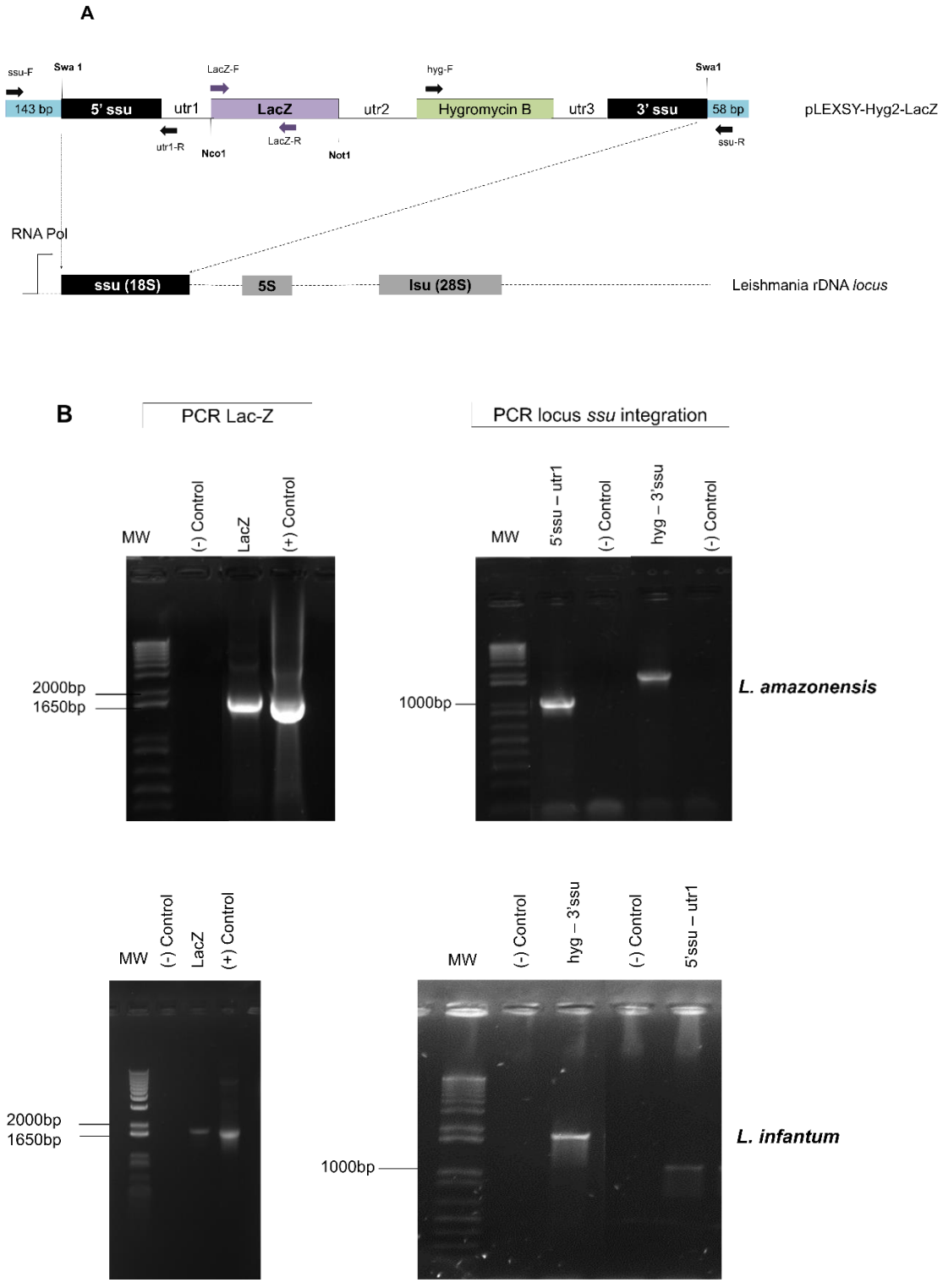


Fig. 1- Cloning strategy and screening of transfected leishmania. (A) Scheme of LacZ cassette organization and its integration into Leishmania's genome. (B) Agarose gels showing specific band of ~1600bp corresponding to a fragment from the LacZ gene. Confirmation of cassette integration in the ssu locus was seen by the presence of specific bands of 1800 and 1100 bp.

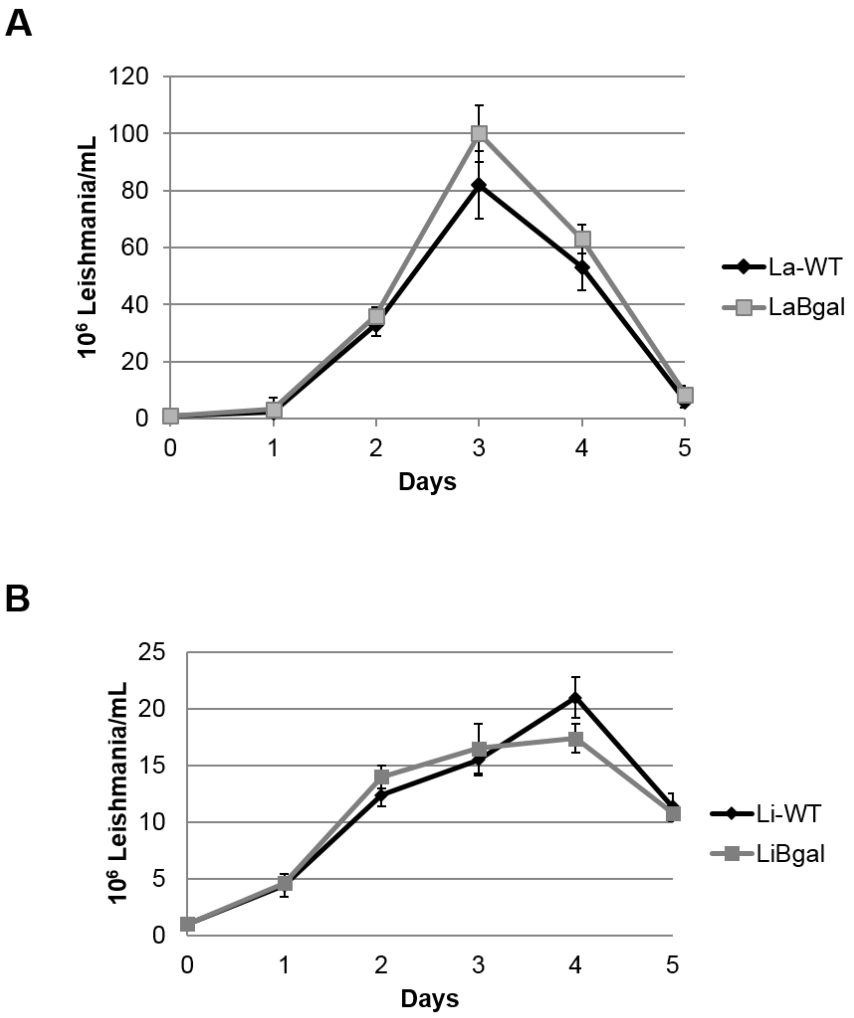


Fig. 2- Growth kinetics of (A) LaBgal X La-WT and (B) LiBgal X Li-WT. Experiment was carried out starting with 10^6 promastigotes parasites at log phase, in duplicate. Results were expressed by mean ± standard deviation. Curves were analyzed by ANOVA.

3.2. Transgenic promastigotes and their use for drug screening assay

By testing various concentrations of parasites per well it was possible to observe the detection limit of colorimetric method. The method was able to detect parasites until the last dilution, (~ 75 parasites/well), with 100 µL of culture medium. Counting this low number of parasites in a Neubauer chamber would be unpractical, since one of the limitations of counting method is due to samples with cell numbers inferior to 10^6. Using the expression vector pLEXSY,

which was designed for integration into chromosomal 18S rRNA (ssu) locus, we achieved a high expression of beta-galactosidase, once the target genes in this locus are transcribed by RNA polymerase I. As the construct was for integration into leishmania genome, unlike what could happen in an episomal transfection, there is little or no variation in expression by the cultured parasites (REIMÃO et al., 2013; ROY et al., 2000). Figure 3 (A and B) shows absorbance curve according to parasites number. Variations in the number of parasites, on the order of 10^8, were not efficiently differentiated by the method, detection limit being below this value, and sufficient for the proposed in vitro assay. On figure 3 it is also possible to observe that the two species obtained similar results. The high amount of enzyme helps the test to be finalized within a short period of incubation (only 20 min), contrary to what is commonly seen in other assays that also use beta-galactosidase, where an incubation over 3 hours is required for reaction (OKUNO et al., 2003; SEEBER; BOOTHROYD, 1996; VEGA et al., 2005). This result corroborates with the main advantage of using reporter genes, which is to obtain large quantity of results, easy to interpret (only absorbance), in a short period of time (RODRIGUEZ; TARLETON, 2012).

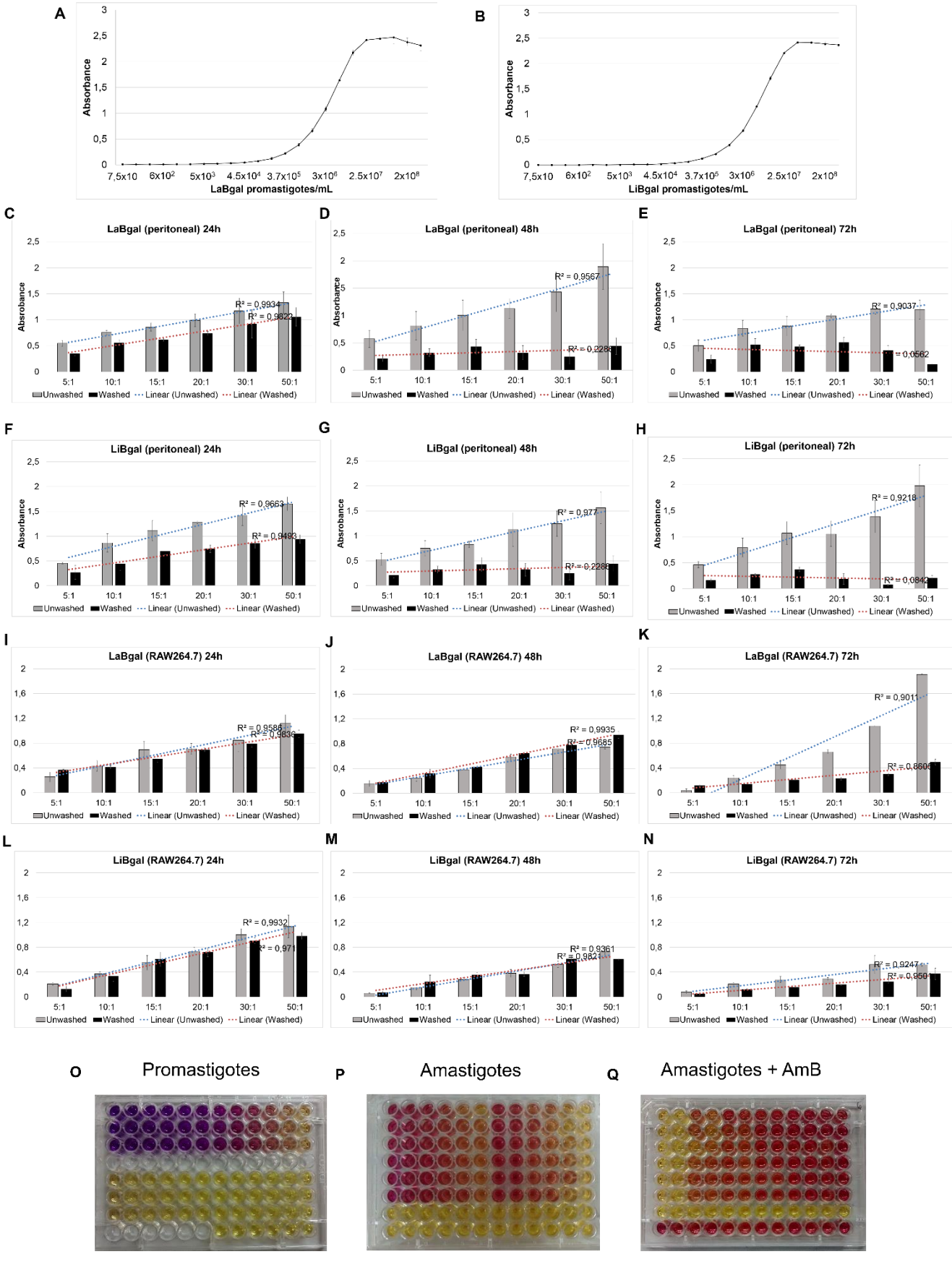

A
Absorbance
LaBgal promastigotes/mL
7,5x10
6x10²
5x10³
4.5x10⁴
3.7x10⁵
3x10⁶
2.5x10⁷
2x10⁸
B
Absorbance
LiBgal promastigotes/mL
C
LaBgal (peritoneal) 24h
R² = 0,9934
R² = 0,9922
D
LaBgal (peritoneal) 48h
R² = 0,9567
R² = 0,2283
E
LaBgal (peritoneal) 72h
R² = 0,9037
= 0,0562
F
LiBgal (peritoneal) 24h
R² = 0,9663
R² = 0,9493
G
LiBgal (peritoneal) 48h
R² = 0,977
R² = 0,2283
H
LiBgal (peritoneal) 72h
R² = 0,9218
I
LaBgal (RAW264.7) 24h
R² = 0,9586
J
LaBgal (RAW264.7) 48h
R² = 0,9935
R² = 0,9685
K
LaBgal (RAW264.7) 72h
R² = 0,9011
L
LiBgal (RAW264.7) 24h
R² = 0,9932
M
LiBgal (RAW264.7) 48h
R² = 0,9361
R² = 0,9824
N
LiBgal (RAW264.7) 72h
R² = 0,9247
Absorbance
5:1
10:1
15:1
20:1
30:1
50:1
Unwashed
Washed
Linear (Unwashed)
Linear (Washed)
O
Promastigotes
P
Amastigotes
Q
Amastigotes + AmB

Fig. 3 - Colorimetric detection of promastigotes and amastigotes expressing betagalactosidase. Graphic showing relation between the number of LaBgal (A) or LiBgal (B) promastigotes and their absorbance in each well. In amastigotes, the correlation between absorbance and number of parasites was linear. C-H: Using peritoneal macrophages; I-N: Using RAW 264.7 macrophage. All experiments were done in triplicate. Results are expressed by mean ± standard deviation. R^2 can be observed on each bar graph. O-Q: Representative image of colorimetric assays. O: Serial dilution of promastigotes. P: Peritoneal (wells 1-6) and RAW 264.7(7-12) macrophages infected with various parasites ratios. The last row of plate (row H) corresponds to blank, containing only macrophages. Q: AmB test in transgenic amastigotes. Columns 1-12 (A-F) correspond to AmB serial dilution. Row G corresponds to blank, containing only macrophages. Row H corresponds to untreated amastigote.

3.3. Intracellular amastigotes and drug screening assay

Using intracellular amastigotes, some protocol variations (such as macrophage type, parasite:macrophage ratio and washing/non-washing of wells prior CPRG solution addition) were performed to validate this assay, considering that this parasite form is the most important, since it is the one found in vertebrate host. We evaluated two types of macrophages widely used in drug testing: peritoneal and RAW 264.7 lineage. We noticed in research routine with leishmania that peritoneal macrophages are easier to infect with leishmania. On the other hand, lineage macrophages remain longer in culture, in addition to not require animals use (SERENO et al., 2007). The idea of evaluating different parasite:macrophage ratios, at various points of time, emerged from the need to evaluate whether the method could capture any amount of parasites present in a well, over three possible incubation times in an experiment. Plates of experiment can be seen in Fig. 3 (O,P and Q). After each time, some wells were washed and some were not, as a protocol variation, so we could evaluate if there are differences in the action of CPRG solution on adhered intracellular amastigotes only (washed wells) compared to the total well content (unwashed wells, where there is, free amastigotes in addition to the amastigotes within the adhered macrophages). It was observed that colorimetric method was efficient for amastigotes detection in both macrophages types, in all parasite:macrophage ratios and in the three tested times. Basal beta-galactosidase production by macrophages, related to cell senescence, did not

disturb the test, therefore, by guarantee, macrophage without infection and under the same conditions were used as a blank in all experiments with amastigotes (Fig 3). Both types of macrophages proved to be useful for this experiment, being RAW lineage more resistant to infection followed by washing, as expected. Absorbances of infected macrophages wells were maintained over time, but, on 48 and 72 h of incubation infected peritoneal macrophages did not resist the washing process releasing from the well and thus changing the correlation between absorbance and parasite number observed in wells without washing and in amastigote with RAW 264.7 lineage (Fig 3 G and H). After 48 and 72 h, there was also a reduction in parasite number in RAW and LiBgal macrophage assays, possibly because of leishmanias phagocytosis by macrophages (Fig 3 M and N). Concentration of CPRG for beta-galactosidase detection may vary from 100mM to 100µM (ANDRIANI et al., 2011; BUCKNER et al., 1996; OKUNO et al., 2003). This concentration was adjusted for all experiments (data not shown) and 500 µM proved to be the most appropriate for this assay, making the test not so expensive (reducing the costs of the test).

3.4. Validation of colorimetric assay with Amphotericin B

To demonstrate that recombinant *L. amazonensis* e *L. infantum* obtained could be used in drug trials, they were tested against AmB, one of the drugs used in leishmaniasis treatment. IC_{50} values were analyzed by t test ($p< 0.05$) and can be observed in Table 1. On promastigotes, it was possible to compare the two methods, (counting and colorimetric) to obtain the calculation of IC_{50} values. For LiBgal, there was no significant difference between IC_{50} values obtained by the two methods (p=0.2572). On the other hand, for LaBgal there was a significant difference (p= 0.0021), which may be related to method limitation due to counting in Neubauer chamber. As seen in Figure 2, *L. amazonensis* has a rapid and efficient growth in culture, resulting in the need for dilution before counting. This process of dilution could lead to errors in results,

thus the colorimetric method is more reliable and without this interference (ROCHA et al., 2013). For intracellular amastigote assay, only colorimetric method was evaluated. At all times, it was possible to perform IC_{50} calculation, with high reproducibility (low values of standard deviation), as observed in Table 1.

	Promastigote		**Amastigote (peritoneal macrophage)**			**Amastigote (RAW macrophage)**		
	IC_{50} 72h Count	**IC_{50} 72h CPRG**	**IC_{50} 24h**	**IC_{50} 48h**	**IC_{50} 72h**	**IC_{50} 24h**	**IC_{50} 48h**	**IC_{50} 72h**
LaBgal	0.78 ± 0.03	1.38 ± 0.02	0.21 ± 0.018	0.17 ± 0.076	0.23 ± 0.067	0.75 ± 0.001	0.99 ± 0.003	0.69 ± 0.15
LiBgal	0.56 ± 0.01	0.61 ± 0.05	0.59 ± 0.005	0.15 ± 0.0007	0.66 ± 0.281	1.29 ± 0.332	0.95 ± 0.004	0.99 ± 0.011

Table 1- IC_{50} values for AmB against LaBgal and LiBgal promastigotes and intracellular amastigotes. Promastigotes of both species were counted in Neubauer chamber and submitted to CPRG solution for a colorimetric assay, in the same experiment. Both methodologies were used to determine IC_{50} (72 h), comparing whether there was difference in results obtained. Intracellular amastigotes assay was performed 3 times and in 2 macrophage lineages.

3.5. Beta-galactosidase detection by flow cytometry

Another alternative for beta-galactosidase detection is using FDG as substrate, followed by analysis by flow cytometry. In this assay, transgenic and wild type parasite were evaluated after incubation with FDG. Cytometry dot plots and histogram are shown in Fig. 4. In analysis of transgenic parasites with

FDG, the displacement of dot plots, as well as histograms, occurred as expected. On LaBgal assay with FDG, it was observed that part of cell population remained unmarked, probably due to the lower penetration of FDG through the parasite membrane. Possibly better absorption of FDG would be observed in a longer incubation time. On the other hand, with LiBgal, the time of 30 minutes was enough to mark 91% of the parasite population. The use of FDG, although it is feasible to obtain data in flow cytometer, it is not interesting to test several compounds, due to its high cost and low stability (NIR et al., 1990; PLOVINS; ALVAREZ, 1994). Considering the particularities appointed for the two methods of detection of beta-galactosidase tested, the colorimetric method seems to be the ideal to attend laboratory routine of new compounds screening for anti-leishmanial activity.

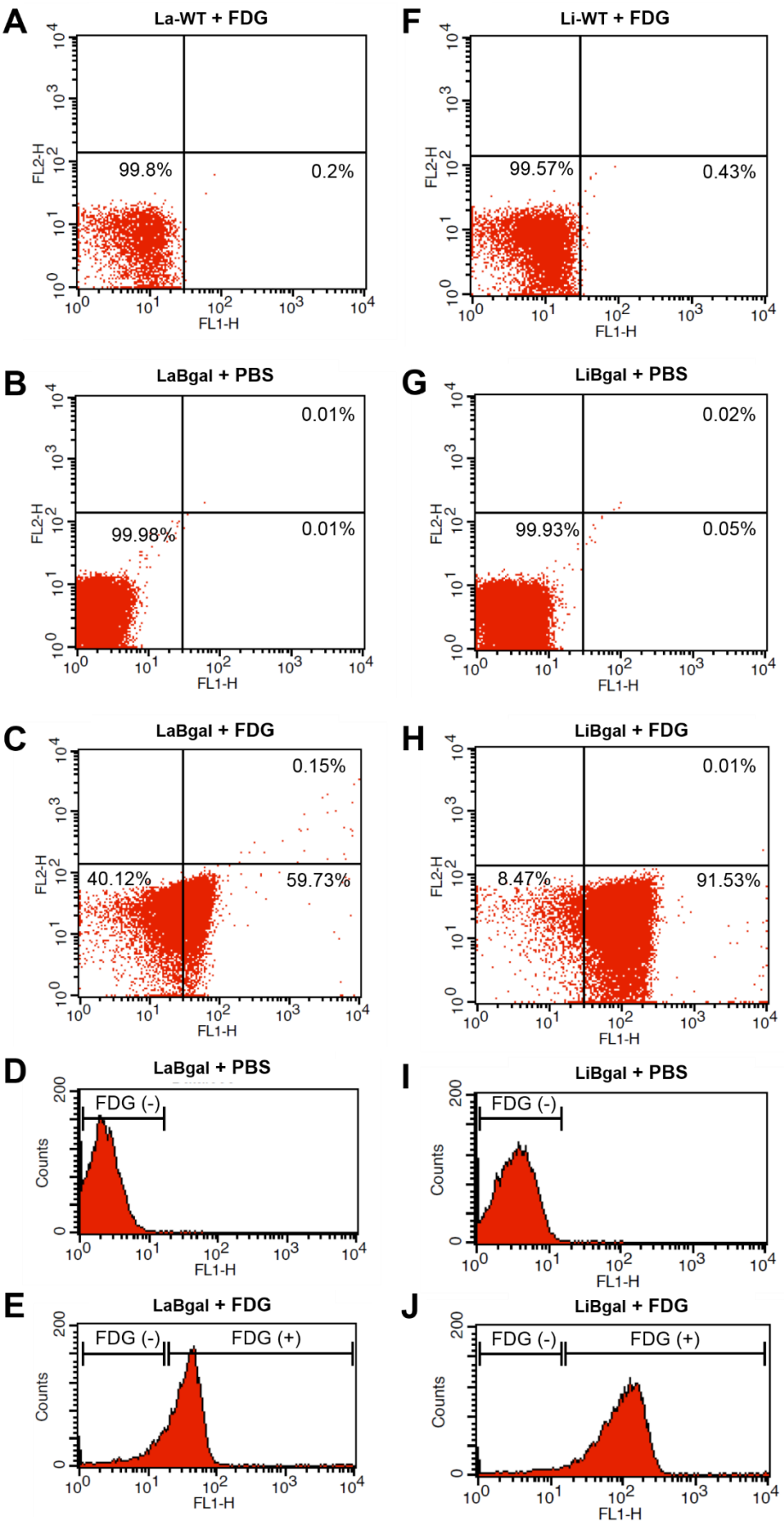

A
La-WT + FDG
99.8%
0.2%
F
Li-WT + FDG
99.57%
0.43%
B
LaBgal + PBS
0.01%
99.98%
0.01%
G
LiBgal + PBS
0.02%
99.93%
0.05%
C
LaBgal + FDG
0.15%
40.12%
59.73%
H
LiBgal + FDG
0.01%
8.47%
91.53%
D
LaBgal + PBS
FDG (-)
I
LiBgal + PBS
FDG (-)
E
LaBgal + FDG
FDG (-)
FDG (+)
J
LiBgal + FDG
FDG (-)
FDG (+)
FL1-H
FL2-H
Counts

Fig. 4 - Leishmania amazonensis and L. infatum representative dot plots and histograms. (A) Dot plot of L. amazonensis wild type FDG. (B) Dot plot of LaBgal with PBS. (C) Dot plot of LaBgal with FDG. (D) Histogram of LaBgal with PBS. (E) Histogram of LaBgal with FDG. (F) Dot plot of L. infantum wild type with FDG. (G) Dot plot of LiBgal with PBS. (H) Dot plot of LiBgal with FDG. (I) Histogram of LiBgal with PBS. (J) Histogram of LiBgal with FDG.

Conclusions

The development of this work allowed us to obtain transgenic *L. amazonensis* and *L. infantum*, constitutively expressing beta-galactosidase. These parasites, once they have demonstrated suitability for use in drug test trials in all experiments conducted, can be used in laboratory routine for research and development of new compounds with leishmanicidal activity against both parasite form: promastigotes and intracellular amastigotes, in a simple, fast and accurate screening method.

Conflicts of interest

Authors hereby declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are thankful to FACEPE, CNPq for financial support and FIOCRUZ for the use of its facilities.

References

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1 / Th2 and Leishmania : paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, p. 17–23, 2005.

ALMEIDA, R. et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1735–1737, 1999.

ANDRIANI, G. et al. Activity in vivo of anti-trypanosoma cruzi compounds selected from a high throughput screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1–6, 2011.

BACHY, M. et al. Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 230, n. 1–2, p. 37–46, 1999.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.

BALANCO, M. D. F. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. n. October, p. 1870–1873, 2001.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis : **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 11, p. 875–888, 2007.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, p. 461–471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarba-zones and their metal complexes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–9, jan. 2004.

BEZERRA DE MENEZES, J. P. et al. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

BOER, M. DEN et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin microbial infect**, p. 1471–1477, 2011.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfecção Leishmania-HIV**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].

BRELAZ, M. C. A et al. Antigenic fractions of Leishmania (Viannia) braziliensis: The immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 4, p. 236–239, 2012.

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

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in Leishmania amazonensis caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC microbiology**, v. 14, p. 236, 2014.

BRYSON, K. et al. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in Leishmania mexicana leads to reduced virulence and a Th1 response. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2971–2978, 2009.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. **Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

CALABRESE, K. S. et al. Ocular experimental leishmaniasis in C57BL/10 and BALB/c mice induced by Leishmania amazonensis infection. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 2, p. 156–61, mar. 2013.

CALVO-ALVAREZ, E. et al. Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2015.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A; RONDÓN, A J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 57, n. 2, p. 279–86, ago. 1984.

CATTAND, P. et al. Chapter 23 Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures : Dengue , Leishmaniasis , and African Trypanosomiasis. In: **Disease Control Priorities in Developing Countries**. [s.l: s.n.]. p. 451–466.

CHAI, Y. et al. Complexation of antimony (SbV) with guanosine 5′-monophosphate and guanosine 5′-diphospho-D-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2257–2263, 2005.

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

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1478–83, 2011.

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

D'AIUTO, L. et al. Human IL-12 p40 as a reporter gene for high-throughput screening of engineered mouse embryonic stem cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 52, 2008.

DA SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against L. amazonensis. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 57–65, 2017.

DE 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**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

DE OLIVEIRA CARDOSO, F. et al. Immunopathological studies of Leishmania amazonensis infection in resistant and in susceptible mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 12, p. 1933–40, 15 jul. 2010.

DE RYCKER, M. et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular Leishmania donovani assay with an axenic amastigote assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2913–2922, 2013.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 192–198, 2002.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1471–7, out. 2011.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–61, mar. 2005.

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

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.

DOS SANTOS COSTA, S. et al. Use of in vivo and in vitro systems to select leishmania amazonensis expressing green fluorescent protein. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 4, p. 357–364, 2011.

DU, X. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Most**, p. 2695–2707, 2002.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

ENGEL, B. J. C. et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental. **Survival**, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

EUSTICE, D. et al. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. **Biotechniques**, v. 11, n. 6, p. 739–40, 1991.

FINCH, R. A. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983–91, abr. 2000.

FREITAS, M. L. DE et al. Effects of butane-2 , 3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage induced by cadmium in mice. v. 37, n. 5, p. 899–910, 2012.

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

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**, v. 8, n. 10, p. 1338–43, out. 2008.

GOMES, L. I. et al. Experimental Parasitology Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 175–179, 2012.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Cochrane Library**, n. 6, 2012.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–33, maio 2010.

GREEN, S. J. et al. Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunology Letters**, v. 43, n. 1–2, p. 87–94, dez. 1994.

GREENBAUM, D. C. et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 12, p. 3212–9, 3 jun. 2004.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **Indian J Med Res**, v. 133, n. January, p. 27–39, 2011.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, n. 2015, p. n/a-n/a, 2015.

HENG, M. P. et al. Synthesis of a DNA-targeting nickel (II) complex with testosterone thiosemicarbazone which exhibits selective cytotoxicity towards human prostate cancer cells (LNCaP). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 360–372, 2015.

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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 9, p. 4819–4825, 2000.

HOLZMULLER, P. et al. Nitric Oxide-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania amazonensis Amastigotes Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in Leishmania amazonensis Amastigotes. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 3727–3735, 2002.

JACOBSON, R. L. Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 3, p. 247–258, 2011.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **Current**, 2012.

KARP, C. L.; AUWAERTER, P. G. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 9, p. 1208–1213, 2007.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 5, p. 599–614, jan. 2009.

KHRAIWESH, M. et al. Antileishmanial activity of compounds derived from the

medicines for malaria venture open access box against intracellular leishmania major amastigotes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 340–347, 2016.

KORHONEN, R. et al. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. v. 2, p. 471–479, 2005.

KULKARNI, M. M. et al. Design of protease-resistant pexiganan enhances antileishmanial activity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1971–1976, 2014.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.

LAURA, O.; ALMEIDA, S. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years : a systematic. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.

LESSA, J. A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 30, n. 2, p. 372–380, fev. 2011a.

LESSA, J. A. et al. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1729–1739, 10 set. 2011b.

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**, v. 352, n. 1359, p. 1311–1315, 1997.

LIÑARES, 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**, v. 13, n. 3, p. 335–60, jan. 2006.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: A controlled trial using killed Leishmania (Leishmania) amazonensis vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 73–78, 2002.

MAKALA, L. H. C.; BABAN, B. Novel Therapeutic Approaches to Leishmania Infection. In: **Intech**. [s.l: s.n.]. p. 1–30.

MARCELLO, M. W. Apoptosis and apoptotic mimicry : the Leishmania connection. **Trends in Parasitology**, p. 1653–1659, 2010.

MARINHO, F. D. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo**

Cruz, v. 106, n. 4, p. 507–9, jun. 2011.

MARU, A.; JACKSON, S. K. Opposite effects of interleukin-4 and interleukin-10 on nitric oxide production in murine macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 5, n. 2, p. 110–2, 1996.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy , immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment Imunoterapia , imunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. 1–10, 2009.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis : A Review. p. 9–19, 2009.

MOREIRA, M. E. C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay : recognition and consequences in different cell systems. v. 76, p. 93–115, 2004.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, p. 375–381, 2004.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

MUYLDER, G. DE et al. A Screen against Leishmania Intracellular Amastigotes : Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **Screening**, v. 5, n. 7, 2011.

NATEGHI ROSTAMI, M. et al. CD8+ T cells as a source of IFN-γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. e845, jan. 2010.

NEW, D. C.; MILLER-MARTINI, D. M.; WONG, Y. H. Reporter gene assays and their applications to bioassays of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 439–448, maio 2003.

NIR, R. et al. Flow cytometry sorting of viable bacteria and yeasts according to ??-galactosidase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3861–3866, 1990.

NOLAN, G. P. et al. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of Escherichia coli lacZ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 8, p. 2603–7, 1988.

O'NEAL, S. E. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of

and immune response to Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 1, p. 142–148, 2007.

OKUNO, T. et al. Applications of recombinant Leishmania amazonensis expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 109–118, 2003.

OLIVEIRA, J. C. et al. In vivo near-infrared fluorescence imaging of Leishmania amazonensis expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 189–195, 2016.

OLLIARO, P. et al. More efficient ways of assessing treatments for neglected tropical diseases are required: innovative study designs, new endpoints, and markers of effects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1545, jan. 2012.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 595–602, 2010.

ORD, L. et al. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 325–329, 2007.

OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66 Suppl 3, p. iii87-i90, 2007.

PACCA, C. C. et al. Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, mar. 2017.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with Leishmania mexicana and Leishmania amazonensis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3705–10, 1 out. 2003.

PASSERO, L. F. D. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of Leishmania (Viannia) shawi. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 159–65, jun. 2010.

PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos , tratamento e profilaxia. **Informa**, v. 16, p. 79–82, 2004.

PLOVINS, A.; ALVAREZ, A. M. Use of Fluorescein-Di-3-D-Galactopyranoside (FDG) and C12- FDG as Substrates for 13-Galactosidase Detection by Flow Cytometry in Animal , Bacterial , and Yeast Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4638–4641, 1994.

PULIDO, S. A et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter

system in Leishmania spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. **Acta tropica**, v. 122, n. 1, p. 36–45, abr. 2012.

PUPKIS, M. F.; COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of Leishmania mexicana mexicana amastigotes and promastigotes. **Journal of general microbiology**, v. 130, n. 9, p. 2375–2383, 1984.

RAI, A. K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

REIMÃO, J. Q. et al. Parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 2, p. 95–101, maio 2013.

REINER, S. L. et al. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 2, p. 447–56, 1 fev. 1994.

REIS, L. D. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 81, p. 103–115, 2006.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Review Literature And Arts Of The Americas**, 2007.

REZVAN, H. Evaluation of Different Approaches in Leishmania Diagnosis. **Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.**, v. 2, n. 2, p. 238–261, 2014.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 31, n. 1, p. 143–8, jan. 1998.

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

ROCHA, F. J. S. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 2007.

ROCHA, M. N. et al. An alternative in vitro drug screening test using Leishmania amazonensis transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 3, p. 282–291, 2013.

RODRIGUEZ, A.; TARLETON, R. L. NIH Public Access. **Nano**, v. 6, n. 9, p. 2166–2171, 2008.

RODRIGUEZ, A.; TARLETON, R. L. Transgenic parasites accelerate drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 90–92, 2012.

ROGERS, M. E. The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, p. 1–13, 2012.

ROJAS, R. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human Leishmania (Viannia) infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p. 1375–1383, 2006.

ROY, G. et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying Leishmania spp. infections in macrophages and in animal models. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 195–206, 2000.

SADEGHI, S. et al. In vitro infectivity assessment by drug susceptibility comparison of recombinant Leishmania major expressing enhanced green fluorescent protein or EGFP-luciferase fused genes with wild-type parasite. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 4, p. 385–394, 2015.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775–787, 2008.

SALVIONI, O. D.; SANDER, M. G.; GÓMEZ, C. Molecular Detection of Leishmania infantum in Atypical Cutaneous Lesions from Paraguayan Patients. **Journal of Dermatology and Clinical Research**, v. 5, p. 3–5, 2017.

SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against leishmania infantum and leishmania braziliensis species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 387–397, 2012.

SANTIAGO, E. D. F. et al. Evaluation of the Anti- Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

SAYONARA, D. M. V. et al. In vitro and in vivo evaluation of quinones from Auxemma oncocalyx Taub. on Leishmania braziliensis. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 132–139, 2015.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. TH17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 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**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SCHRODER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of Leishmania mexicana Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

SCOTT, P. A.; FARRELL, J. A. Y. P. 1 . Nonspecific Immunodepression in BALB / c Mice Infected with Leishmania fropica ’. **Journal Of Immunology**, n. 2, 1981.

SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. Escherichia coli β-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii. **Gene**, v. 169, n. 1, p. 39–45, 1996.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Phytomedicine Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.

SERENO, D. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania infantum Amastigotes. v. 45, n. 7, p. 2064–2069, 2001.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 3–7, 2007.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 233–44, mar. 2006.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Protease de Leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, jun. 2012.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide : correlation with antimony therapy and TNF- a production. n. Cl, 2010.

STEBUT, E. VON. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European journal of dermatology**, v. 17, n. 2, p. 115–122, 2007.

T G EVANS, L THAI, D. L. G. AND J. B. H. J. NEffect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasiso Title. **The Journal of Immunology**, v. 151, 1993.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases**, v. 15, p. e525-32, ago. 2011a.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-32, ago.

2011b.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–94, mar. 2010.

VECCHIO, M. DEL et al. Interleukin-12 : Biological Properties and Clinical Application. v. 12, n. 14, p. 4677–4685, 2007.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. Volume 16(, p. 97–101, 2003.

VEGA, C. et al. A new pharmacological screening assay with Trypanosoma cruzi epimastigotes expressing ?-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, n. 4, p. 296–298, 29 mar. 2005.

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

WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the. n. March, p. 22–26, 2010.

WHO. **Leishmaniasis Fact Sheet**, 2015.

ZALDINI, M. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7826–7835, 2010.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, J. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. **International journal of inflammation**, p. 1–12, 2014.

ZANDBERGEN, G. VAN et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. v. 103, n. 37, 2006.

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

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. p. 124–128, 2004.

6 DISCUSSÃO

A química medicinal tem colaborado para a geração de modificações estruturais em moléculas, visando obter derivados. E essa tem sido uma abordagem bem sucedida para a concepção de novos fármacos, baseados em alvos moleculares conhecidos e validados em parasitas (LIÑARES; RAVASCHINO; RODRIGUEZ, 2006; MONZOTE, 2009).

O conhecimento sobre a ação físico-química e estrutural sobre o alvo fornecem evidências sobre o grupo farmacóforo inicial. Assim, compostos derivados podem ser obtidos, objetivando o aumento de sua atividade, modulando características tóxicas e sua farmacocinética. Esta abordagem em conjunto com as ferramentas da bioinformática criam possibilidades de avaliação *in silico* de potenciais drogas (MONZOTE, 2009).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade de sete produtos sintéticos, derivados da estrutura da tiossemicarbazona sobre macrófagos peritoneais de camundongo, promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* selvagens. Em paralelo, desenvolvemos e validamos o uso de duas linhagens transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando a enzima beta-galactosidase para ensaios de triagem de novos compostos com atividade leishmanicida.

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 mecanismo de ação conhecidos (GREENBAUM et al., 2004; ZALDINI et al., 2010).

A análise da citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos de camundongos foi realizada, considerando-se que um dos principais critérios no desenvolvimento de novos compostos com atividade leishmanicida é que, além da atividade sobre o parasita em baixas quantidades, os mesmos não apresentem toxicidade a células de mamíferos, demonstrando seletividade

para o parasita (LIÑARES; RAVASCHINO; RODRIGUEZ, 2006). Alguns compostos nas concentrações analisadas não apresentaram toxicidade sobre os macrófagos peritoneais.

A atividade dos compostos sobre promastigotas do parasita permitiu determinar os valores de IC_{50}. O composto TS04, com a presença de flúor em sua estrutura, apresentou valor de IC_{50} elevado, comparando-se aos demais. A baixa toxidade dos compostos em relação às células de mamíferos teve um reflexo direto nos valores do índice de seletividade (ISe), ou seja, os compostos foram mais seletivos para os parasitas do que para as células de mamífero.

A presença de éter (TS03) e dicloro (TS07) reduziram os valores de IC_{50}, enquanto que os compostos com a substituição por flúor (TS04) e fenil (TS02), mostraram-se menos eficaz contra o parasita.

Os valores de IC_{50} obtidos para a forma amastigota foram maiores que para as promastigotas, demonstrando maior atividade dos compostos para esta última. Entretanto, deve ser levado em consideração que a ação sobre a forma amastigota é dificultada pela necessidade de permeação do composto através da membrana do macrófago e do vacúolo parasitóforo antes de chegar ao parasita, além da possibilidade da ocorrência de metabolização do composto pelos próprios macrófagos, reduzindo sua atividade (MUYLDER et al., 2011).

Os compostos mais seletivos para promastigotas e amastigotas foram TS03 e TS04, respectivamente. A presença de halogênio no composto TS04 possivelmente colaborou com essa maior atividade. 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 seriam as enzimas cisteína protease do parasita. TS05, TS06 e TS07 também possuem halogênios em sua estrutura e apresentaram baixos valores de IC_{50} em comparação a outros compostos que não possuíam essa estrutura.

Trabalho realizado por Greenbaum et al. (2004b) demonstrou a potente atividade antiparasitária das tiossemicarbazonas, com forte inibição da cisteína protease do parasita e elevação no tempo de sobrevivência de célula infectada com *T. cruzi* e tratada com os compostos.

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*, demonstrando a inibição contra promastigotas em baixas concentrações do composto, a redução do número de amastigotas/ macrófagos e alterações mitocondriais. Ensaios *in silico* também já demonstraram que as tiossemicarbazonas são potentes inibidores de cisteína protease de leishmania (SCHRODER et al., 2013).

No presente trabalho realizamos marcação com anexina-FITC e iodeto de propídio (PI) para verificar possíveis alterações diretamente no parasita, como morte celular por necrose e apoptose.

O composto TS02 causou aumento significativo da marcação com anexina-FITC, caracterizando morte dos parasitas por apoptose. 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 a exposição de fosfatidilserina, redução no volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos na membrana celular, desintegração do núcleo e clivagem do DNA por endonucleases (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 (BALANCO et al., 2001; MARCELLO, 2010; MOREIRA; BARCINSKI, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

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

A apoptose é um processo que pode eliminar as células sem provocar uma resposta imune considerado importante no contexto da patogênese da

leishmaniose. Este processo pode facilitar a sobrevivência do parasita dentro do macrófago (SHAHA, 2006). Porém, há autores que acreditam que a apoptose do parasita seria ideal, justamente por não ativar processo inflamatório, evitando a exacerbação de lesões da leishmaniose cutânea (ZANGGER; MOTTRAM; FASEL, 2002).

Trabalhos publicados, avaliando fármacos utilizados como referência para o tratamento da leishmaniose, tem demonstrado a indução de morte celular por apoptose nos parasitas. Foi demonstrado por Sereno et al. (2001) que a incubação de amastigotas de *L. infantum* com antimonial trivalente (SB-III) leva à indução de morte por fragmentação nuclear de modo parecido com apoptose, com a diferença de não ser mediada por caspases. Foi evidenciada por Marinho et al. (2011) a atividade da Miltefosina sobre promastigotas de *L. amazonensis*, 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).

O composto TS02, além de induzir apoptose, também foi capaz de incorporar o PI significativamente, demonstrando que também é capaz de induzir morte celular por necrose. A necrose possui eventos diferentes da apoptose, resultando em aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana e, por fim, ruptura celular. Durante esse processo, o conteúdo celular é liberado, causando uma reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Os resultados de TS02 mostraram-se bem parecidos 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 episterol, que é um precursor do ergosterol presente na membrana citoplasmática do parasita {Formatting Citation}.

A produção de NO, importante mediador de uma variedade de funções biológicas como citotoxicidade e a defesa contra parasitas, foi mensurada em em macrófagos peritoneais incubados ou não com os compostos.

A incubação dos macrófagos levou ao aumento da produção de NO mediante estímulo com todos os compostos (exceto TS04), sobretudo após 24h. Vários trabalhos relatam a importância do NO sobre o parasita e o curso da infecção. SOUZA et al. (2010b) 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. Foi constatado que parasitas resistentes ao NO causavam maiores lesões, e, numa infecção experimental de macrófagos com esses parasitas resistentes, não houve indução da produção de TNF.

A produção de citocinas, intimamente relacionada à resposta imune do paciente à doença e ao tratamento, foi também analisada neste trabalho. Foi avaliada a influência dos compostos sobre a produção de TNF, IL-12 e IL-10.

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 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 imunorregulador das tiossemicarbazonas já vem sendo demonstrado na literatura, influenciando a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Uma demonstração desse duplo papel das tiossemicarbazonas pode ser visualizado no trabalho de Freitas et al. (2012), onde, após o uso de composto contendo tiossemicarbazona em sua estrutura, foi detectado em camundongos o aumento da produção das citocinas IL-1, IL-6, TNF, IFN-γ e IL-10.

A infecção dos macrófagos com *L. amazonensis* causou um discreto aumento da produção de IL-12, porém não significativo. Por outro lado, com a adição dos compostos TS03, TS05 e TS07, houve o aumento significativo da produção dessa citocina. Mais uma vez a substituição por halogênios, éter 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 TS06. 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 por parte dos macrófagos, 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+ (VECCHIO et al., 2007). 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. 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 (MARU; JACKSON, 1996). 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. A presença da IL-10 em quantidades ora aumentada, ora reduzida reflete mecanismos imunorregulatórios, que são essenciais para a homeostase celular, reforçando assim, o papel regulador da IL-10.

Apesar do 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 teria um papel protetor, bloqueando a ativação de células Th1, podendo prevenir a superprodução das citocinas pró-inflamatórias e, assim, 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 relacionadas com a patogênese da doença. Dessa forma, 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).

Testes tradicionais para avaliação de novos compostos com atividade leishmanicida são bastante laboriosos, exigem bastante tempo e estão sujeitos

a erros de execução quando realizados por pesquisadores pouco experientes, visto que são totalmente dependentes de observação/ contagem de parasitas. Em laboratórios que possuem em sua rotina grande quantidade de novos compostos para teste, o uso de metodologias que exigem a contagem de parasitas torna-se o principal limitante do andamento do trabalho.

Classicamente testes de atividade leishmanicida possuem duas etapas: *in vitro* e *in vivo*. O *in vitro* é realizado nas formas promastigotas e amastigotas dos parasitas, sendo o teste em amastigotas considerado mais importante. Neste ensaio, formas amastigotas intracelulares são submetidas ao tratamento com os compostos. Posteriormente, avalia-se se o composto inibiu ou não seu crescimento em comparação a um controle não tratado (ORD et al., 2007; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2012).

No modelo *in vivo*, camundongos suscetíveis à doença são infectados e tratados com o composto de interesse. Uma das formas de avaliação da eficácia do tratamento é realizada pela determinação da carga parasitária na lesão pelo método de diluição limitante. Dessa forma, a disponibilidade de ferramentas que facilitem e acelerem a obtenção dos resultados são de grande valor (DOS SANTOS et al., 2013; SAYONARA et al., 2015) .

A utilização de genes repórter é uma ferramenta em alta como alternativa do melhoramento de ensaios de seleção de compostos com atividade antiparasitária. A expressão de um gene repórter em *Leishmania* sp. pode ser por dois mecanismos: por DNA plasmidial ou por integração cromossômica do gene de interesse por recombinação homóloga.

A expressão de DNA cromossômico se dá quando o parasita é transfectado com um DNA circular, contendo o gene de interesse e sequências necessárias para sua expressão (REIMÃO et al., 2013). Embora de mais fácil execução, a transfecção episssomal possui algumas desvantagens, como a diferença de expressão da proteína repórter entre os parasitas na cultura, devido à diferença no número de cópias do plasmídeo em cada célula (ROY et al., 2000). Outra desvantagem, é a necessidade de manter a cultura de parasitas sempre em contato com o antibiótico de resistência, para evitar a perda da expressão da proteína repórter. Essa manutenção do uso de

antibiótico de seleção torna uma linhagem com gene episssomal inviável de ser utilizada em modelos in vivo, uma vez que a administração do antibiótico poderia interferir nos resultados obtidos com o composto teste (DOS SANTOS COSTA et al., 2011).

Assim, a transfecção do gene repórter e sua posterior integração por recombinação homóloga é o ideal, e este foi o método utilizado no presente trabalho para a transfecção de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Essa integração acontece quando o cassete, contendo o gene de interesse e de resistência ao antibiótico de seleção, possui nucleotídeos idênticos à região de interesse no DNA do parasita, direcionando a integração do cassete de expressão. O local onde foi realizada a inserção do gene da beta-galactosidase foi a região cromossomal que transcreve o 18S rRNA (locus ssu). Nesse locus o gene é fortemente transcrito pela RNA polimerase I da célula hospedeira.

O plasmídeo escolhido foi o pLEXSY-hyg2, um vetor de *Leishmania,* de expressão constitutiva ou induzida e que permite a inserção do gene de interesse, de uma maneira que a proteína a ser expressa possa ser secretada ou mantida intracelular. A construção foi realizada do modo indicado pelo fabricante para a expressão intracelular e constitutiva, utilizando os sítios de restrição Not I/Nco I.

Os parasitas passaram por seleção clonal, dado a importância de todas células serem originárias de uma comum, o que garante igual expressão da proteína. A absorbância após a adição da solução do substrato CPRG foi quantificada numa curva contendo várias concentrações de parasita, onde foi possível visualizar a correlação entre absorbância e número de parasitas. Além da confirmação com a adição do substrato, a integração do cassete de expressão foi visualizada e confirmada por PCR. Também foi realizada curvas de crescimento, para observar se havia diferença de crescimento entre as linhagens transgênicas e selvagens, bem como variações na morfologia e motilidade. Não foram detectadas diferenças significativas.

Quanto ao limite de detecção do método, em promastigotas, foi possível realizar a detecção de parasitas até a última diluição, onde há aproximadamente 75 parasitas no poço, quantidade impossível de ser

determinada por câmara de Neubauer. A detecção de um número tão baixo de parasitas foi possível devido à alta expressão da beta-galactosidase, alcançada pela região de integração ao genoma do parasita, que é fortemente transcrito pela RNA polimerase I. Também foi observado que variações na quantidade de parasitas na ordem de 10^8 não foram eficientemente detectadas pelo método. Porém, o limite de detecção entre 10^4 e 10^7 é suficiente para atender ao nosso propósito de utilização desses parasitas na rotina de testes de compostos in vitro.

Outro benefício, obtido pela elevada expressão de beta-galactosidase, foi quanto ao tempo de incubação com o substrato para detecção dessa enzima. Apenas 20 minutos são necessários, ao contrário do que é visto na literatura, onde é observada variações de incubação entre 3 e 16 horas (OKUNO et al., 2003; SEEBER; BOOTHROYD, 1996; VEGA et al., 2005). Este resultado corrobora com a principal vantagem de se usar genes repórter: obter grande quantidade de resultados, de fácil interpretação (apenas absorbância), em um curto período de tempo (RODRIGUEZ; TARLETON, 2008).

Os ensaios com amastigotas tiveram variações de protocolo: dois tipos de macrófagos, seis variações na proporção parasitas: macrófago e lavagem ou não dos poços antes da adição do substrato. Em nossa rotina de laboratório, observamos que macrófagos peritoneais são mais fáceis de infectar com leishmania. Por outro lado, o uso de macrófagos de linhagem, além da não utilização de animais, tem como vantagem a manutenção da cultura por mais tempo, (SERENO et al., 2007).

Realizar variações na proporção parasitas:macrófago surgiu da necessidade de avaliar se o método conseguiria captar justamente essa variação na quantidade de parasitas.

Após 24, 48 e 72h, parte dos poços foram lavados e parte não, avaliando-se diferenças de absorbância entre os poços lavados (que teriam apenas amastigotas intracelulares, dentro dos macrófagos que estariam aderidos ao poço) e os poços não lavados (que também possuem amastigotas livre devido ao rompimento de macrófagos).

O ensaio colorimétrico foi eficiente para captar todas as variações realizadas, com os dois tipos de macrófagos e nos três tempos avaliados. A produção basal de beta-galactosidase pelos macrófagos, relacionada à senescência celular, não interferiu no teste. Porém, por garantia macrófagos sem infecção foram utilizados como branco em todos os ensaios com amastigotas. A linhagem RAW se mostrou mais resistente à infecção, tendo resultados melhores que com macrófagos peritoneais após 48 e 72h de infecção.

Também foi realizado o ajuste da concentração de CPRG para os ensaios. Há relatos na literatura que pode variar entre 100µM a 100mM (ANDRIANI et al., 2011; BUCKNER et al., 1996; OKUNO et al., 2003). A concentração padronizada, de 500 µM, torna os ensaios mais baratos.

Nos ensaios com AmB em promastigotas, valores de IC_{50} obtidos para *L. infantum* não apresentaram diferença significativa, comparando-se os métodos colorimétrico e de contagem. Porém em *L. amazonensis*, foi observada diferença significativa, possivelmente devido à necessidade de diluição dos parasitas para realização da contagem em câmara de Neubauer, induzindo à erros e mostrando a superioridade do ensaio colorimétrico, que não necessita de diluição.

Em amastigotas, a AmB foi testada apenas pelo método colorimétrico, devido à impossibilidade do método tradicional, com contagem, nos tempos de 48 e 72h. Em todos os tempos analisados foi possível realizar a determinação da IC_{50}, com alta reprodutibilidade refletida pelos baixos valores de desvio padrão.

Também demostramos a detecção da beta-galactosidase utilizando o FDG, substrato fluorimétrico, seguida pela análise por citometria de fluxo. A utilização de FDG foi apenas demonstrativa, não sendo uma abordagem interessante para o ensaio de avaliação de novos compostos, visto que possui limitações como o elevado custo e baixa estabilidade desse substrato (NIR et al., 1990; PLOVINS; ALVAREZ, 1994).

Portanto, este trabalho além de demonstrar a atividade promissora das tiossemicarbazonas como drogas anti-leishmania com efeitos

imunomoduladores, mostrou, em paralelo o desenvolvimento de duas linhagens transgênicas de Leishmania sp. expressando o gene da beta-galactosidase. Esperamos com a utilização desses parasitas poder contribuir efetivamente para a busca de novos quimioterápicos contra a leishmaniose.

7 CONCLUSÕES

a) Os índices de seletividade encontrados para os compostos analisados demonstraram a baixa toxicidade para macrófagos peritoneais, com elevada seletividade para o parasita;

b) Os compostos analisados apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, inibindo o crescimento da cultura *in vitro*;

c) O composto TS02 foi capaz de causar morte celular compatível com apoptose, além de induzir necrose em promastigotas, com resultados semelhantes à Anfotericina B. Estes efeitos são compatíveis com a resolução da doença e aumento da resposta inflamatória em modelos *in vivo;*

d) Todos os compostos analisados reduziram o índice e o percentual de infecção de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis in vitro,* indicando atividade dos compostos também sobre essa importante forma evolutiva do parasita;

e) O composto TS05 foi capaz de recuperar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados, que havia sido anulada por possíveis mecanismos de escape do parasita;

f) 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;

g) Os compostos TS03, TS05 e TS07 foram capazes de estimular a produção de IL-12, uma citocina chave do perfil Th1;

h) Os compostos TS01, TS03, TS04, TS05 e TS06 foram capazes de inibir a produção de IL-10, favorável para a inibição da resposta Th2;

i) Os resultados demonstram que os compostos derivados da estrutura da tiossemicarbazona são agentes promissores contra *L. amazonensis*, possuindo atividade sobre ambas as formas evolutivas do parasita e atuando na modulação de citocinas importantes;

j) As linhagens transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando a enzima beta-galactosidase se mostraram aptas para serem utilizadas em ensaios in vitro, podendo ser incorporadas à rotina laboratorial de pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com atividade leishmanicida.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1 / Th2 and Leishmania : paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, p. 17–23, 2005.

ALMEIDA, R. et al. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1735–1737, 1999.

ANDRIANI, G. et al. Activity in vivo of anti-trypanosoma cruzi compounds selected from a high throughput screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1–6, 2011.

BACHY, M. et al. Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 230, n. 1–2, p. 37–46, 1999.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.

BALANCO, M. D. F. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. n. October, p. 1870–1873, 2001.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis : **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 11, p. 875–888, 2007.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, p. 461–471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarba-zones and their metal complexes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–9, jan. 2004.

BEZERRA DE MENEZES, J. P. et al. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

BOER, M. DEN et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin microbial infect**, p. 1471–1477, 2011.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfecção Leishmania-HIV**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].

BRELAZ, M. C. A et al. Antigenic fractions of Leishmania (Viannia) braziliensis: The immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 4, p. 236–239, 2012.

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

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in Leishmania amazonensis caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC microbiology**, v. 14, p. 236, 2014.

BRYSON, K. et al. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in Leishmania mexicana leads to reduced virulence and a Th1 response. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2971–2978, 2009.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. **Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

CALABRESE, K. S. et al. Ocular experimental leishmaniasis in C57BL/10 and BALB/c mice induced by Leishmania amazonensis infection. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 2, p. 156–61, mar. 2013.

CALVO-ALVAREZ, E. et al. Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2015.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A; RONDÓN, A J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 57, n. 2, p. 279–86, ago. 1984.

CATTAND, P. et al. Chapter 23 Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures : Dengue , Leishmaniasis , and African Trypanosomiasis. In: **Disease Control Priorities in Developing Countries**. [s.l: s.n.]. p. 451–466.

CHAI, Y. et al. Complexation of antimony (SbV) with guanosine 5′-monophosphate and guanosine 5′-diphospho-D-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2257–2263, 2005.

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

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 1478–83, 2011.

CUNY, R. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania infantum Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7,

p. 2064–2069, 2001.

D'AIUTO, L. et al. Human IL-12 p40 as a reporter gene for high-throughput screening of engineered mouse embryonic stem cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 52, 2008.

DA SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against L. amazonensis. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 57–65, 2017.

DE 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**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

DE OLIVEIRA CARDOSO, F. et al. Immunopathological studies of Leishmania amazonensis infection in resistant and in susceptible mice. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 12, p. 1933–40, 15 jul. 2010.

DE RYCKER, M. et al. Comparison of a high-throughput high-content intracellular Leishmania donovani assay with an axenic amastigote assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2913–2922, 2013.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, n. 3, p. 192–198, 2002.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1471–7, out. 2011.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–61, mar. 2005.

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

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59–64, fev. 2013.

DOS SANTOS COSTA, S. et al. Use of in vivo and in vitro systems to select leishmania amazonensis expressing green fluorescent protein. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 4, p. 357–364, 2011.

DU, X. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Most**, p. 2695–2707, 2002.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

ENGEL, B. J. C. et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental.

Survival, v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998.

EUSTICE, D. et al. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. **Biotechniques**, v. 11, n. 6, p. 739–40, 1991.

FINCH, R. A. et al. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 983–91, abr. 2000.

FREITAS, M. L. DE et al. Effects of butane-2 , 3-dione thiosemicarbazone oxime on testicular damage induced by cadmium in mice. v. 37, n. 5, p. 899–910, 2012.

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

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**, v. 8, n. 10, p. 1338–43, out. 2008.

GOMES, L. I. et al. Experimental Parasitology Validation of quantitative real-time PCR for the in vitro assessment of antileishmanial drug activity. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 175–179, 2012.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Cochrane Library**, n. 6, 2012.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–33, maio 2010.

GREEN, S. J. et al. Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunology Letters**, v. 43, n. 1–2, p. 87–94, dez. 1994.

GREENBAUM, D. C. et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 12, p. 3212–9, 3 jun. 2004.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **Indian J Med Res**, v. 133, n. January, p. 27–39, 2011.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, n. 2015, p. n/a-n/a, 2015.

HENG, M. P. et al. Synthesis of a DNA-targeting nickel (II) complex with testosterone thiosemicarbazone which exhibits selective cytotoxicity towards human prostate cancer cells (LNCaP). **Spectrochimica Acta Part A:**

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 150, p. 360–372, 2015.

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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 9, p. 4819–4825, 2000.

HOLZMULLER, P. et al. Nitric Oxide-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania amazonensis Amastigotes Nitric Oxide-Mediated Proteasome-Dependent Oligonucleosomal DNA Fragmentation in Leishmania amazonensis Amastigotes. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 3727–3735, 2002.

JACOBSON, R. L. Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 3, p. 247–258, 2011.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **Current**, 2012.

KARP, C. L.; AUWAERTER, P. G. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 45, n. 9, p. 1208–1213, 2007.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 5, p. 599–614, jan. 2009.

KHRAIWESH, M. et al. Antileishmanial activity of compounds derived from the medicines for malaria venture open access box against intracellular leishmania major amastigotes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 340–347, 2016.

KORHONEN, R. et al. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. v. 2, p. 471–479, 2005.

KULKARNI, M. M. et al. Design of protease-resistant pexiganan enhances antileishmanial activity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1971–1976, 2014.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.

LAURA, O.; ALMEIDA, S. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years : a systematic. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.

LESSA, J. A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 30, n. 2, p. 372–380, fev. 2011a.

LESSA, J. A. et al. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity

against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1729–1739, 10 set. 2011b.

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**, v. 352, n. 1359, p. 1311–1315, 1997.

LIÑARES, 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**, v. 13, n. 3, p. 335–60, jan. 2006.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: A controlled trial using killed Leishmania (Leishmania) amazonensis vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 73–78, 2002.

MAKALA, L. H. C.; BABAN, B. Novel Therapeutic Approaches to Leishmania Infection. In: **Intech**. [s.l: s.n.]. p. 1–30.

MARCELLO, M. W. Apoptosis and apoptotic mimicry : the Leishmania connection. **Trends in Parasitology**, p. 1653–1659, 2010.

MARINHO, F. D. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in Leishmania amazonensis promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507–9, jun. 2011.

MARU, A.; JACKSON, S. K. Opposite effects of interleukin-4 and interleukin-10 on nitric oxide production in murine macrophages. **Mediators of inflammation**, v. 5, n. 2, p. 110–2, 1996.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy , immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment Imunoterapia , imunoquimioterapia e quimioterapia no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. 1–10, 2009.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis : A Review. p. 9–19, 2009.

MOREIRA, M. E. C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay : recognition and consequences in different cell systems. v. 76, p. 93–115, 2004.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, p. 375–381, 2004.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

MUYLDER, G. DE et al. A Screen against Leishmania Intracellular

Amastigotes : Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **Screening**, v. 5, n. 7, 2011.

NATEGHI ROSTAMI, M. et al. CD8+ T cells as a source of IFN-γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. e845, jan. 2010.

NEW, D. C.; MILLER-MARTINI, D. M.; WONG, Y. H. Reporter gene assays and their applications to bioassays of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 439–448, maio 2003.

NIR, R. et al. Flow cytometry sorting of viable bacteria and yeasts according to ??-galactosidase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3861–3866, 1990.

NOLAN, G. P. et al. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of Escherichia coli lacZ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 8, p. 2603–7, 1988.

O'NEAL, S. E. et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to Leishmania braziliensis cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 1, p. 142–148, 2007.

OKUNO, T. et al. Applications of recombinant Leishmania amazonensis expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 109–118, 2003.

OLIVEIRA, J. C. et al. In vivo near-infrared fluorescence imaging of Leishmania amazonensis expressing infrared fluorescence protein (iRFP) for real-time monitoring of cutaneous leishmaniasis in mice. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 189–195, 2016.

OLLIARO, P. et al. More efficient ways of assessing treatments for neglected tropical diseases are required: innovative study designs, new endpoints, and markers of effects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1545, jan. 2012.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 595–602, 2010.

ORD, L. et al. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 325–329, 2007.

OUKKA, M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66 Suppl 3, p. iii87-i90, 2007.

PACCA, C. C. et al. Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 381–387, mar. 2017.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with Leishmania mexicana and

Leishmania amazonensis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3705–10, 1 out. 2003.

PASSERO, L. F. D. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of Leishmania (Viannia) shawi. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 159–65, jun. 2010.

PINHEIRO, R. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos , tratamento e profilaxia. **Informa**, v. 16, p. 79–82, 2004.

PLOVINS, A.; ALVAREZ, A. M. Use of Fluorescein-Di-3-D-Galactopyranoside (FDG) and C12- FDG as Substrates for 13-Galactosidase Detection by Flow Cytometry in Animal , Bacterial , and Yeast Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4638–4641, 1994.

PULIDO, S. A et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in Leishmania spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. **Acta tropica**, v. 122, n. 1, p. 36–45, abr. 2012.

PUPKIS, M. F.; COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of Leishmania mexicana mexicana amastigotes and promastigotes. **Journal of general microbiology**, v. 130, n. 9, p. 2375–2383, 1984.

RAI, A. K. et al. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

REIMÃO, J. Q. et al. Parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool. **Journal of microbiological methods**, v. 93, n. 2, p. 95–101, maio 2013.

REINER, S. L. et al. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 2, p. 447–56, 1 fev. 1994.

REIS, L. D. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 81, p. 103–115, 2006.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Review Literature And Arts Of The Americas**, 2007.

REZVAN, H. Evaluation of Different Approaches in Leishmania Diagnosis. **Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.**, v. 2, n. 2, p. 238–261, 2014.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 31, n. 1, p. 143–8, jan. 1998.

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

ROCHA, F. J. S. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. **Infection**

and Immunity, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 2007.

ROCHA, M. N. et al. An alternative in vitro drug screening test using Leishmania amazonensis transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 3, p. 282–291, 2013.

RODRIGUEZ, A.; TARLETON, R. L. NIH Public Access. **Nano**, v. 6, n. 9, p. 2166–2171, 2008.

RODRIGUEZ, A.; TARLETON, R. L. Transgenic parasites accelerate drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 90–92, 2012.

ROGERS, M. E. The role of Leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, p. 1–13, 2012.

ROJAS, R. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human Leishmania (Viannia) infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p. 1375–1383, 2006.

ROY, G. et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying Leishmania spp. infections in macrophages and in animal models. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 195–206, 2000.

SADEGHI, S. et al. In vitro infectivity assessment by drug susceptibility comparison of recombinant Leishmania major expressing enhanced green fluorescent protein or EGFP-luciferase fused genes with wild-type parasite. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 4, p. 385–394, 2015.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775–787, 2008.

SALVIONI, O. D.; SANDER, M. G.; GÓMEZ, C. Molecular Detection of Leishmania infantum in Atypical Cutaneous Lesions from Paraguayan Patients. **Journal of Dermatology and Clinical Research**, v. 5, p. 3–5, 2017.

SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against leishmania infantum and leishmania braziliensis species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 387–397, 2012.

SANTIAGO, E. D. F. et al. Evaluation of the Anti- Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

SAYONARA, D. M. V. et al. In vitro and in vivo evaluation of quinones from Auxemma oncocalyx Taub. on Leishmania braziliensis. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 132–139, 2015.

SCHMIDT-WEBER, C. B.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. TH17 cells in the big picture of immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 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**, v. 21, n. 5, p.

483–488, 2008.

SCHRODER, J. et al. Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of Leishmania mexicana Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

SCOTT, P. A.; FARRELL, J. A. Y. P. 1 . Nonspecific Immunodepression in BALB / c Mice Infected with Leishmania fropica '. **Journal Of Immunology**, n. 2, 1981.

SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. Escherichia coli β-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii. **Gene**, v. 169, n. 1, p. 39–45, 1996.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Phytomedicine Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.

SERENO, D. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in Leishmania infantum Amastigotes. v. 45, n. 7, p. 2064–2069, 2001.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 3–7, 2007.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 233–44, mar. 2006.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Protease de Leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, jun. 2012.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide : correlation with antimony therapy and TNF- a production. n. Cl, 2010.

STEBUT, E. VON. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European journal of dermatology**, v. 17, n. 2, p. 115–122, 2007.

T G EVANS, L THAI, D. L. G. AND J. B. H. J. NEffect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasiso Title. **The Journal of Immunology**, v. 151, 1993.

TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases**, v. 15, p. e525-32, ago. 2011a.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-32, ago.

2011b.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–94, mar. 2010.

VECCHIO, M. DEL et al. Interleukin-12 : Biological Properties and Clinical Application. v. 12, n. 14, p. 4677–4685, 2007.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. Volume 16(, p. 97–101, 2003.

VEGA, C. et al. A new pharmacological screening assay with Trypanosoma cruzi epimastigotes expressing ?-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, n. 4, p. 296–298, 29 mar. 2005.

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

WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the. n. March, p. 22–26, 2010.

WHO. **Leishmaniasis Fact Sheet**, 2015.

ZALDINI, M. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 7826–7835, 2010.

ZAMBRANO-ZARAGOZA, J. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. **International journal of inflammation**, p. 1–12, 2014.

ZANDBERGEN, G. VAN et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. v. 103, n. 37, 2006.

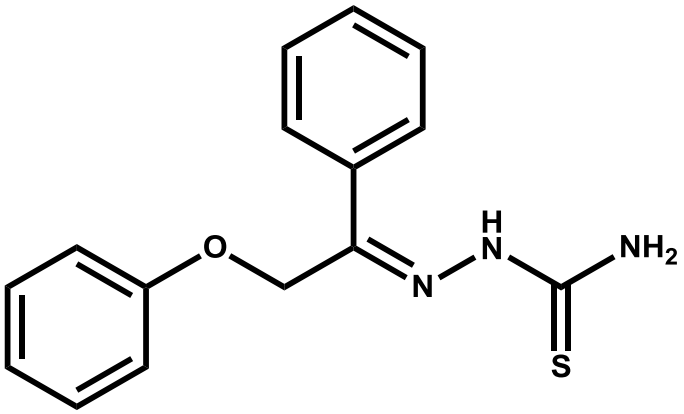
ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation : programmed cell death or necrosis ? p. 1126–1139, 2002.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. p. 124–128, 2004.

APÊNDICE A

Síntese das tiossemicarbazonas.

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

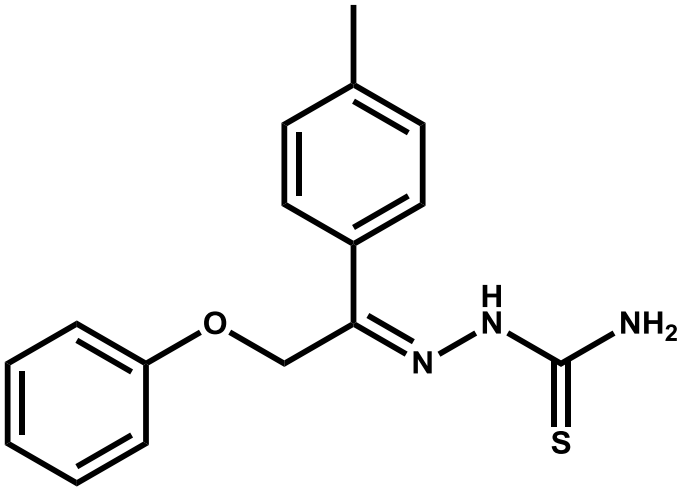


Em um balão de 100 mL foram adicionados 5 mmol (1.1 g) da 2-fenóxi-1-feniletanona, 50 mL de EtOH, 5.2 mmol (0.49 g) da tiossemicarbazida e uma gota de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em agitação magnética em refluxo durante 2 horas. Após esse tempo, o volume do solvente foi reduzido até 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 ºC. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3345 e 3398 (NH_2), 3258 (N–H), 1599 (C=N) cm^{-1} .**RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 5.00 e 5.33 (dois s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.80 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ :** 61.2 (CH_2), 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 $C_{15}H_{16}SON_3$ $[M+H]^+$: 286.1014; encontrado 286.1000.

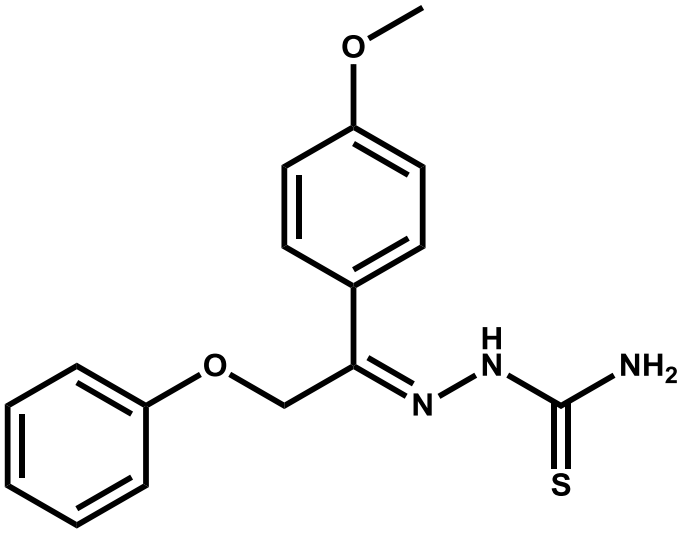
b) 1-[1-(4-Toluil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS-02)



1 mmol (0.23 g) da 1-(4-metilfenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3416 e 3397 (NH_2), 3255 (N–H), 1608 (C=N) cm^{-1} . **RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 2.23 (s, 3H, CH_3), 4.97 e 5.29 (dois s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.74 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 55.2 (CH_3), 61.1 (CH_2), 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.

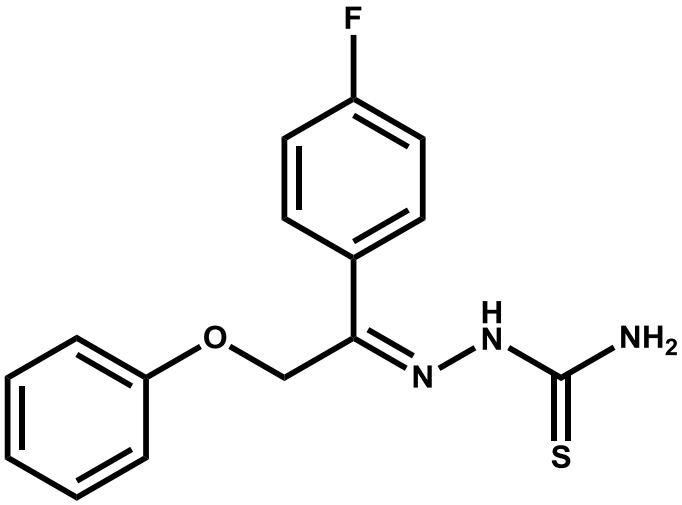
c) 1-[1-(4-Anisil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS-03)



1 mmol (0.25 g) da 1-(4-metóxifenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.5 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3453 (NH_2), 3304 (N–H), 1597 (C=N) cm^{-1}. **RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 3.77 (s, 3H, CH_3), 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.70 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 55.2 (CH_3), 61.3 e 70.5 (CH_2), 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).

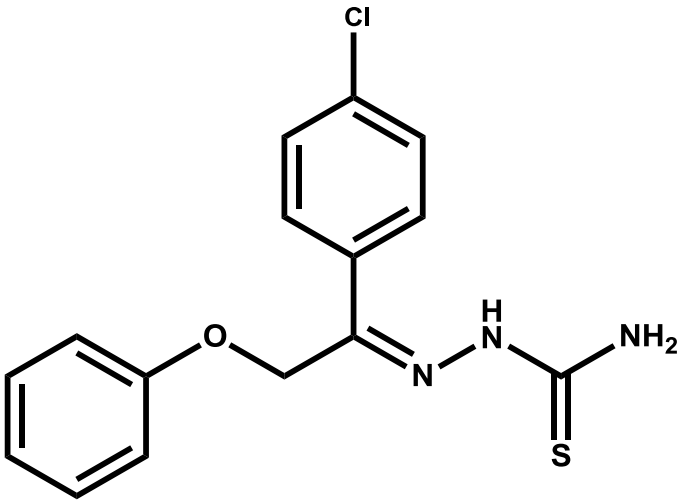
d) 1-[1-(4-Flúorfenil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS-04)



1 mmol (0.29 g) da 1-(4-flúorfenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3413 e 3341 (NH_2), 3243 (N–H), 1601 (C=N) cm^{-1} . **RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 5.31 (s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.79 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 61.6 (CH_2), 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 $C_{15}H_{15}SON_3F$ $[M+H]^+$: 304.0920; encontrado 304.0948. Calculado para $[M+Na]^+$: 326.0739; encontrado 326.0773.

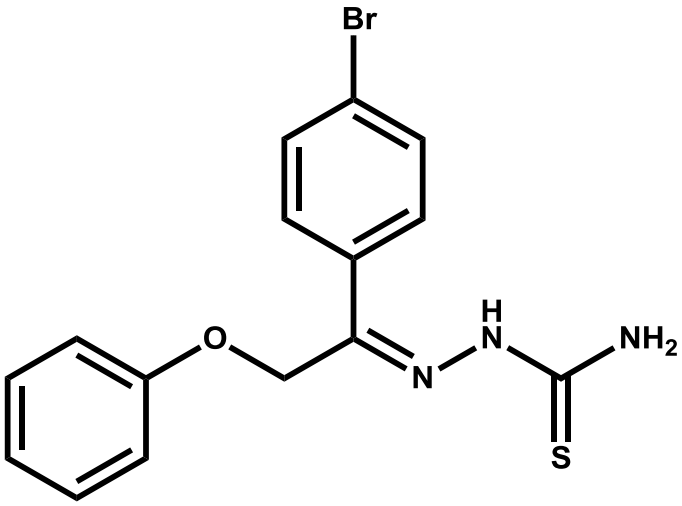
e) 1-[1-(4-Clorofenil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS05)



2 mmol (0.60 g) da 1-(4-clorofenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3420 e 3343 (NH_2), 3252 (N–H), 1596 (C=N) cm^{-1} . **RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 5.31 (s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.85 (s, 1H, NH). Após a adição de D_2O, os sinais com δ em 8.15, 8.49 e 10.85 ppm diminuem. **RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 60.9 (CH_2), 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 $C_{15}H_{15}SON_3Cl$ $[M+H]^+$: 320.0624; encontrado 320.0615.

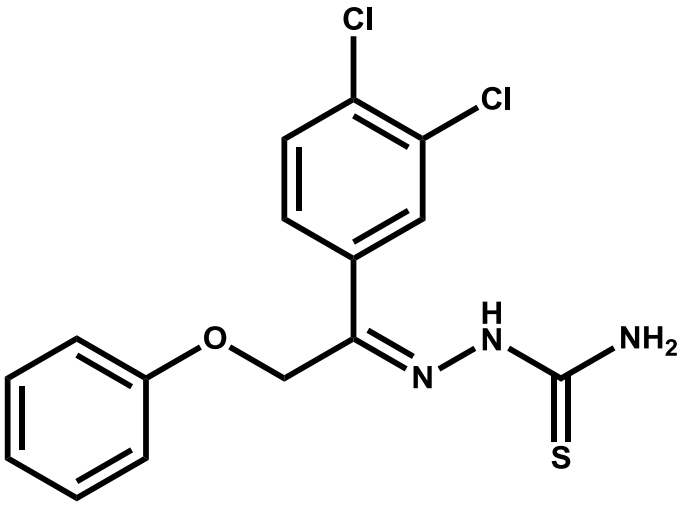
f) 1-[1-(4-Bromofenil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS-06)



1 mmol (0.3 g) da 1-(4-bromofenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.3 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3398 e 3330 (NH_2), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm^{-1}. **RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ:** 4.98 e 5.30 (s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.09 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO-*d*$_6$), δ :** 60.03 (CH_2), 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 $C_{15}H_{15}N_3SOBr$ $[M+H]^+$: 364.0119; encontrado 364.0150.

g) 1-[1-(3,4-*Di*clorofenil)-2-fenóxietilideno]tiossemicarbazida (TS-07)



2 mmol (0.64 g) da 1-(3,4-*di*clorofenil)-2-fenóxietanona, 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 ºC. Rf = 0.4 (tolueno / acetato de etila 7:3). **I.V., principais absorções:** 3398 e 3345 (NH_2), 3257 (N–H), 1599 (C=N) cm^{-1}. **RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6), δ:** 5.32 (s, 2H, CH_2), 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, NH_2), 10.95 (s, 1H, NH). **RMN ^{13}C (75.5 MHz, DMSO-d_6), δ:** 60.7 (CH_2), 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 $C_{15}H_{14}N_3SOCl_2$ $[M-H]^+$: 352.0078; encontrado 352.1129.

ANEXO 1

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa 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 Pes quisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on Febuary 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until Febuary, 2016

Recife (Pe, Brazil) april 16, 2012.

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

Drª. Eridan Medeiros Coutinho
Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Recife, 13 de março de 2017

Carta – Resposta

Projeto nº 103/2016

Ao pesquisador (a): Dra **VALÉRIA PEREIRA HERNANDES**

Informamos que o projeto **"AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA"** proposto por V.Sra. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em 13/03/2017, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente

Sheilla Andrade de Oliveira

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA
Mat. SIAPE 1554975
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br