UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CAMILA MARQUES QUEIROZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DE NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

Recife
2019

CAMILA MARQUES QUEIROZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vitro* DE NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

Tese apresentada ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Parasitologia.

Orientador: Profº Dr. Fabio André Brayner dos Santos - IAM/FIOCRUZ

Coorientadora: Profª Dra. Ana Cristina Lima Leite - UFPE

Recife

2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

Q3a Queiroz, Camila Marques.
Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de leishmania infantum (Nicolle, 1908)/ Camila Marques Queiroz. – 2019.
128 f.: il. tab.

Orientador: Fabio André Brayner dos Santos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmania infantum. 2. Tiossemicarbazona. 3. Tiazól. 4. Piridil-tiazól. I. Santos, Fabio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2019-089)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

CAMILA MARQUES QUEIROZ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE NOVOS COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS FRENTE ÀS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* (NICOLLE, 1908).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 25/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

_____
Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

_____
Profª. Drª. Ana Paula Sampaio Feitosa (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

_____
Profª. Drª. Gláucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

_____
Profª. Drª. Fernanda Carolina Ribeiro Dias (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

_____
Prof. Dr. Thiago José Matos Rocha (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL)

Dedico este trabalho aos meus pais e avós.

Todo o meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que toda honra e glória seja dada a Ti, Senhor. Obrigada pelas oportunidades concedidas, pela capacitação que me destes e que tantas vezes achei não ser capaz. Senhor, muito obrigada por tudo! És a minha Fortaleza.

À minha mãe, minha Mainha, a pessoa mais importante da minha vida, embargam as palavras ao falar de ti e agradecê-la. Obrigada por esse amor incondicional, por ser minha eterna incentivadora, pelo seu esforço para que aqui eu estivesse e permanecesse, por suas orações incessantes, por ser minha luz e o estímulo que me impulsiona a buscar dias melhores. És a presença humana de Deus em minha vida.

Ao meu pai, que com seu exemplo de vida me ensinou que tudo podemos perder, mas o conhecimento é a única dádiva que nunca nos será tirado. Rogo à Deus que sempre me ajude a alegrar teu coração. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus avós, João e Otilina Marques (in memoriam), minhas pérolas raras, meu referencial. Obrigada por tanto amor e por compreender que eu precisava voar em busca de novos horizontes. Fui agraciada por ter feito parte da vida de vocês. São mais que avós, são pai e mãe para mim. Ainda consigo ouvir quando vocês me abençoavam: Deus te abençoe, minha filha! Estarão sempre em meu coração, nunca os esquecerei. Meu amor e gratidão eterna!

À minha família, em especial às minhas tias Lourdes e Elizelda.

Ao meu orientador, Dr. Fábio André Brayner dos Santos, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, pela acolhida, atenção, confiança, amizade e constante incentivo durante todo o trabalho. Ao meu querido Dr. Luiz Alves: você é singular! Obrigada pela sua amizade, pela motivação, puxões de orelha, contribuição e sugestões no transcorrer desses anos. Demos muitas risadas juntos.

À minha coorientadora, Ana Cristina Lima Leite, por disponibilizar os compostos heterocíclicos para a pesquisa.

À Nairomberg, Amanda, Gabriel, Fernanda, Iany, Thaynara, Rubens, Jorge, Olávio, Everton e Elverson e aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Celular pela acolhida, apoio, conversas, risadas e colaboração. Vocês tornaram meus dias mais suaves!

À Paula Roberta por ter se responsabilizado pelas culturas quando eu precisava me ausentar.

À Catarina por todas as vezes que me presenteou com o seu ouvir, aconselhar e se fazer presente nessa minha caminhada.

À Wellington e Jana pela disponibilidade de fotografar meu material da microscopia. À Vanderlan pela ajuda prestada em alguns ensaios.

À Amanda Aliança por ter me ensinado muito do que sei hoje sobre a linha de pesquisa que abordei. Muito obrigada!!

À Ana Paula que não dividiu apenas a morada comigo, mas dividimos muitas alegrias e tristezas. Obrigada por tudo!!

À Tati e Antônio: presentes que a vida trouxe para perto de mim!

À Lizandra por ter me presenteado com sua amizade e carinho!

Aos meus amigos atletas do vôlei de Recife (Everton, Ivyson, Saul e Bruno) e Campina Grande (Edu, Léo, Aloysio, Rufa e as Nizetes). Vocês foram responsáveis pelos mais proveitosos momentos de distração, gargalhadas e, logicamente, boladas. Depois do treino, eu saia com a energia renovada e um sorriso no rosto!

Às minhas amigas da UEPB (Silva, Iara, Maury e Iapoema) obrigada por acreditarem em mim.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por disponibilizar os recursos para a pesquisa.

E aos demais amigos que fizeram e fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta realização. Os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A *Leishmania infantum* corresponde à espécie responsável pela forma mais grave dessa infecção, denominada de Leishmaniose Visceral (LV). Afeta o sistema esplênico e hepático e, quando não tratados, pode levar a óbito em 95% dos casos. Não há vacina humana disponível e o tratamento preconizado é o mesmo há mais de 60 anos, os antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Efeitos colaterais, via de administração e tempo de tratamento reforça o abandono do tratamento que, dessa forma, possibilita o desenvolvimento de cepas resistentes. Compostos heterocíclicos da classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina são estruturas privilegiadas (atuando como fármacos primários) em muitos compostos que são úteis no tratamento de várias doenças, principalmente doenças infecciosas tropicais. No presente trabalho, avaliamos a ação leishmanicida *in vitro* de novos compostos da classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina contra as formas promastigotas de *L. infantum*, a citotoxicidade e níveis de óxido nítrico sobre macrófagos J774. Os compostos mais promissores das classes tiossemicarbazona, tiazól e piridina, seguiram para a análise contra a forma amastigota de *L. infantum*, citotoxicidade e níveis de óxido frente a macrófagos peritoneais, alterações ultraestruturais e os possíveis alvos intracelulares no parasito. Observou-se que o composto JW-16.2, GT-14 e TAP-01, respectivamente às classes citadas acima, se mostraram como os mais potentes das classes testadas. Os compostos testados apresentaram atividade leishmanicida, *in vitro*, contra as formas evolutivas de *L. infantum*, baixa citotoxicidade às células de mamíferos testadas, induziu a produção de ON em relação às células controles de macrófagos não infectados e reduziram a sobrevivência de amastigotas. Por análises qualitativa e quantitativa, confirmando a ação leishmanicida, o composto JW-16.2 também apresentou núcleo picnótico, além de alterações ultraestruturais tais como encurtamento do corpo celular, vacuolização do citoplasma e corpos eletrodensos conforme foi encontrado nos demais compostos analisados. Formas promastigotas tratadas com os compostos e marcadas com iodeto de propídio não apresentaram alteração de suas membranas plasmáticas, porém quando marcadas com rodamina 123, células tratadas com o composto GT-14 apresentaram discreta diminuição de células marcadas, refletindo despolarização da mitocôndria. Mediante o presente estudo, os compostos JW-16.2, GT-14 e TAP-01 possuem atividade leishmanicida e devem formar o alicerce para futuros estudos experimental e clínicos na busca de novos quimioterápicos.

Palavras-chave: *Leishmania infantum.* Tiossemicarbazona. Tiazól. Piridil-tiazól.

ABSTRACT

Leishmania infantum corresponds to the species responsible for the most severe form of this infection, called Visceral Leishmaniasis (LV). It affects the splenic and hepatic system and, when left untreated, can lead to death in 95% of cases. There is no human vaccine available and the recommended treatment is the same for more than 60 years, pentavalent antimonials and amphotericin B. Side effects, route of administration and treatment time reinforce the abandonment of the treatment that, in this way, allows the development of strains resistant. Heterocyclic compounds of the class thiosemicarbazone, thiazol and pyridine are preferred structures (acting as primary drugs) in many compounds that are useful in the treatment of various diseases, especially tropical infectious diseases. In the present work, we evaluated the in vitro leishmanicidal action of new compounds of the class thiosemicarbazone, thiazol and pyridine against promastigotes forms of L. infantum, cytotoxicity and levels of nitric oxide on macrophages J774. The most promising compounds of the thiosemicarbazone, thiazol and pyridine classes were followed for analysis against the amastigote form of L. infantum, cytotoxicity and levels of oxide against peritoneal macrophages, ultrastructural changes and possible intracellular targets in the parasite. It was observed that compound JW-16.2, GT-14 and TAP-01, respectively to the classes cited above, were shown to be the most potent of the classes tested. The compounds tested showed in vitro leishmanicidal activity against the evolutionary forms of L. infantum, low cytotoxicity to the mammalian cells tested, induced ON production in the control cells of uninfected macrophages and reduced the survival of amastigotes. By qualitative and quantitative analysis, the compound JW-16.2 also showed pynotic nucleus, as well as ultrastructural alterations such as shortening of the cell body, vacuolization of the cytoplasm and electrodensity bodies as found in the other compounds analyzed. Promastigote forms treated with the compounds and labeled with propidium iodide showed no alteration of their plasma membranes, but when labeled with rhodamine 123, cells treated with the GT-14 compound showed a slight decrease of labeled cells, reflecting depolarization of the mitochondria. In the present study, compounds JW-16.2, GT-14 and TAP-01 have leishmanicidal activity and should form the foundation for future experimental and clinical studies in the search for new chemotherapeutics.

Key words: *Leishmania infantum*. Thiosemicarbazone. Thiazole. Pyridyl thiazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral..... 19

Figura 2 - Micrografia da Fêmea de flebótomo adulto..... 21

Figura 3 - Esquema do ciclo biológico de *Leishmania* spp..... 23

Figura 4 - Representação esquemática da forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* spp..... 25

Figura 5 - Micrografias de pacientes com Leishmaniose Visceral..... 30

Figura 6 - Estrutura química da Tiossemicarbazona..... 36

Figura 7 - Estrutura química do Tiazól..... 38

Figura 8 - Estrutura química da Piridina..... 39

Artigo 1

Figura 1 Relação bioisostérica entre tiossemicarbazonas e tiazóis..... 56

Figura 2 Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. infantum* e tratados por 24 h com os compostos..... 59

Figura 3 Índice de sobrevivência (Iso) de amastigotas em macrófagos peritoneais infectados por *L. infantum* após 24 h de tratamento..... 60

Figura 4 Efeito hemolítico dos compostos em hemácias de carneiro..... 60

Figura 5 Produção de Óxido Nítrico (ON) por macrófagos peritoneais tratados com os compostos. 62

Figura 6 Eletromicrografias de varredura em promastigotas de *L. infantum* tratadas por 72..... 64

Figura 7 Eletromicrografias de transmissão em promastigotas de *L. infantum* tratadas por 72h. 66

Figura 8 Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos JW-16.2 e GT-14..... 69

Artigo 2

Figura 1 - Estruturas química dos compostos..... 88

Figura 2 - Efeito dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum*..... 90

Figura 3 - Macrófagos peritoneais infectados com promastigotas de *L. infantum* e tratados por 24 h com o composto TAP-01. 93

Figura 4 - Efeito do composto TAP-01 na infecção e sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos..... 93

Figura 5 - Efeito do composto TAP-01 sobre a atividade hemolítica..... 94

Figura 6 - Produção de Óxido Nítrico (ON) por macrófagos peritoneais infectados e não infectados com *L. infantum*..... 96

Figura 7 - Eletromicrografia de varredura em promastigotas de *L. infantum* tratados, por 72 h, pelo composto TAP-01..... 98

Figura 8 - Eletromicrografia de transmissão em promastigotas de *L. infantum* tratados, por 72h pelo composto TAP-01. 99

Figura 9 - Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TAP-01..... 102

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Ação dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e macrófagos J774..... 57

Tabela 2 - Ação dos compostos sobre as formas amastigotas de L. infantum e macrófagos peritoneais. 58

Tabela 3 - Efeito dos compostos JW-16.2 e GT-14 na integridade da membrana plasmática..... 67

Tabela 4 - Efeito dos compostos JW-16.2 e GT-14 na integridade da membrana mitocondrial..... 68

Artigo 2

Tabela 1 - Ação dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e macrófagos J774..... 89

Tabela 2 - Ação do composto TAP-01 sobre as formas amastigotas de *L. infantum* e macrófagos peritoneais. 92

Tabela 3 - Ação do composto TAP-01 na integridade da membrana plasmática..... 100

Tabela 4 - Efeito dos compostos TAP-01 na integridade da membrana mitocondrial..... 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB - Anfotericina B
APCs - Células apresentadoras de antígeno
Arg I - Enzima arginase I
ATP - Adenosina trifosfato
C - Carbono
CaCl - Cloreto de cálcio
CC_{50} - Concentração que causa perda de viabilidade em 50%
CD - Células dendríticas
CO_2 - Gás carbônico
DAT - Aglutinação direta
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ELISA - Ensaio Imunoezimático
EROS - Espécies Reativas de Oxigênio
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
GP63 - Glicoproteína
GTP - Guanosina trifosfato
H - Hidrogênio
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
H_2O_2 - Peróxido de oxigênio
IC_{50} - Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos
IL - Interleucina
iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzida
IFN-γ - Interferon-gama
IS - Índice de seletividade
Iso - Índice de sobrevivência
LDPC - Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LPG - Lipofosfoglicano
LV - Leishmaniose visceral
M1 - Macrófagos ativados
M2 - Macrófagos alternativamente ativados

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

N - Nitrogênio

NaCl - Cloreto de sódio

NAD - Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NADP - Fosfato de Dinucleotídeo de nicotinamida e Adenina

NK Natural Killer

OMS - Organização Mundial de Saúde

ON Óxido Nítrico

OsO_4 - Tetróxido de ósmio

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

RDR - Ribonucleosídeo difosfato redutase

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA Ácido ribonucleico

RPMI - Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

S - Enxofre

Sb^{+3} - Antimonial trivalente

Sb^{+5} - Antimonial pentavalente

SFB - Soro fetal bovino

SFM - Sistema fagocítico mononuclear

T $CD4^{+}$ - Linfócito T auxiliar

T $CD8^{+}$ Linfócito T citotóxico

TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta

Th1- T *helper* 1

Th2 - T *helper* 2

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 Leishmaniose Visceral 18

2.2 Vetor e Ciclo biológico 20

2.3 Biologia Celular dos Trypanosomatideos 23

2.4 Aspectos imunológicos da infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado 27

2.4.1 Óxido Nítrico (ON) 28

2.5 Manifestações Clínicas da LV 29

2.6 Diagnóstico e Tratamento 30

2.7 Derivados Heterocíclicos 35

2.7.1 Tiossemicarbazona 36

2.7.2 Tiazól 37

2.7.3 Piridina 39

3 OBJETIVOS 41

3.1 Geral 41

3.2 Específicos 41

4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA 42

4.1 Derivados heterocíclicos utilizados no tratamento *in vitro* de *L. infantum* 42

4.2 Cultivo de parasitos 42

4.3 Cultura de células de mamíferos 42

4.4 Atividade biológica *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* 43

4.5 Análise da citotoxicidade de derivados heterocíclicos em células de mamífero 45

4.6 Atividade hemolítica 46

4.7 Dosagem de óxido nítrico (ON) em macrófagos 46

4.8 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum* 47

4.9 Avaliação da integridade da membrana plasmática e do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$). 47

4.10 Análise estatística 48

5 RESULTADOS 49

5.1 Artigo 1 - Tiossemicarbazona e tiazól: avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida e ultraestrutural frente à *Leishmania infantum* 49

5.2 Artigo 2 - Avaliação biológica *in vitro* da eficácia de novo composto derivado da classe Piridil-tiazól contra *Leishmania infantum*..... 81

6 CONCLUSÕES 115

REFERÊNCIAS 116

APÊNCIDE A - ARTIGO 1 SUBMETIDO A ACTA TROPICA..... 123

APÊNCIDE B - ARTIGO 1 SUBMETIDO A MICRON.....125

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA ACTA TROPICA.....127

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA MICRON 128

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário de gênero *Leishmania* que são transmitidos pela fêmea do inseto vetor, o flebótomo de gênero *Lutzomyia* (BELO et al., 2013). Essa parasitose acomete, principalmente, indivíduos da África, Ásia e América Latina com incidência estimada em 1 milhão, estando associada à fatores socioeconômicos, ambientais e imunológicos (WHO, 2018), refletindo um sério problema de saúde pública. Existem três formas clínicas de leishmaniose em humanos, dependente da espécie de *Leishmania*: cutânea, mucocutânea e visceral (TIWARI et al., 2018). A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, representa a forma mais agressiva da doença. Afeta o sistema esplênico e hepático e, quando não tratados, pode levar a óbito em 95% dos casos (ALMEIDA et al., 2018). A incidência mundial de LV está estimada em até 90 mil casos, com 90% desses relatados no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018).

A grande dificuldade em desenvolver uma vacina humana eficaz contra esse parasito consiste na complexidade da resposta imune do hospedeiro bem como fatores relacionados à espécie de *Leishmania* (ALMEIDA et al., 2018). Sendo assim, o tratamento das leishmanioses depende, quase exclusivamente, dos quimioterápicos representados pelos antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) (SINGH et al., 2016) e pelo medicamento de segunda escolha, anfotericina B.

Segundo Joshi et al. (2014) os antimoniais pentavalentes direcionados ao tratamento de leishmanioses, frequentemente, produzem efeitos tóxicos e colaterais dependentes de dose e do tempo de tratamento, induzindo a falha na terapia e consequente aumento das formas resistentes de parasitos. Além disso, são dispendiosos e pode necessitar de hospitalização do paciente que precisa de monitoramento, causando perda substancial de renda para as famílias afetadas. Na busca de novos fármacos leishmanicida, que sejam menos tóxicos e eficazes em relação às medicações adotadas, trabalhos vêm demonstrando que compostos derivados da classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina vêm apresentando atividade antitripanossômica (GOMES et al., 2016; BRITA et al., 2015; BRITA et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2014; MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; YEUNG et al., 2010; CHIYANZU et al., 2003).

A partir desse contexto, muitos desafios ainda precisam ser superados incluindo a disponibilidade de um novo medicamento para a leishmaniose. Desta maneira, estudos com novos compostos derivados da classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina podem indicar viabilidade para LV uma vez que já apresentam potencial tripanocida relatado na literatura

(GOMES et al., 2016; DE MELO et al., 2015; CARDOSO et al., 2014; VINTONYAK et al., 2010).

Sendo assim, o presente trabalho se propôs avaliar a ação leishmanicida *in vitro* de novos compostos sintéticos, que ainda não foram testados para espécie *L. infantum*, pertencentes às classes tiossemicarbazona, tiazól e piridina contra as formas evolutivas promastigotas e amastigota, a citotoxicidade sobre células de mamíferos, atividade hemolítica, níveis de óxido nítrico e os possíveis alvos desses novos compostos heterocíclicos esperando poder contribuir para na busca de quimioterápicos efetivos e com baixa toxicidade para LV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

Doenças parasitárias afetam mais de 2 bilhões de pessoas no mundo e são causas frequentes de morbidade e mortalidade, possuindo características comuns em relação ao contexto em que ocorrem como as condições precárias de subsistência (CHANDER et al., 2018; KAPPAGODA et al., 2014).

A leishmaniose é endêmica em 88 países localizados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BARBOSA et al., 2015; JHA et al., 2013) e considerada, primariamente, como zoonoses podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito. É uma doença causada por parasitos classificados no reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania (L)*, subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, os quais são transmitidos através da picada da fêmea do inseto vetor, denominado flebótomo, *Lutzomya* spp. (Novo Mundo) e *Phlebotomus* spp. (Velho Mundo) (TIWARI et al., 2018; ROTTINI et al., 2015).

A infecção em humanos pelo protozoário *Leishmania* pode causar vários quadros clínicos distintos, com acometimento da pele, mucosas das vias respiratórias superiores e vísceras (TEIXEIRA et al., 2013). Aproximadamente 12 milhões de pessoas estão acometidas por leishmaniose com incidência de 700 mil a 1 milhão de casos a cada ano e 310 milhões de pessoas estão sob risco de infecção, constituindo um sério problema de saúde pública (WHO, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente é estimado 600 mil a 1 milhão de casos para leishmaniose cutânea e 50-90 mil casos para LV, esta última com cerca de 20-30 mil óbitos por ano (WHO, 2018).

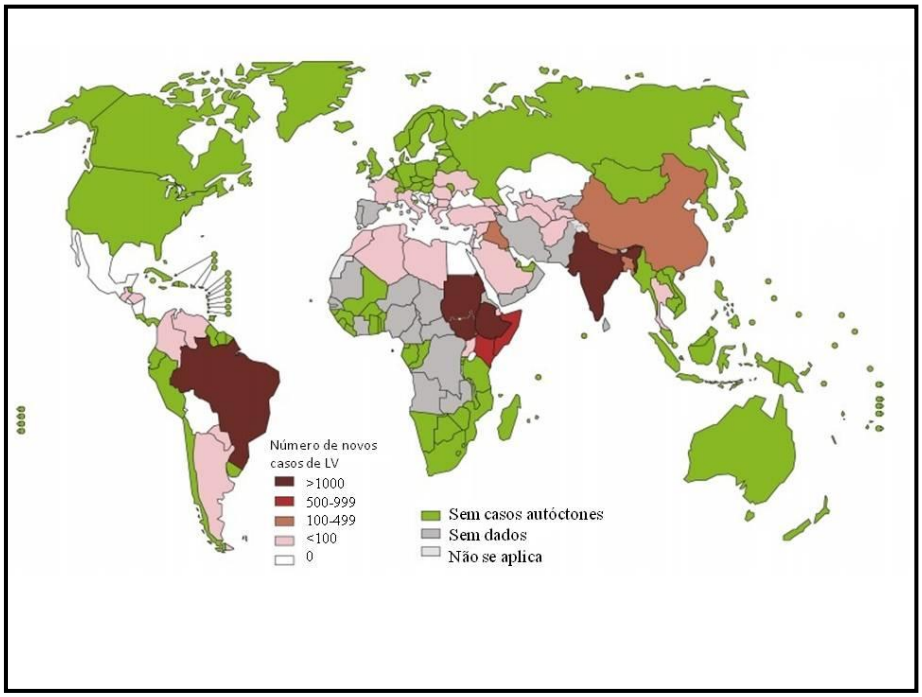
A LV ou calazar é a forma mais grave de leishmaniose envolvendo parasitismo descontrolado no baço, fígado e medula óssea, onde se multiplicam nos macrófagos causando hipertrofia de órgãos (hepatoesplenomegalia) e disfunção (CHANDER et al., 2018; DE FREITAS et al., 2016). E quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 95% dos casos (WHO, 2018). Ganhou notoriedade principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), tornando-se uma infecção oportunista (WHO, 2018; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

A LV é uma doença causada em todo o mundo por parasitos do complexo *Leishmania donovani* (NEVES et al., 2011). Após uma revisão, passou a reunir duas espécies: *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, no entanto vários estudos

imunológicos e genéticos têm demonstrado não haver diferenças suficientes entre *L. infantum* e *L. chagasi* para justificar a separação (SILVA, 2017; SINGH et al., 2016).

Tem ampla distribuição (Fig. 1) ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas. No continente americano, o Brasil representa o país de maior endemicidade para LV, em pelo menos 19 estados respondendo por 96,5% de todos os casos (WHO, 2017; BRASIL, 2014).

Figura 1 - Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2018).

No Brasil, a LV tem uma relevante importância epidemiológica devido à sua ocorrência em várias regiões do país. A espécie prevalente é *Leishmania infantum*. No período entre 1990 e 2016, houve 70.987 casos confirmados com distribuição de 10.912 casos na região Norte, 55.702 casos na região Nordeste, 10.505 casos na região Sudeste, 51 casos na região Sul e 4.571 casos na região Centro-Oeste (BRASIL, 2017).

Caracterizada em processo de transição epidemiológica, devido à sua reemergência, a razão de sua expansão é multifatorial. Entre eles destacam-se o aumento da urbanização em regiões do Nordeste e Sudeste, convívio próximo com o cão, desmatamento acentuado e o aumento do número de vetor são citados para justificar o aumento da incidência da LV no Brasil. Além dos parâmetros citados, outros fatores servem de estímulo para domiciliação do vetor como as questões socioeconômicas e as condições higiênicas sanitárias da população

(WHO, 2018; PEREIRA, 2014). Em muitos países, as infecções por *Leishmania* estão se tornando pandemia, devido à migração de indivíduos assintomáticos e aparecimento de Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC) (TAWARI et al., 2018).

2.2 Vetor e Ciclo biológico

Os hospedeiros invertebrados ou vetores (flebotomíneos) são pequenos insetos da ordem Diptera, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*. Estima-se que entre as mais de 800 espécies de flebotomíneos existentes, apenas 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são de interesse médico com comprovado envolvimento na transmissão de leishmaniose (MAROLI et al., 2013). São insetos de pequeno porte (1 a 3 milímetros), naturalmente silvestres com dois pares de asas com baixa capacidade de batê-las, permitem deslocamento por saltitos, corpo delgado e piloso, revestido por cerdas, são frágeis, de atividade crepuscular ou noturna e apenas as fêmeas são hematófagas, pois esse hábito é necessário para o desenvolvimento ovariano (AFONSO, 2013). Nas Américas a principal espécie transmissora é *Lutzomyia longipalpis*. No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, pois esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2014).

A suscetibilidade ou não ao desenvolvimento de *Leishmania* spp. no flebótomo depende da capacidade do parasito sobreviver, multiplicar e diferenciar-se dentro do trato digestório do vetor, e dessa forma transmitir a doença ao hospedeiro definitivo, o vertebrado (AFONSO, 2013). Esse protozoário apresenta alternância de evolução entre os hospedeiros, apresentando duas formas: promastigotas (extracelulares) e amastigotas (intracelulares). Estas formas refletem as adaptações às mudanças ambientais e as condições enfrentadas dentro de cada hospedeiro (NEVES, 2016).

Figura 2 - Micrografia da Fêmea de flebótomo adulto de gênero *Lutzomyia.*

Fonte: Adaptado de Brasil (2014).

O ciclo evolutivo da *Leishmania* spp. inicia-se quando o vetor, inseto denominado flebotomíneo, faz o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. A fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos infectados com as formas amastigotas e, em seu trato digestivo, estes se rompem liberando o parasito que se aloja em partes do intestino médio, transformando-se na forma promastigota procíclica. No intestino do inseto ocorre diferenciação destas formas em promastigota nectomonas, que permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal, onde ainda se dividem, migram e originam formas curtas denominadas haptomonas. Quando o parasito se aloja na parte posterior do intestino, a espécie pertence ao subgênero *Viannia*, enquanto que a espécie do subgênero *Leishmania* desenvolve-se no intestino médio (AFONSO, 2013). Logo depois, as leishmanias migram para a porção anterior do tubo digestivo onde ocorre a transformação em promastigotas metacíclicas, forma infectante para o hospedeiro vertebrado, 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 formas atingem um estado infectivo (SILVA, 2017). É um processo em que ocorrem alterações nos constituintes de membrana da forma promastigota, como o alongamento da molécula Lipofosfoglicano (LPG) e a ação da glicoproteína (GP63) correspondendo aos principais fatores de virulência do protozoário.

Durante o repasto sanguíneo do vetor, agora infectado, ocorre a transmissão do parasito. Formas promastigotas são regurgitadas através da picada e, após um período de quatro a oito horas, são internalizadas por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro. As moléculas de LPG e GP63 presentes na superfície das formas promastigotas faz com que esta forma seja resistente à ação de lise do sistema complemento e, dessa forma, seja fagocitada por células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). A primeira fagocitose é realizada pelos neutrófilos, pois a inserção da probóscide do vetor no hospedeiro resulta em um pequeno processo inflamatório

localizado com rápido recrutamento de neutrófilos. Estes, posteriormente, são fagocitados após sofrerem apoptose, carreando os parasitos para o interior dos macrófagos sem ativá-los (LIMA, 2018; KAYE ; SCOTT, 2011).

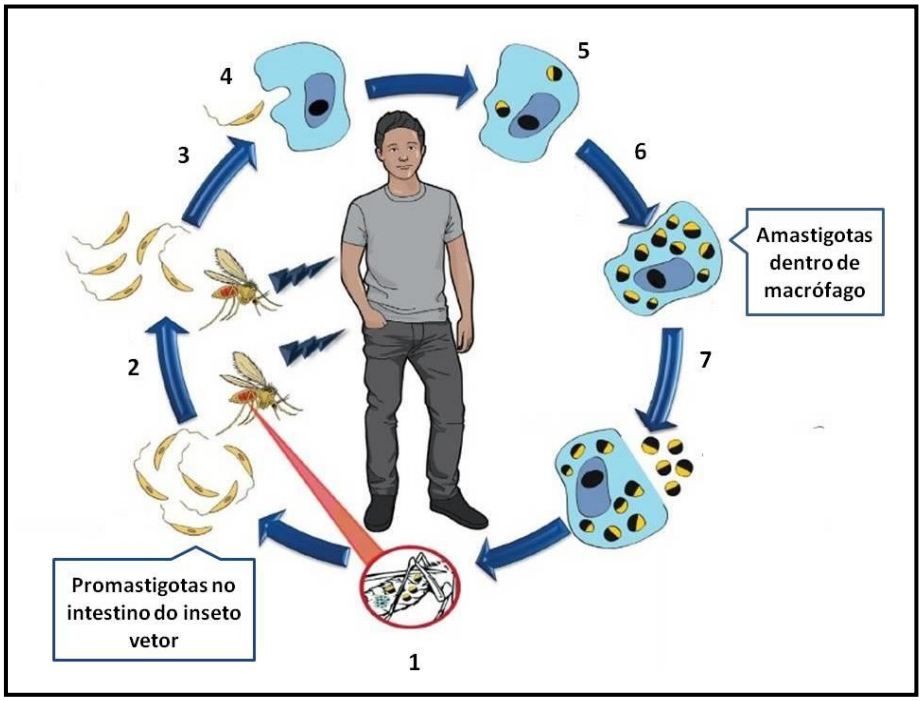
Nos macrófagos infectados, os parasitos habitam fagolisossomos secundários, conhecidos como vacúolos parasitóforos fundido com lisossomos sob ação de enzimas, alteração de pH e temperatura. No interior desses vacúolos, se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária levando as células hospedeiras ao rompimento. Livres, as formas amastigotas infectam rapidamente células adjacentes. Estas se multiplicam e podem ser novamente ingeridas pelo vetor, completando o ciclo (Fig. 3) (KAYE; SCOTT, 2011).

As formas amastigotas de *Leishmania* apresentam mecanismos de escape que controlam e/ou impedem a resposta do sistema imunológico do hospedeiro, a exemplo de expressão de moléculas coestimuladoras, produção de citocinas e quimiocinas, inibição do processo de apresentação de antígenos e inibição de apoptose da célula infectada, o que possibilita sua sobrevivência na célula hospedeira (BOGDAN, 2008).

Na maioria das vezes, os casos de leishmaniose humana são precedidos por casos caninos. Esse fato é fundamentado devido os cães apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele do que o homem, o que favorece a infestação por vetores. Esse fato é fortalecido diante da maior prevalência na população canina do que humana. Logo, os cães são considerados os principais reservatórios de *Leishmania* em ambiente não silvestre, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença (FEITOSA et al., 2000).

A prevenção e o controle da leishmaniose correspondem a uma combinação de estratégias de intervenção, uma vez que a transmissão envolve o hospedeiro vertebrado (humano e/ou animal), o parasito e o flebótomo. A principal estratégia de controle é o diagnóstico precoce e o tratamento imediato, que reduz a transmissão e monitora a disseminação e carga parasitária da doença. O uso de inseticidas, telas nas casas, gestão ambiental e proteção pessoal correspondem às medidas de controle do vetor em áreas endêmicas da parasitose que, dessa forma, também interrompe a transmissão de doenças por diminuir o número de flebotomíneos. O controle de hospedeiros animais é complexo e deve ser adaptado à situação local (WHO, 2018).

Figura 3 - Esquema do ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Zulfiqar et al., 2017.

Legenda: (1) O flebotomíneo infectado, tem em seu intestino médio as formas amastigotas que se transformam em promastigotas procíclicas e, posteriormente, na forma infectante para o hospedeiro vertebrado, promastigotas metacíclicas; (2) estas formas são regurgitadas em um novo repasto do flebotomíneo infectando o homem; (3) as formas promastigotas metacíclicas entram na corrente sanguínea; (4) são reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos; (5) se transformam em amastigotas; (6) multiplicam-se por divisão binária; (7) rompimento da célula e as amastigotas infectam as células vizinhas: macrófagos e células dendríticas.

2.3 Biologia Celular dos Trypanosomatideos

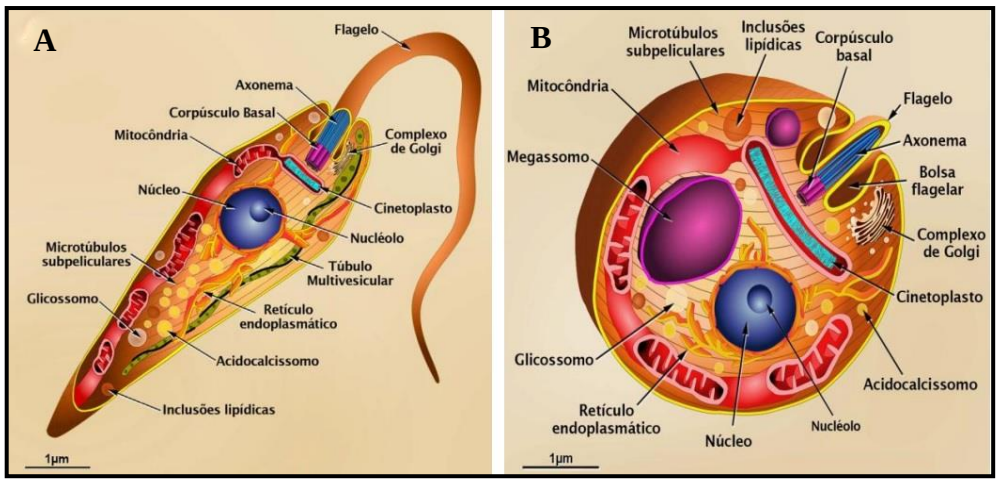
A família Trypanosomatidae é caracterizada por possuir algumas organelas e estruturas, tais como cinetoplasto, citoesqueleto, acidocalcissomas, glicossomos e megassomos (Fig. 4) que desempenham funções relevantes nesses parasitos (ZULFIQAR et al., 2017).

A principal característica dos tripanossomatídeos, quando comparada aos eucariontes superiores, é a presença de uma mitocôndria única que se estende por todo o citoplasma do parasito (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014) e, próximo ao flagelo, possui um complexo arranjo de DNA mitocondrial denominado cinetoplasto, ao qual faz referência à sua ordem Kinetoplastida, com localização perpendicular à base flagelar. O DNA mitocondrial (kDNA) corresponde à 30% da carga genética total do protozoário e divide-se em dois tipos: os

maxicírculos e minicírculos. Estes são funcionalmente semelhantes ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, enquanto àqueles são responsáveis por especificar a edição de RNA nesta organela, correspondendo a uma estimativa de 90% da massa total de DNA mitocondrial (SCHNEIDER, 2001). Segundo Menna Barreto e De Castro (2014), é preciso estar atento para possíveis alterações observadas nessa organela, uma vez que são consideradas alvos mediante tratamento com novas moléculas, pois essas alterações podem não ser resultado da ação das moléculas e sim resultado de efeitos adversos que levaram à inviabilidade celular.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos unicelulares que possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estágios de vida entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. Apresentam duas formas distintas em seu ciclo biológico: as promastigotas que são formas extracelulares, flageladas e móveis, medindo até 15 μm de comprimento, encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores, e as formas amastigotas que são obrigatoriamente intracelulares, sem flagelo livre, imóveis, medindo 5 μm de diâmetro e que são encontradas no interior das células do sistema mononuclear fagocitário, sobretudo, os macrófagos dos hospedeiros mamíferos (CUNHA JUNIOR, 2015). No citoplasma, de ambas as formas, é observado o núcleo grande e arredondado, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, ribossomos, vacúolos, inclusões lipídicas entre outras estruturas (Fig. 4). Em análise de ultraestrutura, é possível visualizar uma rede de microtúbulos subpeculiares dispostos sob a membrana celular, o que possibilita formas bem definidas durante o ciclo de vida desse protozoário.

Figura 4 - Representação esquemática da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013.
Legenda: (A) forma promastigota, (B) forma amastigota de *Leishmania* spp.

A membrana plasmática das células eucarióticas é constituída por fosfolipídios e esfingolipídios que, além de serem responsáveis pelo metabolismo e reconhecimento de células sinalizadoras, são responsáveis pelo transporte e reorganização do citoesqueleto, crescimento e diferenciação, respectivamente (ZHANG; BEVERLEY, 2009). No entanto, a funcionalidade, composição e metabolismo desses lipídios na membrana de *Leishmania* diferem em relação às células de mamíferos e necessitam de mais estudos (ZHANG et al., 2010). O ergosterol é abundante nas membranas de *Leishmania* bem como é sintetizado por células fúngicas (ZHANG et al., 2010). A biossíntese do ergosterol necessita da desmetilação do lanosterol do carbono 4 (C-4). Nessa biotransformação há a participação da enzima 14-α desmetalase (CYP51) do citocromo P450. Algumas enzimas foram estudadas experimentalmente sugerindo que muitas etapas do metabolismo de fosfolipídios e esfingolipídios induzem a viabilidade e/ou virulência da leishmania (ZHANG; BEVERLEY, 2009). Sendo assim, caso ocorra alterações em sua composição, esta via pode ser considerada relevante alvo de fármacos ou novos compostos.

A bolsa flagelar consiste em uma invaginação da membrana plasmática de onde emerge o flagelo que participa de vários processos celulares. Possui nove pares de microtúbulos periféricos e um par de microtúbulos central, estando associado ao corpúsculo basal e agregado à membrana mitocondrial externa bem como ao cinetoplasto (DE SOUZA et al., 2010). Na região anterior, ao sair da bolsa flagelar, torna-se livre e, dependendo do estágio evolutivo, o comprimento do flagelo varia (TEIXEIRA et al., 2013). Ou seja, flagelo longo e móvel corresponde à forma promastigota que é responsável pela motilidade e adesão do parasito em

células de seus hospedeiros, enquanto que o primórdio flagelar é encontrado nas formas amastigotas, podendo desempenhar função na estruturação celular (DA SILVA et al., 2013; GLUENZ et al., 2010).

Nos tripanossomatídeos há organelas citoplasmáticas responsáveis pela regulação da homeostase, a exemplo do retículo endoplasmático, mitocôndria e acidocalcissomo. O acidocalcissomo possui conteúdo acídico e elevada elétron-densidade, sendo uma organela ausente nas células de mamíferos. Tem como principal função estocar cálcio e fósforo, estabelecer a homeostase de cálcio, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (MIRANDA et al., 2008). Esses processos são realizados devido à presença de bombas Ca^{2+}, transportadores (Na^{+}/H^{+}, Ca^{2+}/H^{+}) e aquoporinas (canais) em sua membrana (MIRANDA et al., 2008). No estudo de Do Campo et al. (2013) foi enaltecida a ação osmorreguladora das células devido à presença de aquoporina nesta organela. Além de armazenar cálcio, possui reservas de sódio, magnésio, pirofosfato, potássio, em poucos casos zinco e baixa concentração de enxofre e cloro. São, na maioria das vezes, esféricos com 600 nm de diâmetro, distribuídos por todo o corpo celular (DOCAMPO et al., 2010).

Os glicossomos são organelas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (via glicolítica) e aminoácidos (SCHROEDERELY, 2011), que podem ser utilizados como fonte de energia, a partir da ação da cadeia de elétrons do glicossomos e da mitocôndria. Os glicossomos são estruturas delimitas por membrana e que abrigam enzimas da síntese de aminoácidos, β-oxidação de ácidos graxos, síntese de éter-lipídios, metabolismo de peróxido, esteróis, pirimidinas e enzimas da via de recuperação de purinas (MICHELS et al., 2006). Como não possui núcleo, todas as proteínas são codificadas por genes nucleares, transcritas em ribossomos que adentram a organela (MERCALDI, 2010). Existem em grande número nas formas amastigotas, no entanto a presença de enzimas é variável a depender do estágio evolutivo do parasito, o que reflete uma dinâmica energética e metabólica distinta entre as formas.

A degradação do material ingerido ocorre através de uma organela chamada de megassomo, que é responsável pelas atividades lisossomal da forma amastigota (DE SOUZA et al., 2009), exclusiva desse estágio evolutivo de vida. Os megasossomos são estruturas que contém fosfatase ácida e cisteína-proteinase, responsáveis por armazenar as macromoléculas ingeridas pelo protozoário durante a endocitose (DE SOUZA et al., 2009). Análises realizadas por microscopia eletrônica de transmissão mostram que essas organelas são elétron-densas, delimitadas por membrana, podem atingir até o diâmetro do núcleo da célula, apresentam vesículas, além de apresentar perfil lisossômico e estar relacionada com a infectividade do parasito (DE SOUZA et al., 2009).

2.4 Aspectos imunológicos da infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado.

A infecção poderá ser estabelecida se o hospedeiro oferecer condições ao parasito de suprir seu crescimento, assim como o parasito apresentar habilidades de evadir-se do sistema imune do hospedeiro, através de mecanismos favoráveis à sua sobrevivência e desvio da função efetora dos macrófagos em sua fagocitose (TAWARI et al., 2018).

Sabe-se que, na resolução da infecção por leishmania, há o desenvolvimento de resposta imune predominantemente celular (BRASIL, 2014) ocorrendo uma expansão caracterizada por células T $CD4^+$, apresentando perfis de citocinas Th1 e Th2 (SILVA, 2017; REIS et al., 2006). As células T $CD4^+$ induzem a fagocitose pelos macrófagos para que a infecção seja controlada ou possivelmente eliminada, enquanto as células T $CD8^+$, com caráter citotóxico (MUTISO et al., 2013).

A resposta imune protetora é mediada por células do perfil Th1 e células natural killer (NK), com produção de interleucina (IL)-12, interferon (IFN) gama (γ) e fator de necrose tumoral (TNF) alfa (α) que estão envolvidos na resistência e eliminação dos parasitos, além de estimular os macrófagos a produzirem a enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS, do inglês induction of nitric oxide synthase) que cataliza a L-arginina a gerar Óxido Nítrico (ON) que é tóxico ao parasito. Citocinas do tipo Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-10 estão ligadas à susceptibilidade de infecções por *Leishmania*, favorecendo a sobrevivência das células fagocíticas do hospedeiro causando a patogênese da doença (SILVA, 2017; SAVOIA, 2015; VON STEBUT, 2007). As células dendríticas (CDs), também reconhecidas como células apresentadoras de antígeno (APCs), participam da resposta imunológica contra a *Leishmania*. Residem em todos os tecidos periféricos e, como tal, são denominadas sentinela do sistema imunológico (FEIJÓ et al., 2016).

A resposta humoral mediada pelos linfócitos B, quando ativados, determinam a produção de anticorpos policlonais, resultando em hipergamaglobulinemia. Estes eventos (celular e molecular) definem a patogenia da doença e as alterações morfológicas resultam do acometimento progressivo e proeminente do SFM, levando à hipertrofia, hiperplasia e intenso parasitismo de macrófagos (PRATA; SILVA, 2005). Ocorre, também, participação reativa de interstício dos diferentes órgãos, com modificação de seus componentes celulares, da matriz extracelular e com o aparecimento do infiltrado mononuclear, que com dilatação e congestão dos seios venosos, determinam o aumento do volume e do peso dos órgãos atingidos (PRATA; SILVA, 2005).

2.4.1 Óxido Nítrico (ON)

O óxido nítrico (ON) (NO, do inglês Nitric Oxide) é uma molécula gasosa e um radical capaz de regular inúmeros processos biológicos. Devido ao seu dinamismo, pode funcionar como um mensageiro intracelular, neurotransmissor ou até mesmo como hormônio, assumindo uma enorme diversidade de funções de sinalização celular. No entanto, tal como qualquer outra molécula mensageira, a sua elevada concentração pode resultar em patologias (MURAD, 1999).

Os macrófagos são ativados a um estado leishmanicida induzidos pela resposta de células Th1 envolvida com APCs, células T $CD4^+$ e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, IFN-γ e TNF-α (STOBIE et al., 2000). Níveis de ON produzidos por macrófagos ativados por IFN-γ ou pelo TNF-α estão relacionados com resistência à infecção, levando à morte das formas amastigotas no interior dos macrófagos (LIEW et al., 1991). No entanto, mesmo ativados, os macrófagos podem diminuir sua ação microbicida, através da menor produção de ON, peróxido de hidrogênio e citocinas pró-inflamatórias, o que favorece a migração do perfil Th1 para o Th2 (SINGH et al., 2013). Para sobreviver aos mecanismos de defesa dos macrófagos, a *Leishmania* deve reverter a ação leishmanicida a seu favor para viabilizar sua sobrevivência e reprodução, no entanto estudos sugerem que fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro que vão determinar a resposta positiva contra o parasito (SIBLEY, 2011). Todavia, o desenvolvimento da subpopulação Th2 contribui para o desenvolvimento da resposta humoral que leva à progressão da doença, polo de susceptibilidade (VALE DE GATO, 2009).

O metabolismo do aminoácido L-arginina compõe duas vias metabólicas dos macrófagos. O processamento da L-arginina pela enzima iNOS corresponde à via clássica, sendo esta ativada por citocinas características de resposta imune do perfil Th1, como o IFN-γ e o TNF-α (MUNDER et al., 1999; PERANZONI et al., 2007). Quanto maior a síntese da enzima iNOS, maior a produção de NO ativando os mecanismos microbicidas (BOGDAN et al., 2000). Por outro lado, a via alternativa envolve o processamento da L-arginina pela enzima arginase I (Arg I) (BANSAL; OCHOA, 2003) que é ativada por citocinas características do perfil Th2 como IL-4 e IL-10 (POPOVIC et al., 2007). A expressão divergente entre Arg I e iNOS tem contribuído para a nomenclatura dicotômica de macrófagos (GORDON, 2003) que quando ativados (M1) expressam altos níveis de iNOS e baixos níveis de Arg I, participando do controle de patógenos intracelulares. Por outro lado, macrófagos alternativamente ativados

(M2) expressam o padrão inverso e não só se desenvolvem em resposta a infecções parasitárias, de uma forma dependente da citocina Th2 (HESSE et al., 2001), mas também protegem o tecido do hospedeiro contra danos inflamatórios (PESCE et al., 2009). Enquanto a expressão desregulada de iNOS por macrófagos M1 promove danos inflamatórios (CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2011; PERROTTA et al., 2011), o excesso de expressão de Arg I por macrófagos M2 reduz a eficácia da imunidade contra agentes patogênicos intracelulares (WANASEN; SOONG, 2008), e aumenta o crescimento de tumores (ZEA et al., 2005). Assim, tanto durante o início quanto na resolução da imunidade, a expressão do iNOS e Arg1 em macrófagos deve ser bem regulada para proteger o hospedeiro de uma inflamação potencialmente prejudicial.

Experimento realizado em camundongos demonstrou controle de crescimento de *Leishmania* no interior dos macrófagos, dependendo exclusivamente da ação do ON, sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima iNOS (HOLZMULLER et al., 2002; LIEW; O'DONNELL, 1993). O controle da infecção intracelular por *Leishmania* em macrófagos humanos parece depender tanto de mecanismos independentes de oxigênio, como também da produção de radicais de oxigênio e peróxido de oxigênio (H_2O_2) (MURRAY; TEITELBAUM, 1992).

Panaro et al. (1999) descreveram ação leishmanicida, aparentemente mediada pelo ON, exercida por macrófagos humanos sobre *L. infantum.* Outros estudos avaliaram que, mesmo não sendo identificado o ON nas culturas de macrófagos humanos infectados pelo parasito, a inibição da iNOS diminuía a atividade antiparasitária destas células (DIAZ et al., 2003).

A *Leishmania* possui a enzima superóxido dismutase que, quando inativada, diminui a capacidade do parasito resistir ao ataque por moléculas intermediárias de oxigênio, sendo um importante antioxidante, resultando em sua morte intracelular (BOGDAN et al., 2000). No entanto, também há indícios de que a produção de ON possa ser regulada pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF-β). Neste caso, o parasito estimula a produção desta citocina, inibindo a produção de ON 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 (PINHEIRO et al., 2004).

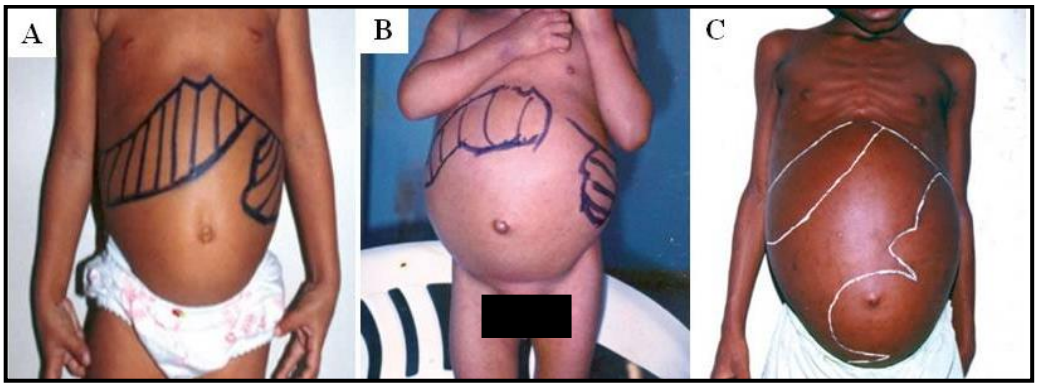
2.5 Manifestações Clínicas da LV

O curso clínico da doença pode depender tanto de fatores relacionados à natureza da resposta imunológica, genética do hospedeiro, estado nutricional e idade do hospedeiro, como

também da espécie de *Leishmania*, da quantidade de parasitos inoculada, da infectividade e patogenicidade do parasito (LIMA, 2018; KUMAR; NYLÉN, 2012).

A LV é caracterizada por uma diversidade de manifestações clínicas, variando de uma infecção assintomática até uma doença fatal (BRASIL, 2015). Em áreas endêmicas indivíduos com sorologia positiva pode apresentar-se assintomáticos por longos períodos, sendo dessa forma, potencial reservatório da infecção (TAWARI et al., 2018). Após o período de incubação do parasito que pode variar entre 2 a 14 meses, os pacientes apresentam sintomas e sinais de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso), invasão do sangue e do sistema retículo-endotelial por parasitos tais como linfonodos, baço e fígado. Fadiga e fraqueza são agravadas pela anemia, que é causada pelo estado inflamatório persistente, hiperesplenismo e, algumas vezes, sangramento (BRASIL, 2015). A infecção nem sempre se equipara com doença clínica. A proporção da incidência de infecções assintomáticas para a incidência de casos clínicos é variável. O aparecimento da manifestação clínica crônica geralmente é gradual, mas pode se manifestar abruptamente, levando a um desfecho fatal, se não houver tratamento (VILAS et al., 2015).

Figura 5 - Micrografias de pacientes com Leishmaniose Visceral.



Fonte: Brasil (2014). (A) fase aguda, (B) fase de estado e (C) fase final da LV.
Notar o aumento do fígado e do baço nos três períodos da LV.

2.6 Diagnóstico e Tratamento

Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito dos testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). Conforme disposto por Brasil (2016), o diagnóstico pode ser realizado no âmbito ambulatorial, no entanto a confirmação, notificação e tratamento deve ser o mais precoce possível. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de testes imunológicos, molecular e parasitológicos (BRASIL, 2016).

O diagnóstico imunológico pesquisa anticorpos contra *Leishmania* e evita o diagnóstico invasivo, o parasitológico (SRIVIDYA et al., 2012). Os métodos mais utilizados são Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste Imunocromatográfico e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Para a RIFI consideram-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:40 (BRASIL, 2016) para os testes imunocromatográficos as fitas possuem antígenos recombinantes, tal como o rK39, sendo considerados positivos quando a linha controle e a linha teste aparecem na fita; o ELISA devido à baixa especificidade, não deve ser utilizado como método diagnóstico único, a menos que utilize a rK39. Este teste não está disponível na rede pública, no entanto, algumas unidades de saúde da rede privada utilizam *kits* de ELISA registrados e comercializados no Brasil. O diagnóstico molecular consiste na detecção do DNA da *Leishmania spp*. através da Reação em Cadeira Polimerase (PCR) (BRASIL, 2016; CHATZIS et al., 2014). No entanto, este último procedimento torna-se inviável devido ao seu alto custo (CHATZIS et al., 2014), sendo realizado apenas em centros particulares e de pesquisas (SAVOIA et al., 2015). O teste de Montenegro é uma reação intradérmica de sensibilidade tardia na qual é injetado extrato solúvel do parasito morto no antebraço, a partir de 48 horas é medido a área de endurecimento no local aplicado. O diagnóstico parasitológico visa o encontro das formas amastigotas do parasito em material biológico obtido, preferencialmente, da medula óssea (mais seguro), linfonodo ou baço (BRASIL, 2016).

De caráter compulsório e características clínicas de grave evolução, o diagnóstico e tratamento da leishmaniose devem ser feitos de forma precisa e precoce. Sempre que possível, a confirmação parasitológica da doença deve preceder o tratamento, no entanto, em situações que o diagnóstico sorológico e/ou parasitológico não estiver disponível ou na demora da liberação dos mesmos, o início do tratamento não deve ser tardia (BRASIL, 2016).

A falta de vacina humana, modo de administração e durabilidade de terapêutica, bem como seu alto custo, são as principais dificuldades encontradas no tratamento e prevenção das leishmanioses. A quimioterapia para as leishmanioses é realizada com o antimonial pentavalente (Sb^{+5}), cujo fármaco de primeira escolha utilizado no Brasil é o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) em uso há mais de 60 anos, sendo utilizados até os dias atuais apesar de sua toxicidade (BRASIL, 2016; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Durante sua administração o efeito mais complexo é a cardiotoxicidade com presença de arritmias, anormalidades eletrolíticas (refletindo a necessidade de assistência ao paciente durante o tratamento), elevação das enzimas do pâncreas e fígado, nefrotoxicidade, neuropatia entre outros. Esses medicamentos de primeira escolha, além de produzem muitos efeitos colaterais, existem relatos de resistência de *Leishmania* spp.,

bem como o fato do longo tempo de terapia favorecer o abandono do tratamento (CHANDER et al., 2018; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Os antimoniais pentavalentes são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas de leishmanioses. Alguns autores sugerem que a molécula pentavalente (Sb^{+5}) atua como pró-fármaco 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* spp., inibe tanto a glicólise como a oxidação dos ácidos graxos, causando a redução na produção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (SILVA, 2017; FRÉZARD et al., 2009). A medicação é utilizada por via intravenosa ou intramuscular, na dose de 20mg/Kg/dia por um período que varia de 20 a 30 dias (BRASIL, 2016).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente elucidado, embora alguns autores sugiram que a molécula pentavalente (Sb^{+5}) atue como pró-fármaco 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* spp. (SILVA, 2017).

Como segunda linha de escolha para o tratamento tem-se a pentamidina e a anfotericina B (AmB), que são recomendadas em casos de contraindicação, intolerância ou resistência a antimoniais, sendo também a primeira escolha para gestantes (DE VRIES et al., 2015). A pentamidina é um fármaco sugerido embora também apresente efeitos cardíacos e gastrointestinais significativos e requeira administração parenteral. Utilizado na dose de 4mg/Kg/dia, de dois em dois dias, recomenda-se não ultrapassar a dose total de 2g, por via intramuscular (GIL et al., 2007). Segundo Singh et al. (2016), a atividade da pentamidina é através de sua passagem para o interior do parasito por transportadores de arginina e poliamina, inibindo a topoisomerase mitocondrial, interfere na síntese de DNA e altera a morfologia do cinetoplasto (SINGH et al., 2016). Tanto a AmB quanto a pentamidina possuem limitações e efeitos colaterais frequentes e graves, além de alto custo de tratamento e necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração (BRASIL, 2014; RIBEIRO et al., 2014).

A AmB é um antimicrobiano da classe dos polienos, isolado pela primeira vez de *Streptomyces nodosus* em 1955. Além de ser antifúngico, tem comprovada ação no tratamento da leishmaniose, é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais e, tem sido, nas últimas décadas, proposto como agente terapêutico de escolha para LV e para infecção sistêmica por fungos (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). A AmB possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica, ou seja, é uma molécula anfipática. O

deoxicolato de sódio ou carreadores lipídicos é o que viabiliza a sua solubilidade aquosa (MESA-ARANGO et al., 2012). Sua administração se dá por via endovenosa, na dose diária de 0,2mg/Kg/dia até no máximo 50mg. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua ligação com esteróis da membrana do parasito, uma vez que o fármaco atua na permeabilidade dessa membrana, causando a formação de poros e rápido extravasamento de cátions, tais como o K^+, causando a morte celular (SEIFERT, 2011). A ligação da AmB com os esteróis resulta em desorganização de membrana e formação de poros aquosos. Como consequência, aumenta a permeabilidade de membrana levando o parasito à morte. Ainda pouco esclarecido, o estresse oxidativo é outro mecanismo de ação importante da AmB devido a formação aumentada de radicais livres, fortalecida pela expressão de genes de estresse celular, reflete seu potencial leishmanicida (MESA-ARANGO et al., 2012).

Contudo, o uso clínico de AmB tem sido limitado devido à sua elevada toxicidade, o que pode resultar no aparecimento de sintomas como nefrotoxicidade, alterações cardíacas, hemólise e danos ao fígado, bem como náuseas e febre (RIBEIRO et al. 2014). Para alcançar apenas os tecidos alvo com máxima concentração e seletividade, a concentração sérica da AmB livre deve ser mantida baixa. Então, para reduzir essa toxicidade, formulações à base de lipídios foram desenvolvidas, e se mostram eficazes no tratamento para as leishmanioses (SARAVOLATZ et al., 2006). No entanto, em países em desenvolvimento, é inacessível este tipo de tratamento uma vez que a seleção de tratamento torna-se mais uma questão de custo do que eficácia e toxicidade para o indivíduo.

A AmB lipossomal é uma nova formulação em que a AmB é incorporada a lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterol fosfatidilglicerol. Existem três tipos de formulações lipídicas de AmB: AmB lipossomal, AmB complexo lipídico e AmB em dispersão coloidal. O desenvolvimento destas formulações diminuiu a toxicidade do fármaco durante o tratamento de leishmaniose (SOLOMON et al., 2011), e especificamente menos nefrotóxicos do que a AmB convencional, pois são absorvidos seletivamente pelos macrófagos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). A fórmula lipossomal constitui o tratamento de primeira escolha em países endêmicos no sul da Europa, bem como em outros países desenvolvidos, devido à rápida e até 100% de taxa de cura no esquema de administração do medicamento entre 3 a 5 dias (GRADONI et al., 2008).

Segundo o Ministério da Saúde, a formulação lipossomal (registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa) está indicada como primeira escolha apenas para pacientes com LV acima de 50 anos, devido à evidência de maior risco de óbito, insuficiência renal estabelecida e pacientes transplantados renais, cardíacos e hepáticos (BRASIL, 2014). As

formulações lipídicas são selecionadas pelo retículo endoplasmático dos macrófagos refletindo em uma reforçada ação leishmanicida, nas quais se ligam à membrana de ergosterol da *Leishmania* que conduz a formação de poros, resultando em efluxo de constituintes celulares de protozoário e, consequentemente, sua lise (JHA et al., 2013). O principal fator limitante do uso generalizado dessas formulaçõe lipídicas da anfotericina é o seu elevado custo.

A Miltefosina, inicialmente desenvolvida para o tratamento de neoplasias, pertence a classe alquifosfocolina (hexadecilfosfocolina) e é um fármaco com exclusiva indicação por via oral que possui alta eficácia contras as formas promastigotas e amastigotas do parasito (DA COSTA FILHO et al., 2008). No entanto, em regiões endêmicas como a Índia, sua eficácia clínica tem diminuído devido ao seu uso extensivo e à sua longa meia vida (150 h) (CHANDER et al., 2018; MISHRA et al., 2013). Induz eventos de apoptose que podem estar relacionados com a despolarização da membrana mitocondrial e interfere na membrana celular (fosfolipídeos e esteróis) do parasito sem interagir com o DNA (DA COSTA FILHO et al., 2008). Esse fármaco também apresenta grave toxicidade gastrointestinal e teratogenicidade, portanto, não recomendado para gestantes (BERMAN, 2008). Para os cães, essa mesma medicação (Milteforan® Virbac) teve seu registro autorizado para uso veterinário, no tratamento da LV canina (LARSSON; LUCAS, 2016).

Na década de 60 a ação leishmanicida da Paromicina, que é um antibiótico aminoglicosídico. No entanto, não é considerado uma escolha para tratar pacientes com leishmaniose devido à sua má absorção. Seu mecanismo de ação altera o potencial mitocondrial das *Leishmanias* (TIWARI et al., 2018).

Com a grande inespecificidade dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose, a toxicidade se faz presente nas células do hospedeiro. Poucos recursos são destinados às pesquisas e ao desenvolvimento de novas terapias voltadas às doenças negligenciadas que afeta, principalmente, a população desprovida de capital. E devido à ausência desse poder aquisitivo não há interesse, por parte da indústria farmacêutica, em desenvolver novos medicamentos, pois alegam que o investimento é muito caro e arriscado para doenças de baixo retorno financeiro. Em contra partida, o poder aquisitivo explica o empenho da indústria farmacêutica em países desenvolvidos. (TROUILLER et al., 2002).

Tendo em vista as limitações da medicação que vigora em nosso sistema de saúde para o tratamento da leishmaniose, considera-se de extrema importância pesquisar novos compostos com atividade leishmanicida eficaz, menos tóxico e associado a um baixo custo. Fato este, que justifica o crescente interesse de muitos pesquisadores por este tema. Observaram-se ainda

como os compostos heterocíclicos estão sendo modificados e estudados, visando a obtenção de novas moléculas com potencial leishmanicida.

O conceito da Química Medicinal parte da criação, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos bioativos, sendo desenvolvido através do estudo da parceria entre estrutura química e atividade biológica (WERMUTH et al., 1998). Logo, para o desenvolvimento de novos fármacos os pesquisadores investigam diferentes classes de compostos com interesse em suas possíveis atividades biológicas, além de desenvolverem novas rotas sintéticas para obter novos medicamentos (LEITE et al., 2018; ANNANG et al., 2015; RABITO et al., 2014).

2.7 Derivados Heterocíclicos

A química heterocíclica corresponde a uma promissora área de compostos, com similaridade peptídica, capazes de se ligar reversivelmente às proteínas (FRANZÉN, 2000). E, devido ao quase ilimitado número de combinações estruturais criadas, resulta em estruturas policíclicas com as mais distintas propriedades física, químicas e biológicas, tornando-se um marco para a comunidade científica (KAUSHIK et al., 2013).

Chen et al. (2015) afirmam que a maioria dos compostos pode ser dividido em até três partes de acordo com sua estruturação química e seus ligantes laterais. Além disso, para otimizar a eficácia desses compostos finais, a semelhança entre os fragmentos estruturais e os núcleos privilegiados devem ser considerados (CHEN et al. 2015).

Considerando que, a maioria da população acometida por doenças negligenciadas possui limitado acesso efetivo ou acessível ao tratamento, a proposta de novos compostos com propriedades e funções conhecidas pode ser de suma importância devido ao custo benefício, síntese factível, bom rendimento, capacidade de gerar outras séries de análogos, entre outros. Segundo Bongarzone e Bolognesi (2011), esses parâmetros foram considerados para a síntese de novos compostos ativos para doenças de origem protozoárias e neurodegenerativas. Dentro desse contexto, a real gravidade das doenças infecciosas é a falta de tratamento eficaz e seguro.

Na leishmaniose, a ausência de vacina humana no mercado e a dificuldade na execução do tratamento devido à elevada toxicidade, efeitos adversos e resistência à medicação de uso padrão, torna-se de extrema importância estudos com derivados heterocíclicos. Novos grupos de fármacos são estudados e considerados promissores com atividade leishmanicida. Dentre eles está a classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina que apresentam um amplo perfil farmacológico, constituindo importantes classes de compostos cujas propriedades têm sido

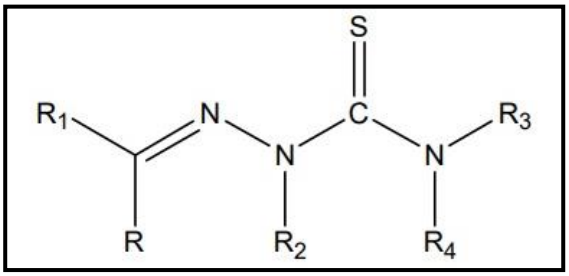
bastante estudadas, com comprovada utilidade pela química medicinal devido à possibilidade de manipulação de seus radicais, o que possibilita a coordenação de seu mecanismo de ação (LEITE et al., 2018; VERMA; SARAF, 2008), bem como comprovada ação tripanossida (GOMES et al., 2016; BRITA et al., 2015; BRITA et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2014; MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; YEUNG et al., 2010; CHIYANZU et al., 2003).

Mediante contexto, esses achados reforçam a necessidade de estudos com estes núcleos para avaliar sua ação leishmanicida contra *L. infantum*, na busca de tratamentos alternativos que proporcionem menos efeitos colaterais aos pacientes e contribuam para novas estratégias terapêuticas de combate à LV.

2.7.1 Tiossemicarbazona

A tiossemicarbazona (Fig. 6), que apresenta como estrutura básica C=N-NH-CS-NHR, são moléculas importantes e bastante descritas na literatura por apresentarem sua organização química em uma série de compostos com diferentes núcleos e atividades farmacológicas, entre elas antibacteriana (PAVAN et al., 2010), antiviral (GLISONI et al., 2012), anticâncer (LUKMANTARA et al., 2013) e antiparasitária (SANTIAGO et al., 2014; CAPUTTO et al., 2011). Possui baixo custo, rápida síntese e alto rendimento (HANG; BERTOZZI, 2001).

Figura 6 – Estrutura química da Tiossemicarbazona.



Fonte: Adaptado de Santiago (2014).

Considerada como um bom agente quelante, o que explica seu amplo perfil farmacológico, podendo-se ligar a metais existentes nas estruturas de enzimas inativando-as, por exemplo, através do ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR); ligação ao DNA e inibição de sua síntese; inibição da síntese de proteínas; e através do envolvimento de seu átomo de enxofre em reações redox e com variados metais endógenos (HALL et al., 2009). Existe a possibilidade de, algumas vezes, o complexo metálico ser mais atraente que os radicais livres

ou este ser ativado por radicais da própria estrutura, tornando-o mais citotóxico ao parasito (RIGOL et al., 2005).

Nas últimas décadas, a tiossemicarbazona vem se destacando entre as mais promissoras classes em termos de espectro de ação e eficácia. Adams et al. (2013) investigaram a atividade antimalárica e sugeriram um possível mecanismo de ação para a atividade antiplasmodial de compostos derivados de tiossemicarbazona.

No estudo de Hernandes et al. (2010), as tiossemicarbazonas foram estudadas como potenciais inibidores da cisteína protease (Cys-proteases), em especial aquela presente no *Trypanosoma cruzi*, apresentando resultados favoráveis. As Cys-proteases são fundamentais para o metabolismo de muitos parasitos (SAJID; McKERROW, 2002). Possuem níveis regulados a depender do estágio do parasito, são importantes fatores de virulência, modulam as células imunes do hospedeiro mamífero e facilitam a invasão do hospedeiro ao tecido (GOMES et al., 2016). Em *Leishmania* spp., as proteases ocorrem em grandes quantidades no megassomo, organela particularmente abundante na forma amastigota, desempenham funções como virulência, viabilidade e morfologia do parasito, replicação, invasão de fagócitos mononucleares e modulação de sua resposta imunológica, constituindo assim um possível alvo quimioterápico para o tratamento de leishmaniose (SCHAD et al., 2016).

Britta et al. (2014) demonstraram que um composto derivado de tiossemicarbazona apresentou atividade antiproliferativa potente contra as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e efeitos sobre a morfologia e ultraestruturas do parasito, características estas que são encontradas em células que morrem de processos apoptóticos ou autofágicos.

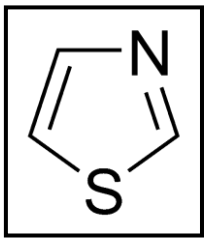
Moreno-Rodríguez et al. (2014) identificaram *in vitro* propriedades tripanocida em compostos derivados de tiossemicarbazonas obtidos a partir de posições diferentes no anel benzeno. No estudo de Fernández et al. (2015), outros compostos derivados dessa mesma classe foram testados *in vitro*, mas apenas um apresentou boa e moderada seletividade para *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Enquanto, Manzano et al. (2016) através de um *screenning*, selecionaram os compostos mais eficazes contra as formas amastigotas de *Leishmania donovani* e menos citotóxicos à duas linhagens de células de mamíferos tesadas.

2.7.2 Tiazól

A classe tiazol é formada por um anel de cinco membros sendo dois destes heteroátomos, um átomo de nitrogênio (N) e um átomo de enxofre (S) (Fig. 7). A importância desses derivados heterocíclicos é incontestável, particularmente no que se refere aos inúmeros

usos como medicamentos (MELO et al., 2006). São conhecidos por suas várias atividades farmacológicas, antihelmíntica (SANTIAGO et al., 2014), antibacteriana (BHARTI et al., 2010), antifúngica (SUDO et al., 2010), antihistamínica, antiviral, anti-inflamatória (VERMA; SARAF, 2008), antimicrobiana (BOZDAG-DUNGAR et al., 2007) e antiprotozoária (LIESEN et al., 2008).

Figura 7 - Estrutura química do Tiazól.



Fonte: Adaptado de Gomes et al. (2016).

Ao explorar abordagens para modificação molecular, Filho et al. (2015) e (2017) identificaram a existência de duas novas séries de derivados tiazolidínicos que demonstraram atividade contra o *T. cruzi*, as 4-tiazolidinonas e os 1,3-tiazóis. Dentre todas as estruturas químicas analisadas, dois compostos analisados, um de cada estudo, se sobressaiu demonstrando poder sob a forma tripomastigota, reduzindo a parasitemia e apresentando baixa toxicidade em modelo murino infectado e índice de seletividade mais alto que o do fármaco padrão (Benzonidazol).

Existem relatos dos tiazóis como contribuintes para a atividade antimalárica. Bueno et al. (2016) avaliaram a atividade de vários análogos tiazóis com diferentes substituintes contra o *Plasmodium falciparum*, demonstrando que todos possuem atividade (BUENO et al., 2016). Outros compostos derivados de bis-arilimidamida tiazól foram descritos como sendo ativos contra protozoários do gênero *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium* (LIU et al., 2014). Os autores mostraram que dois dos compostos testados apresentaram valores promissores de Índice de Seletividade (IS) contra tripomastigotas de *T. brucei* e estágios eritrocitários de *P. falciparum* resistente à cloroquina. Além disso, um terceiro composto também foi muito seletivo às formas amastigotas de *L. amazonensis* e contra os estágios eritrocitários do *P. falciparum* (LIU et al., 2014).

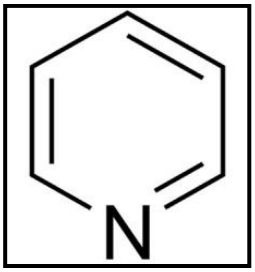
Outras séries de derivados tiazólicos, à base de metal rutênio, inibidores da cisteína protease cruzaína e do crescimento de *T. cruzi,* foram identificados, porém refletindo toxicidade em testes *in vivo* (HERNANDES et al., 2010). Um determinado derivado tiazolidínico,

diastereo isômero ligado a uma hidroxila, apontou efeito favorável no tratamento *in vivo* de leishmaniose tegumentar, no entanto mostrou-se inviável na terapia medicamentosa para LV uma vez que necessitaria de combinação com antimonial pentavalente (AL-ABDELY et al.,1999). Desta maneira, o estudo de outros derivados tiazolidínicos pode indicar um composto viável para o tratamento de LV, uma vez que já apresentam potencial tripanocida.

2.7.3 Piridina

A piridina é uma classe de composto heterocíclico que possui sua estrutura química análoga ao do benzeno, diferenciando-se devido à substituição de C-H por N (Fig. 8). Sua estrutura tem demonstrado relevância na síntese de produtos naturais e sintéticos e, dessa forma, atraindo a atenção de estudiosos e indústrias pela sua ação biológica, baixo custo e fácil síntese (CARDOSO et al., 2014). No sistema biológico de oxidação e redução dos nucleotídeos, Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NAD) e Fosfato de Dinucleotídeo de nicotinamida e Adenina (NADP), a piridina é precursora da nicotinamida (FARHANULLAH et al., 2002). Outro relato de evidência da piridina em sistemas biológicos é a sua presença na vitamina B6 (termo coletivo para piridoxina, piridoxal e piridoxamina) e também em alcaloides altamente tóxicos como a nicotina (CLARK, 2012). Na indústria farmacêutica, a piridina está presente em mais de sete mil núcleos bioativos.

Figura 8 - Estrutura química da piridina



Fonte: Adaptado de Da Silva et al. (2017).

Na Química Orgânica, a piridina tem competência de associação com íons metálicos, tais como zinco, rutênio e cobre (SHA; HUANG, 2009). Um dos derivados piridínicos mais estudados é a triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP), um potente agente antitumoral com boas características para quelação com metais de transição (SHAO et al., 2006). Kuno et al. (2010) testaram a triapina em combinação com radiação e um segundo fármaco, inferindo melhores resultados para pacientes acometidas com câncer de colo de útero

avançado (KUNO et al. 2010). Em outro estudo, quelatos cuprosos com tiossemicarbazona 2-formilpiridina e 4-formilpiridina induziram, ambos os agentes, morte celular associada à geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e depleção da glutationa celular (BYRNES et al., 1990).

Novos compostos também foram observados por Mjambili et al. (2014) a partir da série 2-amino-4- (2 piridil) tiazól, onde avaliaram a atividade bactericida *in vitro* contra a *Mycobacterium tuberculosis*, *P. falciparum* e citotoxicidade em célula de mamíferos. A atividade bactericida foi evidenciada em compostos com um anel 2-piridil na posição 4 do esqueleto de tiazól, enquanto que a atividade antiplasmodial foi melhor em compostos que tiveram o anel fenil substituído por grupos de retirada de elétrons hidrofóbicos (MJAMBILI et al., 2014).

Com base na hibridização e estratégia de estruturação química, outros estudos foram desenvolvidos acerca da ação da classe piridina frente ao *T. cruzy* (LESSA et al., 2011; MUSONDA et al., 2009). Mello et al. (1998) estudaram novos compostos heterocíclicos derivados do núcleo piridina e, a partir deste, novas moléculas foram sintetizadas, comportando-se como promissores antimetabólitos purínicos e pirimidínicos.

Nesse contexto, além das classes tiossemicarbazona e tiazól, a classe piridina também agem como inibidoras da cruzaína protease presente nos tripanossomatídeos (CARDOSO et al., 2014). Greenbaum et al. (2004) haviam observado essa inibição através da ação de compostos tiossemicarbazonicos com uma porção piridina. Em outro estudo, Cardoso et al., (2014) testaram a atividade de novos compostos, derivados dessas duas classes, sob as formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito e também sob a cruzaína protease, obtendo êxito.

Os núcleos tiossemicarbazona, tiazól e piridina são utilizados não apenas para doenças negligenciadas, como também para outras finalidades, incluindo anti-inflamatório, antioxidantes, analgésicos, antimicrobiano, bactericida, antiviral, neuroprotetor, entre outros. Além disso, estudos referentes ao efeito anticancerígeno têm sido amplamente explorados nos últimos anos, em especial, para os compostos que contêm núcleo tiazól (ALTINTOP et al., 2018; MATHEW et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar a atividade *in vitro* de novos compostos heterocíclicos de classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina frente à *Leishmania infantum* e células de mamíferos.

3.2 Específicos

- Avaliar, através da determinação da $IC_{50,}$ o crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* sob o efeito dos novos compostos heterocíclicos;

- Determinar a citotoxicidade dos compostos heterocíclicos sobre macrófagos J774;

- Estimar o índice de seletividade dos compostos para formas promastigotas de *L. infantum*;

- Avaliar o efeito dos compostos heterocíclicos sobre o crescimento de amastigotas de *L. infantum*, através da determinação da IC_{50};

- Determinar a citotoxicidade dos compostos heterocíclicos sobre macrófagos peritoneais;

- Estimar o Índice de Seletividade dos compostos heterocíclicos para formas amastigotas de *L. infantum*;

- Analisar a atividade hemolítica dos compostos heterocíclicos sobre hemácias de carneiro;

- Quantificar a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados com os novos compostos heterocíclicos de classe tiossemicarbazona, tiazól e piridina;

- Descrever os efeitos provocados na morfologia, superfície e na ultraestrutura de formas promastigotas de *L. infantum*, após tratamento *in vitro*, com os compostos heterocíclicos;

- Analisar possíveis alterações no potencial da membrana mitocondrial e na integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos heterocíclicos;

4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.1 Derivados heterocíclicos utilizados no tratamento *in vitro* de *L. infantum*

Os 09 compostos derivados de classe tiossemicarbazona (PA-1C, JW-16.2 e JW-37.2), tiazól (MB-1.5, MB-1.1, TAP-02, GT-12 e GT-14) e piridina-tiazól (TAP-01) foram sintetizados pelo grupo de pesquisas da Dra. Ana Cristina Lima Leite, no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal/LpQM da Universidade Federal de Pernambuco, que possui parceria com nosso grupo de pesquisa.

Inicialmente, houve a diluição em 1% dimetilsulfóxido (DMSO) que, posteriormente, foi dissolvido em meio de cultura adequado para cada ensaio (Roswell Park Memorial Institute - RPMI para ensaios com macrófagos e formas amastigotas e Schneider's para ensaios com formas promastigotas), para a obtenção das diferentes concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) testadas nos experimentos. O preparo das soluções de uso foi feito sempre no momento da realização do experimento para garantir a estabilidade dos compostos. Parasitos incubados apenas com meio de cultura + DMSO e com AmB foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

Ao final dos testes, as concentrações de μg/mL foram transformadas para μM de acordo com o peso molecular de cada composto, a fim de estimar a quantidade (concentração) mínima de uso.

4.2 Cultivo de parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/BH46) foram mantidas a 26 °C em meio Schneider suplementado (20% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina-estreptomicina), pH 7.2. Parasitos na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos com repiques a cada três dias.

As formas amastigotas foram obtidas após incubação e internalização das formas promastigotas em cultura de macrófagos.

4.3 Cultura de células de mamíferos

Os macrófagos J774 foram mantidos em garrafas de cultura contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO_2, segundo protocolo de MELLO et al. (2014).

A coleta de macrófagos peritoneais foi realizada em camundongos BALB/c machos. Os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésicos (via intravenosa caudal) e a assepsia realizada com álcool 70%. Dentro da cabine de fluxo laminar, foi realizada a exposição do peritônio do camundongo e a injeção de 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguida de coleta desse meio. O lavado foi acondicionado em frasco de vidro estéril e, posteriormente, os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea®).

Todos os procedimentos envolvendo animais experimentais foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ) sob o número 84/2015.

4.4 Atividade biológica *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*

Visando um "screening" inicial dos compostos com atividade leishmanicida, formas promastigotas de *L. infantum* foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração de $1x10^6$ células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) dos compostos estudados, por 72 h. No entanto, o crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01®, Cheonan-Si, Korea). Células incubadas apenas com o meio Schneider + DMSO foram utilizadas como controle negativo, e AmB como controle positivo. A capacidade de multiplicação das *L. infantum* não tratadas, comparada à capacidade de multiplicação das *L. infantum* tratadas com os compostos de estudo e o tempo final de incubação foi necessário para o cálculo da porcentagem de inibição de crescimento. A partir destes valores de inibição, para cada uma das concentrações testadas, foi realizada a determinação da IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar atividade na literatura internacional. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e triplicata técnica. Os três mais altos IS, dentre os compostos estudados, foram selecionados para os experimentos futuros.

Para a realização do experimento com as formas amastigotas, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram coletados após a eutanásia. O peritônio dos mesmos foi exposto com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica e, em seguida, 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram inoculados na cavidade peritoneal do animal. Para liberar os macrófagos aderidos à parte interna do peritônio, este foi levemente massageado e o fluido peritoneal aspirado com seringa e agulha e transferido para um recipiente de vidro estéril, acondicionando a 4 °C na geladeira. Ao final da coleta, do *pool* de células, 10µL foi contado em câmara de Neubauer para estimar a concentração de macrófagos coletados.

Os macrófagos (na concentração de $1x10^5$ células/mL) foram semeados em placas de 24 poços contendo uma lamínula de vidro e meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO_2. Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com 200 µL de PBS estéril para retirar os macrófagos que não aderiram à lamínula e, em seguida, foram adicionados 500 µL da suspensão de promastigotas na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago, por três horas e mantidas a 37 °C a 5% de CO_2 para permitir a penetração dos parasitos nos macrófagos. Em seguida, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem com 200 µL de PBS estéril e as células infectadas com parasitos, incubadas em meio RPMI na presença ou ausência de diferentes concentrações (1/2x, 1x e 2x IC_{50}) dos melhores compostos selecionados. Após 24 h de tratamento, as lamínulas foram retiradas, fixadas com metanol e coradas com Giemsa para avaliar a infectividade celular do parasito. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 h de cultivo por análise de regressão linear e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar atividade na literatura internacional. O índice de sobrevivência (ISo) foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A AmB foi utilizada como controle positivo. Macrófagos sem tratamento (Meio + DMSO) correspondem ao controle negativo. A IC_{50} (concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos) foi determinada através da contagem direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares em microscópio óptico convencional.

4.5 Análise da citotoxicidade de derivados heterocíclicos em células de mamífero

Foi realizado o teste de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA), o qual baseia-se na capacidade que as células metabolicamente ativas possuem de reduzir os sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível (ALIANÇA et al., 2017). Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Macrófagos J744 foram tripsinizadas e contados em câmara de Neubauer (iNCYTO C-Chip DHC-N01, Cheonan-Si, Korea®), semeados em placas de 96 poços na concentração de $1x10^5$ células/poço e incubados em uma atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, para a adesão das células ao fundo dos poços. Após 24 h, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) dos compostos por 48 h. Após este período, o meio foi novamente retirado e adicionado 10 µL de MTT diluído em meio RPMI sem vermelho de fenol, a uma concentração de 5 mg/mL diluído em PBS, as células foram incubadas por mais 3 h nas mesmas condições de cultivo. Logo após à incubação, o MTT foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 5 min. Para a leitura de absorbância dos cristais de formazan solubilizados utilizou-se o leitor de ELISA, Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA), com comprimento de onda de 490 nm (ALIANÇA et al., 2017). A porcentagem de células viáveis em relação às células controles (Meio + DMSO) foi estimada através da absorbância entre as amostras. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar citotoxicidade na literatura internacional. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} para cada composto. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica e quadruplicata técnica.

4.6 Atividade hemolítica

A ação hemolítica dos compostos foi realizada através da técnica sobre hemácias de carneiro de origem comercial, segundo método de Banerjee et al. (2008). A diluição dos compostos foi realizada com DMSO 1%, seguida pela microdiluição seriada em solução salina (NaCl 0,85% e $CaCl_2$ 10 nM) nas concentrações teste (6.25 a 100 μg/mL) em microplacas de poliestireno, fundo "U", com 96 poços. Em paralelo, 2 mL de sangue total homogeneizado foram dissolvidos em 18 mL de solução salina (NaCl 0,85% e $CaCl_2$ 10 nM). Posteriormente, a solução foi centrifugada a 2.500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado, com repetição dessa etapa por 3 vezes. Cada poço continha solução eritrocitária a 2% e o composto dissolvido. Foi adicionado um controle positivo de lise celular com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% e um controle negativo, células em solução salina (salina + DMSO). Após incubação por 3 h a 37ºC sob agitação constante, as microplacas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 4 ºC, para separação do sobrenadante e do pellet. Por fim, o sobrenadante foi removido para outra placa, de 96 poços com poliestireno de fundo chato, para leitura em espectrofotômetro (Benchmark plus, BioRad®, Califórnia, EUA) utilizando filtro de 540 nm para estimar o percentual de hemólise.

4.7 Dosagem de óxido nítrico (ON) em macrófagos

A fim de analisarmos o efeito dos diferentes compostos na produção de óxido nítrico por macrófagos, o sobrenadante das culturas controles (não tratadas) e tratadas com os compostos nas concentrações teste (6.25 a 100 μg/mL) foram analisados através do método reagente de Griess. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess, o qual o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com a *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto (NED) formando um complexo de coloração rósea.

Foi utilizado 100 μL do sobrenadante da cultura de macrófagos J774 e macrófagos peritoneais, infectados com *L. infantum*, não tratados e tratados com os compostos, por 48 h, e incubados com 100 μL do reagente Griess (1% sulfanilamida e 0.1% NED/H_3PO_4 á 2.5%) à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi determinada utilizando filtro de 540 nm em leitor de ELISA, Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas (6.25 a 100 μg/mL) de nitrito de sódio. Macrófagos não tratados (Meio + DMSO) foram utilizados como controle negativo.

4.8 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. infantum*

Para a análise por MET as formas promastigotas de *L. infantum* controles e tratados com concentrações de IC_{50} e 2x IC_{50} por 72 h, foram lavadas em PBS, em seguida fixadas (glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4) *overnight* e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 por 2 horas. Após esta etapa, para microscopia eletrônica de transmissão, houve a desidratação das amostras em concentrações crescentes de acetona, infiltração em concentrações crescentes em resina e, por fim, o emblocamento em resina EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os blocos foram colocados para polimerizar em estufa a 70 ºC por 72 h. Cortes ultrafinos, de aproximadamente 70 nm de espessura, obtidos através de um ultramicrótomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, EUA).

Para a microscopia eletrônica de varredura, formas promastigotas de *L. infantum* foram fixadas e colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Em seguida, após 20 min, as lamínulas foram lavadas em solução tampão para remover as células não aderentes e, posteriormente, pós-fixadas por 1 h em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em um tampão de cacodilato de sódio, pH 7,2. As células foram então desidratadas em séries crescentes de etanol e secagem através do ponto crítico no *Critical Point dryer* HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

4.9 Avaliação da integridade da membrana plasmática e do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$)

Objetivando a análise dos potenciais efeitos dos compostos sobre a membrana plasmática e membrana mitocondrial de *L. infantum*, utilizou-se o Iodeto de Propídio (IP) e a Rhodamina 123 (Rod 123) para certificar alterações celulares, por análise quantitativa.

Para análise do possível efeito dos compostos selecionados sobre a membrana plasmática, parasitos nas formas promastigotas ($2x10^6$ células/mL) tratados (com os melhores compostos) e não tratados foram incubados na concentração correspondente a IC_{50} e 2x IC_{50}, por 72 h. As alíquotas do controle positivo foram previamente centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante, e adicionada a saponina 0.1% por 30 min. Passado esse

intervalo de incubação, todas as amostras foram centrifugadas e descartado o sobrenadante. Posteriormente, as células foram marcadas com 50 μg/mL IP por 15 min. Ao final do tempo de marcação, as células foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software *Cell Quest*.

Promastigotas marcadas com Rodamina 123 (Rod 123) foram analisadas para se certificar de possíveis efeitos no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$). O controle positivo corresponde ao Peróxido de Oxigênio - H_2O_2 1 μM (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). O mesmo protocolo estabelecido na marcação anterior, foi utilizado para Rod 123. Ao final do tempo de sua incubação, as células foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através do canal FL2-H. Um total de 50.000 eventos analisados por amostra. Os resultados foram emitidos em porcentagem de promastigotas marcadas para cada condição testada. Alterações na fluorescência foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação (MT-MC)/MC, onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento.

4.10 Análise estatística

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. Para as análises de significância foi realizada ANOVA e o pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Tiossemicarbazona e tiazól: avaliação in vitro da atividade leishmanicida e ultraestrutural frente à Leishmania infantum

Introdução

As leishmanioses são causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania* e consideradas um problema de saúde pública. A Leishmaniose Visceral (LV), popularmente conhecida como calazar é a forma mais grave dessa parasitose, acometendo indivíduos de todas as faixas etárias podendo levar a óbito até 95% dos casos quando não tratados, refletindo aproximadamente de 20-30 mil mortes anualmente (WHO, 2018).

O tratamento das leishmanioses é uma grande problemática, já que os fármacos disponíveis apresentam problemas no modo de administração, alta toxicidade, custos elevados e relatos de resistência do parasito aos fármacos disponíveis. No Brasil, a terapia para LV segue
o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde há mais de 60 anos, sendo baseada primeiramente nos antimoniais pentavalentes (Glucantime e Pentostan) e na Anfotericina B (AmB), como fármaco de segunda escolha (BRASIL, 2016). No entanto, o uso desses fármacos está associado a severos efeitos colaterais dentre eles os nefrotóxicos e cardiotóxicos (JOSHI et al., 2014). Dessa forma, a demanda por novos medicamentos e novos alvos para tratar a LV é uma necessidade urgente no Brasil e no mundo (BRASIL, 2016; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015), especialmente por não existir uma vacina humana eficaz para as leishmanioses.

Vários esforços têm sido realizados para encontrar tratamentos apropriados para reduzir o impacto da doença. Uma maneira pragmática de possibilitar a otimização de candidatos a fármacos é reestruturando classes de compostos que apresentam atividade biológica já descrita na literatura, além de atividade contra parasitos intracelulares com baixa toxicidade para células hospedeiras de mamíferos (FRANZÉN, 2000). Nessa perspectiva, a química heterocíclica corresponde a uma promissora área devido ao quase ilimitado número de combinações estruturais criadas, com as mais distintas propriedades física, químicas e biológicas, tornando-se um marco para a comunidade científica (KAUSHIK et al., 2013).

A literatura descreve a importância de derivados heterocíclicos relacionados a aplicação de vários fármacos com ações diferenciadas. A classe tiossemicarbazona é um grupo químico promissor para o tratamento da LV em razão de seu leque de atividade biológica, como descritos

por De Oliveira Filho et al. (2015) e Cardoso et al. (2014), que confirmaram a potente ação frente as formas de tripanossomatídeos. Além disso, Pavan et al. (2010), Caputto et al. (2011), Glisoni et al. (2012) e Lukmantara et al. (2013) descreveram ação antibacteriana, antiparasitária, antiviral e anticâncer, respectivamente.

A classe dos tiazóis é particularmente encontrada em inúmeros medicamentos (MELO et al., 2006) devido as suas várias atividades farmacológicas como antihelmíntica com atividade esquistossomicida, onde pôde-se observar alterações ultraestruturais (SANTIAGO et al., 2014), antibacteriana (BHARTI et al., 2010), antifúngica (SUDO et al., 2010), antihistamínica, antiviral, anti-inflamatória (VERMA; SARAF, 2008), antimicrobiana (BOZDAG-DUNGAR et al., 2007), e antiprotozoária (LIESEN et al., 2008) com atividade leishmanicida frente a *L. infantum* (ALIANÇA et al., 2017).

Diante desse cenário, estudos sobre novos compostos derivados da classe tiossemicarbazona e tiazól que atuem com maior seletividade a *L. infantum*, causando poucos efeitos às células de mamífero, fortalece a necessidade da busca de novos agentes terapêuticos. O presente estudo avaliou o efeito de novos compostos das classes tiossemicarbazona e tiazól, contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, bem como, citotoxicidade, atividade hemolítica em hemácia e a produção dos níveis de óxido nítrico em macrófagos.

Metodologia

Avaliação de compostos: Os compostos JW-16.2, JW-37.2, GT-12 e GT-14 foram obtidos e purificados conforme Espíndola et al. (2015) e De Oliveira Filho (2017). Todos foram quimicamente caracterizados por técnicas espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de massas e a análise elementar (pureza >95%) (ESPÍNDOLA et al., 2015). Para os ensaios *in vitro* cada composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) a 1%. Cada solução foi então dissolvida em meio de cultura adequado para cada experimento, RPMI para macrófagos/amastigotas e Schneider para promastigotas, objetivando obter diferentes concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) para as análises. As soluções foram preparadas minutos antes de iniciar os experimentos para garantir a estabilidade dos compostos. As Leishmanias incubadas com meio de cultura e meio de cultura adicionado de Anfotericina B (AmB) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram consideradas controle negativo e positivo, respectivamente. A concentração de DMSO foi estimada em 1% na diluição dos compostos.

Parasitos e condições de cultura: Promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/BH 46) foram acondicionadas a 26 ºC em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina-Estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Esses parasitos em fase de crescimento exponencial foram utilizados nos testes. As formas amastigotas foram obtidas por inoculação de formas promastigotas infectivas em cultura de macrófagos peritoneais coletados de acordo com Teixeira et al. (2002).

Atividade biológica de *Leishmania infantum:* Visando um *screening* inicial dos compostos, foram utilizadas promastigotas na concentração de $1x10^6$ parasitos/mL. As promastigotas foram incubadas nas concentrações 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL com os compostos JW-16.2, JW-37.2 (de classe tiossemicarbazona), GT-12 e GT-14 (de classe tiazól) por 72 h e seu crescimento acompanhado diariamente através de contagens na câmara de Neubauer (iNCYTO CChip DHC-N01, Cheonan-Si, Coréia do Sul). As leishmanias incubadas apenas com meio Schneider, foram consideradas controle negativo e incubadas com AmB nas mesmas concentrações testes (6.25 a 100 μg/mL) para o controle positivo. A concentração que inibe 50% do crescimento do parasito (IC_{50}) foi determinada por regressão linear após 72 h de cultivo pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar atividade na literatura internacional. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

Células de mamíferos: Para os testes de citotoxicidade foram utilizados macrófagos J774. Essas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37 ºC a 5% de CO_2. Os macrófagos peritoneais, para o teste com as formas amastigotas, foram coletados de camundongo machos de linhagem Balb/c, de acordo com o protocolo descrito por Aliança et al. (2017). Todos os procedimentos seguiram a conduta ética estabelecida pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ/PE), sob número de protocolo 84/2015.

Análise da citotoxicidade: O teste de citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliado através do ensaio de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, que baseia-se na redução de sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células

metabolicamente ativas (ALIANÇA et al., 2017). As células foram semeadas em placa de 96 poços ($1x10^5$ células/poço) em várias concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL) por 48 h incubadas a 37 ºC em 5% de CO_2. Para a leitura de absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA, Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA), com comprimento de onda de 490nm. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade das células saudáveis em 50% (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para citotoxicidade atividade na literatura internacional. O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} para cada composto. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

Atividade biológica *in vitro* sobre as formas amastigotas de *L. infantum*: Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram coletados e semeados em placas de 24 poços, a uma concentração de $1x10^5$ células/mL, contendo uma lamínula de vidro, com meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e incubadas a 37 ºC a 5% de CO_2. Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com PBS estéril para retirar os macrófagos que não aderiram à lamínula e, em seguida, foram adicionados 500 µL da suspensão de promastigotas *L. infantum* na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago, por 3 h. Após a infecção, e seguindo a literatura (ALIANÇA et al., 2017), os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações $½_x IC_{50,} IC_{50}$ e $2x\ IC_{50}$, (1.90, 3.81 e 7.62 µM) de JW-16.2 e (2.58, 5.16 e 10.32 µM) de GT-14 e incubados a 37 ºC a 5% de CO_2. Após 24 h de tratamento as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 h de cultivo por análise de regressão linear e convertida à concentração micromolar (uM) de acordo com o peso molecular de cada composto. O índice de sobrevivência (ISo) foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A AmB foi utilizada como controle positivo, enquanto os macrófagos sem tratamento correspondem ao controle negativo.

Atividade hemolítica: A ação hemolítica dos compostos foi realizada através da técnica sobre hemácias de carneiro, descrita por Becerra et al. (2012). A diluição dos compostos foi realizada

com DMSO 1%, seguida pela microdiluição seriada em solução salina (NaCl 0,85% e $CaCl_2$ 10 nM) em microplacas de poliestireno e fundo "U" com 96 poços. Em paralelo, 2 mL de sangue total homogeneizado foram dissolvidos em 18 mL de solução salina. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 2.500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado, com repetição dessa etapa por 3 vezes. Cada poço continha solução eritrocitária a 2% e o composto dissolvido (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL). Foi adicionado um controle positivo de lise celular com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% e um controle negativo usando solução salina + DMSO 1%. Após incubação por 3 h a 37 ºC sob agitação constante, as microplacas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 4 ºC, para separação entre o sobrenadante e o pellet. Por fim, o sobrenadante foi removido para outra placa de poliestireno com 96 poços de fundo chato para leitura em espectrofotômetro, (Benchmark plus, BioRad®, Califórnia, EUA) com filtro de 540 nm para estimar o percentual de hemólise.

Produção de Óxido Nítrico (ON): Através do método colorimétrico reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% NED/H_3PO_4 á 2.5%) (Promega, Madison, USA), foi analisado o ON produzido pelos macrófagos peritoneais, infectados com *L. infantum*, tratados e não tratados com as concentrações testes (6.25 a 100 µg/mL) dos compostos derivados da classe tiossemicarbazona e tiazól, JW-16.2 e GT-14 respectivamente. O reagente Griess foi utilizado segundo instruções do fabricante. Foi utilizado 100 µL de sobrenadante da cultura de macrófagos tratados ou não com os compostos, por 48 h, foram incubados com 100 µL do reagente Griess à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi determinada utilizando filtro de 540 nm em leitor de ELISA. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Macrófagos não tratados foram utilizados como controle.

Análises ultraestruturais de *L. infantum*: Os compostos que apresentaram melhores IS, JW-16.2 e GT-14, foram selecionados para a análise ultraestrutural. As formas promastigotas não tratadas e tratadas por 72 h com concentrações 3.81 e 7.62 µM de JW-16.2 e 5.16 e 10.32 µM de GT-14 foram lavadas e fixadas em solução de glutaraldeído a 2.5%, formaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0.1 M, pH 7.4, e processadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Eletrônica de Varredura (MEV).

Para MET, as formas promastigotas foram lavadas e pós-fixadas durante 2 h em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em cacodilato de sódio tampão, a pH 7.2. As amostras foram então desidratadas em série crescente de acetona, infiltradas em concentrações crescentes de resina e incorporadas em EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os blocos foram polimerizados em estufa a 70 ºC por 72 h. Cortes ultrafinos (~70nm de espessura), foram obtidos em

ultramicrótomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha), corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados no microscopio eletrônico de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, EUA).

Para MEV formas promastigotas foram fixadas às lamínulas revestidas por poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 min, as lamínulas foram lavadas em solução tampão para remover as células não aderentes e, posteriormente, pós-fixadas por 1 h em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão de cacodilato de sódio, pH 7.2. As células foram então desidratadas em série crescente de etanol e submetidas para secagem no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), metalizado com 20 nm de ouro em um sputter JFC-1100 e examinadas sob um microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

Avaliação da Integridade de Membrana Plasmática: As formas promastigotas de *L. infantum* ($2x10^6$ células/mL) foram tratadas com 9.66 e 19.32 µM de JW-16.2 e 13.50 e 27.04 µM de GT-14, por 72 h. As alíquotas do controle positivo foram previamente centrifugadas a 3000rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e adicionada a saponina 0.1% por 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e descartados os sobrenadantes. Posteriormente, as células foram marcadas com 50 µg/mL de Iodeto de Propídio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 min. Logo após as células foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através do canal FL2-H. Um total de 50.000 eventos analisados por amostra. Os resultados foram emitidos em porcentagem de promastigotas marcadas para cada condição testada.

Avaliação do potencial de mitocôndria (ΔΨm): Com o objetivo de avaliar o potencial da membrana mitocondrial (ΔΨm), as formas promastigotas de *L. infantum* ($2x10^6$ células/mL) foram tratadas com 9.66 e 19.32 µM de JW-16.2 e 13.50 e 27.04 µM de GT-14, por 72 h. Leishmanias solubilizadas com Peróxido de Hidrogênio - H_2O_2 1 µM (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), correspondem ao controle positivo, foi previamente centrifugado a 3000 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e incubado com H_2O_2 por 1 h em BOD a 26 ºC. Após este intervalo, as amostras tratadas e não tratadas foram incubadas com 2 µg/mL de Rodamina 123 (Rod 123) por 30 min e, em seguida, lavadas três vezes com PBS 1x. Após a incubação, todas as amostras foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através do canal FL1-H. Um total de 50.000 eventos analisados por

amostra. Os resultados foram emitidos em porcentagem de promastigotas marcadas para cada condição testada. As alterações na fluorescência, o que corresponde à polarização da membrana mitocondrial, foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação (MT-MC)/MC, onde MT é a intensidade mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a intensidade da mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (ALIANÇA et al., 2017).

Análise estatística: As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. Para as análises de significância foi realizada ANOVA e o pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

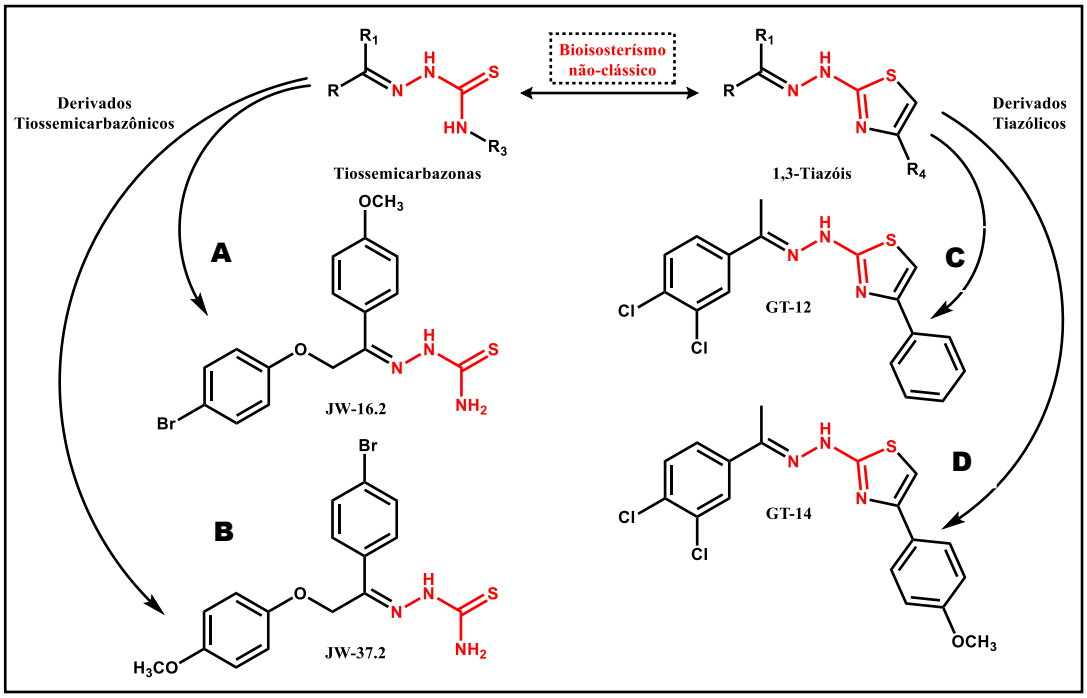
Considerações éticas: O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/Pernambuco sob o número de protocolo 84/2015.

Resultados

Atividade biológica sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*:

Os compostos foram selecionados pela relação bioisostérica entre o núcleo tiossemicarbazona e o 1,3-tiazól, sendo selecionados dois compostos derivados tiossemicarbazônicos (JW-16.2 e JW-37.2) e dois derivados tiazólicos (GT-12 e GT-14) (Fig. 1).

Figura 1- Relação bioisostérica entre tiossemicarbazonas e tiazóis.



Legenda: (A) composto JW-16.2; (B) composto JW-37.2; (C) composto GT-12; (D) composto GT-14.

O composto JW-16.2 possui o substituinte Bromo (Br) ligado ao anel fenoxil na posição *para* e o metoxi na posição *para* do anel fenil. Enquanto o composto JW-37.2 possui o metoxi na posição *para* do fenoxi e Br na posição *para* do anel fenil (ESPÍNDOLA et al., 2015) (Fig. 1A e B).

Os demais compostos possuem substituintes diferentes na posição C4 do anel tiazólico (Fig. 1C), partindo do fenil como anel aromático de referência, o substituinte metoxi inserido (Fig.1D), é o principal diferenciador entre as duas estruturas estudas da classe tiazól (DE OLIVEIRA FILHO, 2017).

Os resultados da concentração que inibe o crescimento em 50% (IC_{50}) das promastigotas de *L. infantum* demonstraram que todos os compostos testados apresentaram ação leishmanicida, sendo capazes de inibir o crescimento destas formas. O valor da IC_{50}, calculada com 72 h, variou de 8.62 a 34.36 µM (Tab. 1). Os compostos que demonstraram maior inibição de crescimento foram JW-37.2 (8.62 µM) e JW-16.2 (9.66 µM) e os que inibiram menos, GT-12 (34.36 µM) e GT-14 (13.50 µM). A AmB apresentou grande eficácia contra as formas promastigotas de *L. infantum*, com baixos valores de IC_{50} (Tab. 1).

Tabela 1 - Ação dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e macrófagos J774.

Compostos	µM		IS
	IC_{50}	$CC_{50\ (J774)}$	
JW-16.2	9.66 ± 0.10	184.58 ± 0.41	19.0
JW-37.2	8.62 ± 0.00	31.8 ± 6.82	3.7
GT-12	34.36 ± 1.80	85.24 ± 11.89	2.9
GT-14	13.50 ± 0.90	196.38 ± 0.35	15.0
AmB	0.047 ± 0.03	37.61 ± 1.40	808.1

- IC_{50}: Concentração que inibi em 50% o crescimento das promastigotas de *L. infantum;*
- CC_{50}: Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% das células de mamífero;
- IS (Índice de seletividade): CC_{50} das células de mamíferos / IC_{50} *L. infantum;*
- AmB: Anfotericina B; ON- Dosagem de Óxido Nítrico.
*: correspondem à diferença significativa em relação ao controle ($p<0.05$), ANOVA teste de Dunnett. S: produção significativa; N: produção não significativa.

Análise da citotoxicidade:

Os valores da CC_{50} para os macrófagos J774 variaram entre 31.8 a 196.38 µM (Tab. 1). O índice de seletividade (IS = CC_{50}/IC_{50}) dos compostos variou de 2.9 a 19. O composto JW-16.2 apresentou o maior IS, sendo 19 vezes mais seletivo seguido do GT-14, 15 vezes mais seletivo. Ambos também foram efetivos na inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*. O composto JW-37.2 mostrou-se mais citotóxico (31.8 µM) do que a AmB (37.61 µM). O composto JW-16.2 que apresentou o melhor IS, dentre os estudados, também se mostrou muito eficaz na inibição das formas promastigotas.

A CC_{50} para os macrófagos peritoneais demonstrou que a concentração citotóxica mínima do composto JW-16.2 foi de 362.65 ± 90 µM, GT-14 foi de 635.33 ± 83 µM, enquanto a AmB mostrou concentração citotóxica de 74.86 ± 9.5 µM (Tab. 2). O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da divisão da citotoxicidade dos macrófagos pela atividade contra as formas amastigotas (IS = CC_{50}/ IC_{50}). Nossos achados mostraram que o composto GT-14 é mais

seletivo frente às formas amastigotas que para os macrófagos peritoneais com IS = 38.5, enquanto o composto JW-16.2 foi 15 vezes mais seletivo para as amastigotas (Tab. 2).

Tabela 2 - Ação dos compostos sobre as formas amastigotas de *L. infantum* e macrófagos peritoneais.

Compostos	µM		IS
	IC_{50} (Amastigotas)	CC_{50} (Macrófagos peritoneais)	
JW-16.2	24.39 ± 0.17	362.65 ± 90	15
GT-14	16.51 ± 3.0	635.33 ± 83	38.5
AmB	2.1 ± 0.1	74.86 ± 9.5	35.6

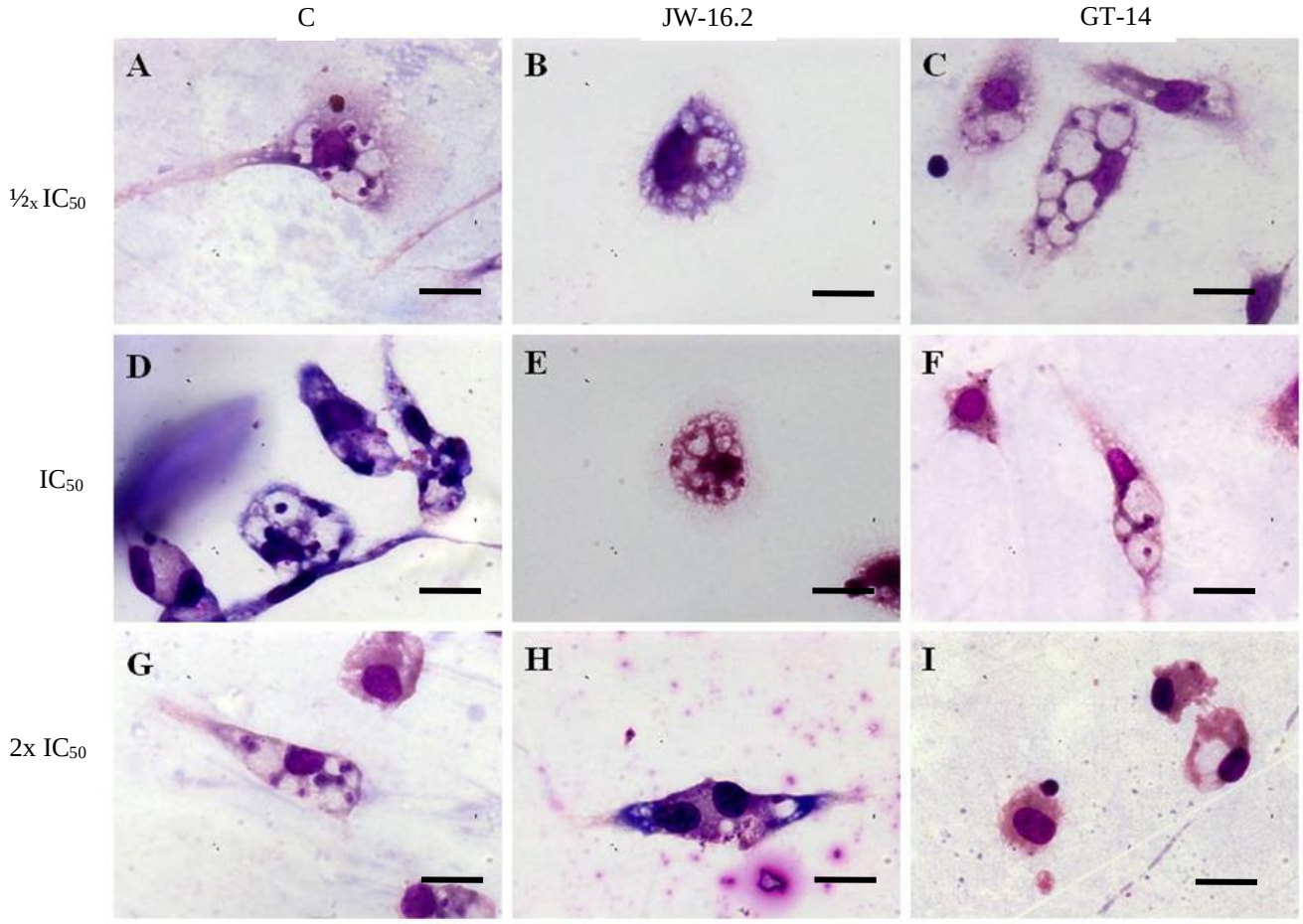
- IC_{50}: Concentração que inibi em 50% o crescimento das amastigotas de *L. infantum;*
- CC_{50}: Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos peritoneais;
- IS (Índice de seletividade): CC_{50} das células de mamíferos / IC_{50} *L. infantum;*
- AmB: Anfotericina B.

Ação leishmanicida dos compostos sobre as formas amastigotas:

Na avaliação contra as formas amastigotas, os compostos JW-16.2 e GT-14 foram os mais ativos, mostrando-se capazes de induzir, em 24 h, ação leishmanicida sobre os parasitos de *L. infantum* em macrófagos peritoneais de camundongos diminuindo dessa forma o número de amastigota por macrófagos (Fig. 2). A concentração que inibiu 50% do crescimento das formas amastigotas (IC_{50}) foi 24.39 µM para o composto JW-16.2 e 16.51 µM para o GT-14 (Tab. 2).

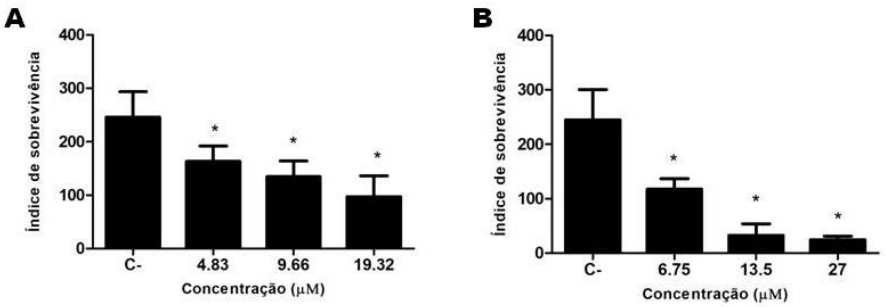
Nossos resultados mostraram que os compostos reduziram significativamente, no tempo de 24 h, o índice de sobrevivência das formas amastigotas no interior dos macrófagos nas três concentrações testadas do composto JW-16.2; (4.83, 9.66 e 19.32 µM) e GT-14 (6.75, 13.5 e 27 µM) (Fig. 3).

Figura 2 - Macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. infantum* e tratados por 24 h com os compostos.



Legenda: (A) células não tratadas do JW-16.2. (D) células não tratadas do GT-14. (G) células não tratadas por 24 h. (B) células tratadas com 4.83 µM do composto JW-16.2. (C) células tratadas com 6.75 µM do composto GT-14. (E) Promastigotas tratadas 9.66 µM do composto JW-16.2. (F) Promastigotas tratadas 13.5 µM do composto GT-14. (H) Promastigotas tratadas 19.32 µM do composto JW-16.2. (I) Promastigotas tratadas 27 µM do composto GT-14. Barras = 100 µm.

Figura 3 - Índice de sobrevivência (Iso) de amastigotas em macrófagos peritoneais infectados por *L. infantum* após 24 h de tratamento.

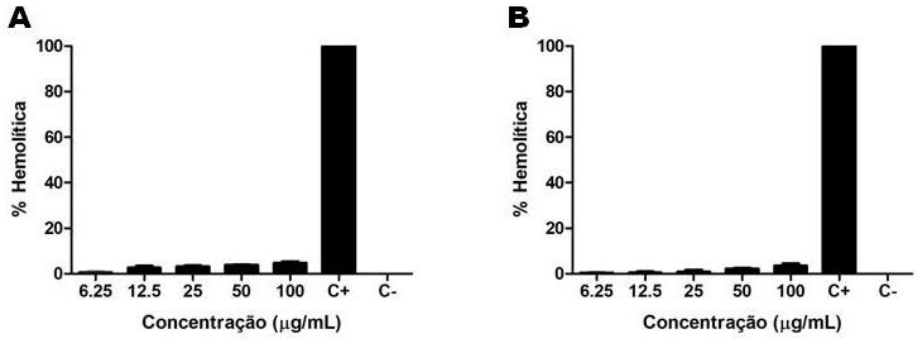


Legenda: (A) composto JW-16.2. (B) composto GT-14. Cada barra corresponde à média de dois experimentos em duplicata biológica e triplicata técnica ± desvio padrão. C-: controle negativo. *Significância de cada média em relação ao controle (ANOVA, p <0.05). Índice de sobrevivência expresso em frequência.

Atividade hemolítica:

De acordo com os testes para a atividade hemolítica (Fig. 2), observou-se que a maioria das amostras possui uma resposta dose dependente. Os compostos JW-16.2 e GT-14 foram testados com as concentrações testes (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) e analisados segundo suas médias e erros-padrão. Verifica-se que, na concentração de 1 μM, o composto JW-16.2 e GT-14 apresentou aproximadamente 5% e 4% de efeito hemolítico, respectivamente (Fig. 4).

Figura 4 - Efeito hemolítico dos compostos em hemácias de carneiro.

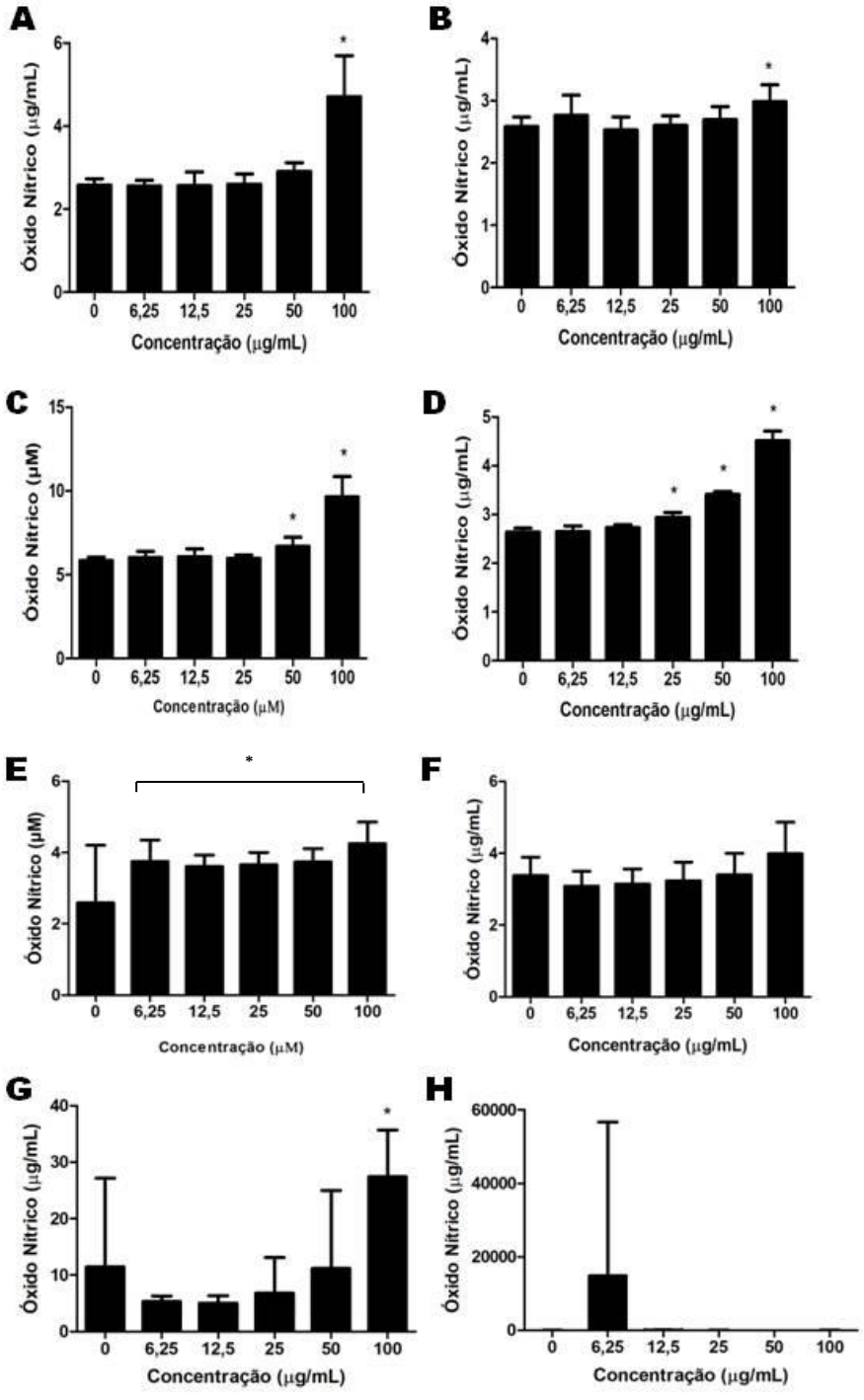


Legenda: (A) JW-16.2. (B) GT-14; C+ = Triton X-100 a 1%; C- = solução salina + DMSO 1%

Produção de Óxido Nítrico (ON):

A análise da produção de ON pelos macrófagos infectados com *L. infantum* e não infectados tratados com os compostos (JW-16.2, JW-37.2, GT-12 e GT-14) nas concentrações testadas (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL), demonstrou que os quatro compostos induziram aumento de ON estatisticamente significativo ($p < 0.05$) na maior concentração testada nos macrófagos não infectados com *L. infantum.* Enquanto o GT-14 induziu produção nas concentrações 25, 50 e 100 μg/mL (Fig. 5). Já na produção de ON pelos macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* e tratados com JW-16.2 e GT-14, observou-se um aumento de ON estatisticamente significativo, pelo composto JW-16.2, na concentração 100 μg/mL. A AmB induziu produção significativa de ON pelos macrófagos peritoneais não infectados, entretanto, não houve produção significativa nos macrófagos infectados com *L. infantum.*

Figura 5 - Produção de Óxido Nítrico (ON) por macrófagos peritoneais tratados com os compostos.



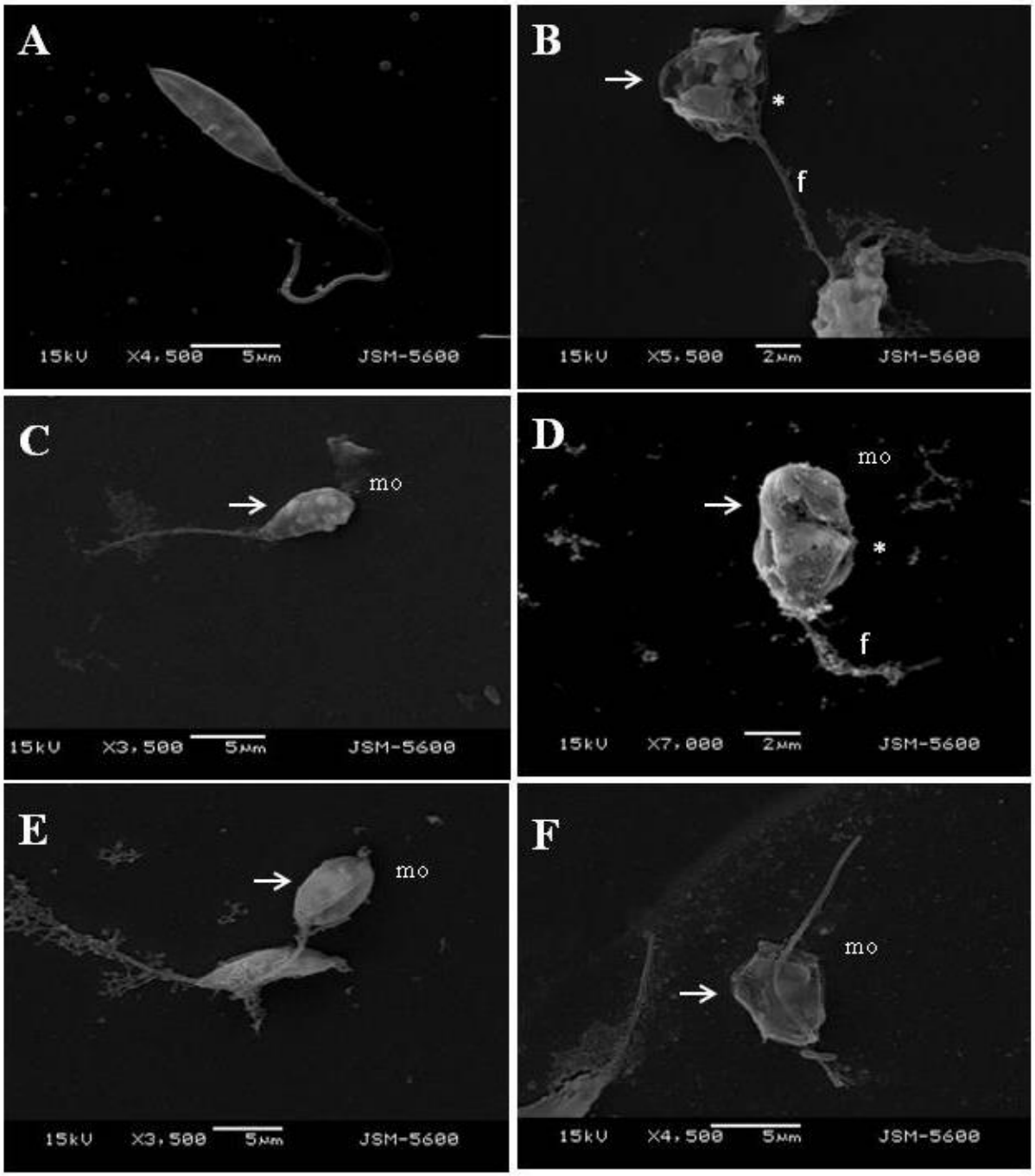
Legenda: Macrófagos peritoneais não infectados tratados com (A) JW-16.2, (B) JW- 37.2, (C) GT-12, (D) GT-14, (E) AmB. Macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* tratados com: (F) AmB, (G) JW-16.2, (H) GT-14. * Significância em relação ao controle (0) (ANOVA, $p < 0.05$).

Análises Ultraestruturais:

As alterações na ultraestrutura das formas promastigotas dos grupos controles (meio + DMSO e AmB) e tratados com os compostos JW-16.2 e GT-14 foram analisadas por microscopia eletrônica.

Na análise através do MEV observou-se que as promastigotas de *L. infantum* não tratadas exibiram uma morfologia fusiforme típica do parasito, além de uma superfície topologicamente normal e um flagelo longo, livre e preservado (Fig. 6A). Já as promastigotas submetidas ao tratamento com AmB, apresentaram alterações visíveis na morfologia com encolhimento do corpo celular e do flagelo. Presença de bolhas e enrugamento na membrana plasmática, com exposição do conteúdo citoplasmático (Fig. 6B). As promastigotas tratadas nas concentrações 9.66 e 19.32 μM do composto JW-16.2 e 13.50 e 27 μM GT-14, mostraram alterações na topologia celular apresentando corpo com ondulações/enrugamento, morfologia variando de formato fusiforme para ovoide, além de desintegração na membrana do parasito (Fig. 6C-F). Alteração morfológica do flagelo, como retração, também foi observado (Fig. 6E-F). Na maior concentração dos compostos JW-16.2 (19.32 μM) e GT-14 (27 μM), respectivamente, as alterações morfológicas foram mais visíveis (Fig. 6D-F), ondulações de membrana mostraram-se mais evidentes resultando em alteração da morfologia fusiforme para morfologia mais oval.

Figura 6 - Eletromicrografias de transmissão de promastigotas de *L. infantum* tratadas por 72 h.

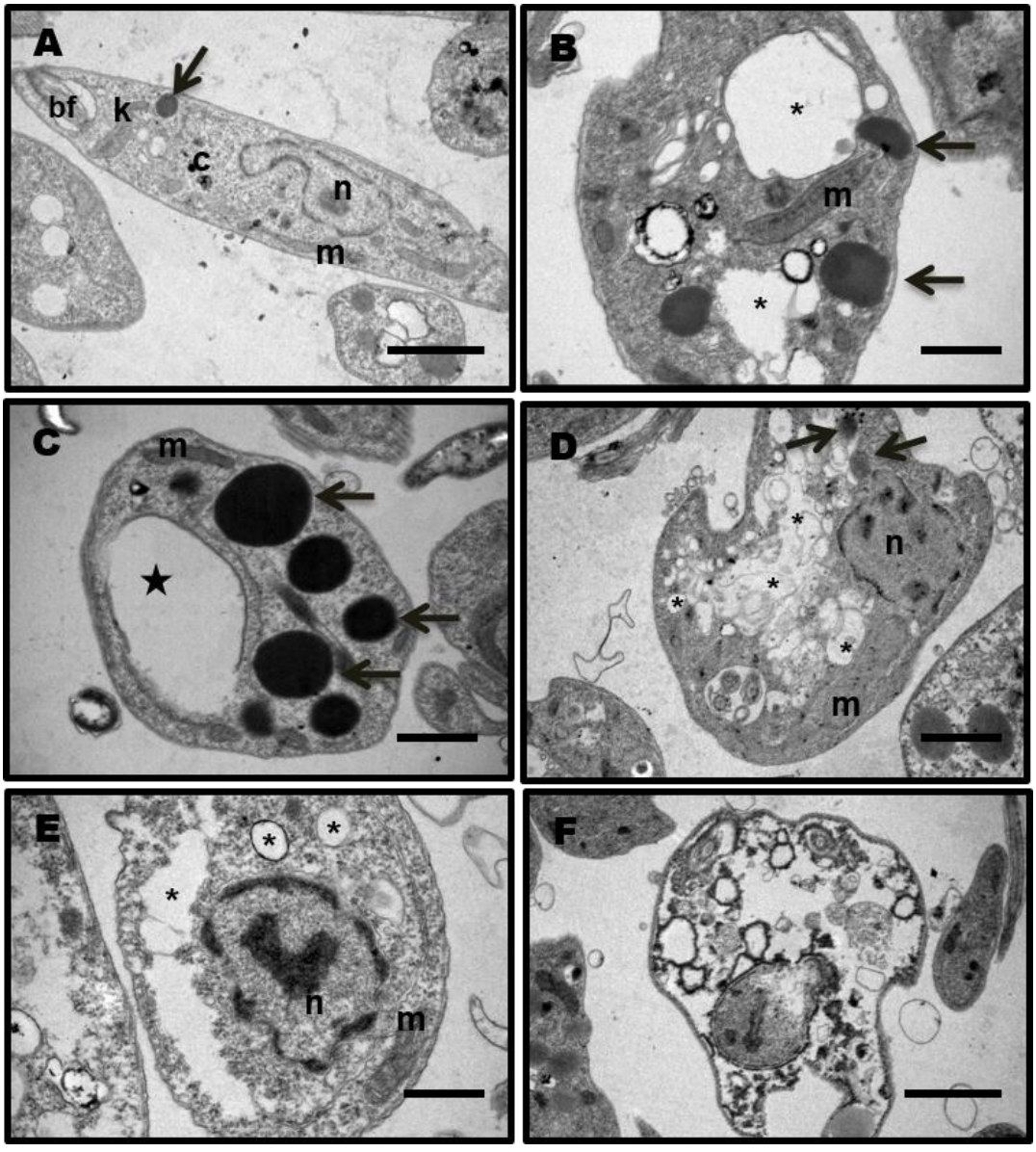


Legenda: (A) DMSO, controle negativo. (B) AmB, controle positivo. (C-D) tratados com 9.66 e 19.32 µM do composto JW-16.2, respectivamente. (E-F) tratados com 13.50 e 27 µM do composto GT-14, respectivamente. Encolhimento do corpo celular (seta) e do flagelo (f), bolhas e enrugamento na membrana plasmática, com exposição do conteúdo citoplasmático (*), morfologia oval (mo).

As análises ultraestruturais através do MET mostraram que no grupo tratado com meio + DMSO, as promastigotas de *L. infantum* apresentaram forma e a morfologia celular normais,

além do citoplasma íntegro com organelas bem preservadas (Fig. 7A). Nas células tratadas com a AmB a 0.047 μM, foi possível observar inchaço mitocondrial, intensa vacuolização do citoplasma, presença de estruturas eletron-densas e eletron-luscente (Fig. 7B). Quando submetidas ao tratamento com o composto o JW-16.2, na concentração de 9.66 μM, foi possível notar a presença grandes estruturas eletron-densas e vacuolização do citoplasma (Fig. 7C), enquanto na concentração de 19.32 μM foi possível observar inchaço mitocondrial, núcleo picnótico e algumas partículas eletron-densas (Fig. 7D). As análises das promastigotas tratados com o composto GT-14, nas concentrações de 13.50 e 27 μM mostraram alterações. Quando tratadas com GT-14 a 13.50 μM, observou-se presença de vacuolização do citoplasma e inchaço mitocondrial (Fig. 7E). Na concentração de 27 μM observou-se desorganização citoplasmática, com intensa vacuolização e núcleo degenerado (Fig. 7F).

Figura 7 - Eletromicrografias de transmissão em promastigotas de *L. infantum* tratados por 72h.



Legenda: (A) meio + DMSO, promastigotas apresentando forma normal com membrana plasmática, citoplasma (c) e núcleo (n) com integridade, organelas como mitocôndria (m), cinetoplasto (k) e bolsa flagelar (bf) bem preservados e presença de estrutura eletron-densas (seta). (B) AmB, promastigotas mostrando alteração na membrana plasmática, citoplasma vacuolizado (asteriscos), inchaço mitocondrial (m) e aumento de estruturas eletron-densas (setas); (C-D) composto JW-16.2, 9.66 µM e 19.32 µM, respectivamente, em (C) citoplasma com presença de grande espaço eletron-luscente (estrela), mitocôndria (m) preservada e aumento de corpos eletron-densos (setas). (D) observar intensa vacuolização do citoplasma (asteriscos), inchaço mitocondrial (m) e estruturas eletron-densas (setas) e núcleo picnótico (n), (E-F) composto GT-14, 13.50 µM e 27 µM, respectivamente, em (E) desorganização com vacuolização do citoplasma (asteriscos), inchaço mitocondrial (m) e núcleo (n) com cromatina condensada; (F) célula com destruição de membrana plasmática, citoplasma e núcleo.

Avaliação do efeito dos compostos JW-16.2 e GT-14 na Integridade de membrana plasmática e Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm):

Células tratadas, com os compostos JW-16.2 e GT-14, e não tratadas foram submetidas à marcação com Rodamina 123 (Rod 123) e Iodeto de Propídio (IP) com a finalidade de avaliar os efeitos causados pelos compostos sobre a integridade do potencial de mitocôndria e membrana plasmática, respectivamente. A Rod 123 é um corante catiônico utilizado para marcar membranas mitocondriais de células viáveis, enquanto o IP se liga ao DNA de células apenas quando há alteração de sua membrana plasmática. As análises do efeito dos compostos frente a *L. infantum* foram realizadas de forma quantitativa, através da citometria de fluxo.

Poucas células não tratadas, que correspondem ao controle negativo, foram marcadas (0.03%) com IP, enquanto o grupo tratado com saponina, que corresponde ao controle positivo, foi marcado 81.82%. Células tratadas por 72 h em concentrações de 9.66 e 19.32 μM do composto JW-16.2 e 13.50 e 27 μM do composto GT-14 demonstraram aumento na porcentagem de células marcadas com IP, contudo mostrando não ser dose dependente para o composto GT-14 (Tab.3).

Tabela 3 - Efeito dos compostos JW-16.2 e GT-14 na integridade da membrana plasmática.

Tratamento	IP+ (%)
Controle	0.03
Saponina	81.82
JW-16.2 (9.66μM)	0.39
JW-16.2 (19.32μM)	0.58
GT-14 (13.50μM)	1.06
GT-14 (27μM)	0.73

Legenda: IP + = porcentagem de células positivas para o Iodeto de Propídio.

A tabela 4 representa as alterações induzidas pelos compostos JW-16.2 e GT-14 no ΔΨm. O controle negativo mostrou incorporação da Rod 123 na mitocôndria dos parasitos, destacando que o Δψm apresentava-se preservado nestas células.

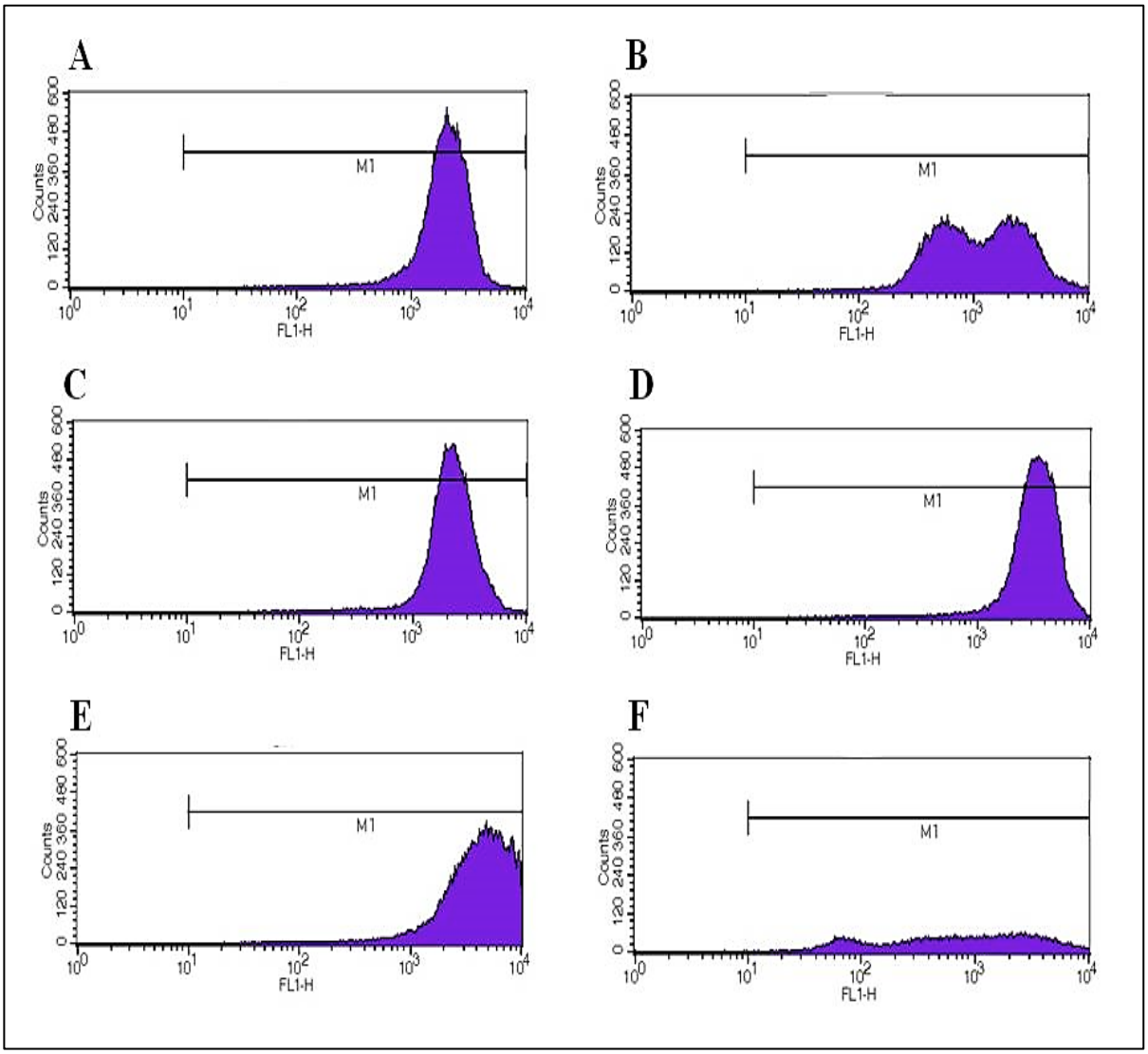
Tabela 4 - Efeito dos compostos JW-16.2 e GT-14 na integridade da membrana mitocondrial utilizando o marcado Rodamina 123.

Tratamento	Mediana (M)	IV
Controle	1980.96	0
Peróxido de Hidrogênio	1134.19	- 0,42
JW-16.2 (9.66µM)	2128.75	0.07
JW-16.2 (19.32µM)	3248.77	0.63
GT-14 (13,50µM)	4179.21	1.10
GT-14 (27µM)	813.12	- 0,58

IV - Índice de Variação = MT – MC/MC, onde MT é a mediana da intensidade de fluorescência em células tratadas; MC é a mediana da intensidade de fluorescência em células não tratadas (controle negativo).

Pouca variação foi observada nas células tratadas na concentração de 9.66 e 19.32 µM de JW-16.2 e 13.50 µM de GT-14, as quais se mantiveram intensamente marcadas pela Rod 123, como pode ser visto no deslocamento do histograma para direita, demonstrando assim que não houve despolarização do ΔΨm com intensidade de fluorescência muito semelhante ao controle negativo (Fig. 8). No entanto, promastigotas tratadas com 27µM de GT-14 demonstraram despolarização do ΔΨm, assim como as incubadas com o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) apresentaram uma redução no valor da porcentagem de marcação quando comparado ao controle. A redução na fluorescência foi quantificada pelo cálculo do Índice de Variação (IV) calculado pela equação (MT-MC)/MC, onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento (Tab. 4).

Figura 8 - Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos JW-16.2 e GT-14 e marcadas com Rod 123



Legenda: (A) controle de promastigotas; (B) promastigotas tratados com H_2O_2; (C-D) promastigotas tratados com 9.66 e 19.32 µM do composto JW-16.2; (E-F) promastigotas tratados com 13.50 e 27 µM do composto GT-14.

Discussão

As tiossemicarbazonas e os tiazóis correspondem a classes que têm sido amplamente estudadas devido à vasta ação farmacológica e possibilidade de mudanças em seus constituintes que coordenam seu mecanismo de ação, a exemplo de atividade antimicrobiana, antiviral, antitumorais, antiparasitária, entre outras (SANTIAGO et al., 2014; LUKMANTARA et al., 2013; GLISONI et al., 2012; BHARTI et al., 2010; PAVAN et al., 2010; SUDO et al., 2010; BOZDAG-DUNGAR et al., 2007; LIESEN et al., 2008; VERMA; SARAF, 2008).

No presente estudo, demonstrou-se que os compostos da classe tiossemicarbazona, JW-16.2 e JW-37.2, são classificados como isômeros constitucionais, os quais apresentam a mesma fórmula molecular, porém se diferenciam nas suas fórmulas estruturais, e juntamente com os compostos da classe tiazól GT-14 e GT-12 apresentaram ação leishmanicida sobre as formas promastigotas. Espídola et al. (2015) avaliando vários compostos da classe aril-tiossemicarbazonas, inclusive o JW-16.2 e JW-37.2 utilizados no presente estudo, descreveram ação destes compostos contra as formas evolutivas de *T. cruzi*, demonstrando dessa forma, a ação tripanocida de compostos dessas classes.

As atividades desencadeadas pelos compostos estão relacionadas a presença de substituintes nos seus radicais. Os compostos que apresentam o substituinte metóxi ligado ao anel fenil, JW-16.2 e GT-14, mostraram-se mais eficazes na atividade leishmanicida. Em estudos de Aliança et al. (2017) e Pinto et al. (2014) ficou claro a importância do anel fenil na atividade do composto, onde os autores sugeriram que compostos com um ou mais anel fenil apresentam maior atividade leishmanicida. Dessa forma, pode-se inferir que o substituinte metóxi no anel fenil potencializou a ação contra *L. infantum* no presente estudo. Alterações nos substituintes e posições *para* dos substituintes no anel fenil mostraram diferenças *in vitro* na atividade destes compostos.

No estudo de Espídola et al. (2015), com compostos aril-tiossemicarbazonas que apresentavam variações estruturais (substituintes) na posição *para* do anel fenil proveniente das 2-haloacetofenonas, observando-se que, em geral, as substituições no anel não favoreceram a atividade tripanocida. No entanto, o composto JW-16.2, que possui um substituinte metóxi na posição *para* do anel fenil, exibiu maior ação contra o parasito na concentração de 5µM quando comparado ao fármaco de escolha, Benzonidazol a 6.2 µM (ESPÍDOLA et al. 2015). Além do substituinte metóxi, os compostos JW-16.2 e JW-37.2, apresentam o substituinte bromo (Br). No composto JW-16.2, na posição *para* do anel fenoxi e no JW-37.2, na posição *para* do anel

fenil. Observou-se que a substituição do Br na posição *para* do anel fenoxi apresenta maior atividade leishmanicida do que o Br na posição *para* do fenil. Diante disso, pode-se inferir que a ação do composto pode estar relacionada ao substituinte e a sua posição na estrutura da molécula.

Segundo Pinto et al. (2014) e Hernandes et al. (2010), substituintes halogênicos (F, Cl e Br) no anel fenil, torna o composto muito mais estável metabolicamente e quimicamente em suas ligações, bem como contribui positivamente na permeabilidade da membrana celular, apresentando ação leishmanicida mais eficaz. Esse achado, corrobora com o que foi observado no presente estudo e além disso observou-se que a posição do Br potencializou a ação do composto.

A detecção da atividade citotóxica é importante para validar uso do composto, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos e dessa forma, inviabilizar sua utilização como fármaco. No presente estudo todos os compostos testados foram mais seletivos para *L. infantum.* Entretanto, o potencial citotóxico (CC_{50}) do composto JW-16.2 e GT-14, frente aos macrófagos J774 e macrófagos peritoneais, demonstraram baixos valores de inibição com os maiores valores de índice de seletividade (IS). É possível que o metóxi na posição 5 do composto GT-14 tenha aumentado a atividade da molécula, a exemplo da citotoxicidade em macrófagos peritoneais que refletiu um IS (38.5) superior quando comparado ao da AmB (35.6), indicando que mudanças nessa posição são benéficas. Da mesma forma, no estudo de De Oliveira Filho et al. (2017), esse mesmo composto apresentou baixa citotoxicidade (>50 μM) em macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi*. Sendo assim, análises realizadas por De Oliveira Filho et al. (2017) e Espíndola et al. (2015) fortalecem que o substituinte metóxifenil no anel tiazól do GT-14 se mostra mais efetivo nessa estrutura do que o mesmo substituinte no grupo tiossemicarbazona do JW-16.2 quando em nosso estudo comparados. Gomes et al. (2016) também avaliaram a tolerância citotóxica da ciclização de ftalimido-tiossemicarbazona ao anel ftalimido-tiazól em *T. cruzi*, observando que os novos ftalimido-tiazóis mostraram boa inibição em baixas concentrações de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos Balb/c, inclusive compostos com substituintes do grupo halogênio foram o mais ativo. Da mesma forma, Aliança et al. (2017) também testaram alguns desses mesmos compostos, mas frente a mesma cepa (linhagem MHOM / BR / BH 46) de *L. infantum* utilizada no nosso trabalho, e os resultados fortalecem os nossos resultados.

Os dados do presente estudo corroboram com os achados de Da Silva et al. (2017), quando analisaram a atividade leishmanicida sobre *L. amazonensis* e citotoxicidade de compostos aril-tiossemicarbazonas em macrófagos peritoneais, encontraram baixa

citotoxicidade dessa classe de compostos, sendo mais seletivos aos parasitos do que às células. Da mesma forma, Costa et al. (2016) testaram uma série de tiossemicarbazonas e tiazóis em células LLC-MK2 (células epiteliais de rim de macaco verde) e Células NIH-3T3 (célula fibroblástica embrionária de camundongo), e também encontraram baixo efeito citotóxico, mesmo em diferentes tipos de celulares. Diante do exposto, essas classes de compostos apresentam baixa toxicidade e, portanto, estão aptos a testes posteriores que possam viabilizar o seu uso *in vivo*.

Em relação ao efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas de *L. infantum*, os compostos JW-16.2 e GT-14 foram capazes de diminuir o índice de sobrevivência (Iso) de amastigotas nos macrófagos, com valores de IC_{50} de 24.39 µM e 16.51 µM. No entanto, pode-se observar que as concentrações de IC_{50} foram superiores as encontradas para promastigotas. Esse fato pode ser explicado, conforme Muylder et al. (2011), devido a necessidade de permeabilidade do composto até alcançar o parasito dentro do macrófago. Podendo-se inferir que as diferenças de susceptibilidade ao composto, entre as formas evolutivas, provavelmente são devidas às características bioquímicas distintas existentes entre estas formas parasitárias, bem como ao perfil químico do composto, como a sua solubilidade em lipídios (ATHAYDE-FILHO et al., 2000). No trabalho de Aliança et al. (2017) também foi encontrada uma redução da carga parasitária dentro dos macrófagos peritoneais quando tratados com composto da classe tiazól, reforçando o potencial leishmanicida dessa classe de fármaco.

Ainda corroborando com nossos resultados, Britta et al. (2014) investigaram a ação de 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona, frente a *Leishmania amazonensis*, e constataram a inibição de crescimento das formas promastigotas e amastigotas. Os mesmos autores em outro estudo de 2015, avaliaram a ação do 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona contra formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e demonstraram que o composto inibiu o crescimento das formas epimastigotas. Além disso, identificaram, que essa inibição foi dose dependente (BRITTA et al., 2015), como também foi descrito no presente estudo, onde as maiores concentrações testadas, 19,32 e 27 µM, dos compostos JW-16.2 e GT-14 respectivamente, foram capazes de causar maior inibição das formas amastigotas nos macrófagos peritoneais.

A atividade hemolítica vem sendo utilizada para avaliar o potencial de compostos em causar danos à membrana plasmática da hemácia. A detecção do poder citotóxico frente às hemácias está diretamente relacionada a ocorrência de hemólise, que consiste em hemoglobina livre no plasma, podendo acarretar prejuízos nefrotóxicos e vasomotor (KALEGARI et al., 2011). Segundo Preté et al. (2011), valores de porcentagem de hemólise acima de 15% são considerados elevados, pois indicam consideráveis danos à membrana eritrocitária. Em nosso

estudo, as maiores atividades hemolíticas encontradas foram de 3.73% para JW-16.2 e 4.12% para GT-14. Dessa forma, e de acordo com o Preté et al. (2011), pode-se sugerir que os compostos testados no presente estudo baixa atividade hemolítica, sendo candidatos para ensaios i*n vivo.* Conforme Brandriss et al. (1964) e Lin et al. (1990), a terapia com AmB não aumenta a hemólise.

Um mecanismo primário de resistência à infecção por *Leishmania* é a produção de ON por macrófagos infectados (GHOSH et al., 2013; LIMA-JUNIOR et al., 2013). Na infecção, o ON modula direta ou indiretamente o mecanismo efetor de células de defesa, podendo atuar com efeito leishmanicida, regulando a resposta inflamatória no período de infecção. Além disso, os macrófagos possuem a capacidade de produzir ON quando submetidos à ação de substâncias indutoras, mesmo não estando infectados (HOLZMULLER et al., 2002). No presente estudo, os macrófagos peritoneais não infectados com *L. infantum* aumentaram a produção de ON quando submetidos ao tratamento com os compostos de classe tiossemicarbazona (JW-16.2, JW-37.2) e tiazól (JW-16.2, JW-37.2). Holzmuller et al. (2002), demonstraram que substâncias indutoras podem desencadear o aumento na produção de ON e mostrando-se bons indutores dessa produção. No entanto, quando se observou a produção de ON nos macrófagos infectados com *L. infantum* e submetidos ao tratamento com os compostos, não ocorreu aumento estatisticamente significativo da produção de ON por esses macrófagos, assim como não ocorreu aumento do ON no controle positivo, submetido a AmB. Esse achado pode ser justificado pelo desenvolvimento de um mecanismo de escape da *Leishmania* para sobreviver no macrófago. Ainda neste estudo, pode-se observar que os compostos apresentaram capacidade leishmanicida sobre as a formas amastigotas nos macrófagos, o que sugere outro mecanismo de ação para eliminar o parasito, diferente do aumento do ON. Os resultados reforçam os encontrados por Aliança et al. (2017), no qual os compostos testados induziram um aumento na produção de ON por macrófagos não infectados embora o mesmo não foi observado para os macrófagos infectados.

A atividade desses compostos pode estar relacionada a vários mecanismos de ação dos mesmos sobre as formas parasitárias. No presente estudo foi observado que os compostos GT-14 e JW-16.2 foram capazes de causar alterações na ultraestrutura celular nas concentrações testadas, como alteração na morfologia, encolhimento e encurtamento do corpo celular do flagelo e desorganização citoplasmática. Estas alterações também foram descritas em estudo de Aliança et al. (2014) avaliando a atividade de ftalimido-tiazól em *L. infantum* e Gomes et al. (2016) analisando a atividade de ftalimido-tiazól em *T. cruzi.* Alterações nos substituintes e posições dos substituintes no anel fenil mostraram diferenças *in vitro* na atividade destes

compostos nas alterações ultraestruturais. Segundo Menna-Barreto et al. (2009), a necrose, que se configura como um tipo de morte celular, atinge não apenas a integridade de membrana plasmática, como também a despolarização da mitocôndria, perda de ATP, perda de material citoplasmático, desequilíbrio da homeostase de Ca^{2+} e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As alterações descritas na ultraestrutura das leishmanias no presente estudo, podem estar relacionadas a um mecanismo de morte celular.

Para investigarmos o efeito dos compostos sobre a integridade da membrana plasmática e inferirmos se houve indução de morte celular pelo tratamento com os compostos JW-16.2 e GT-14, utilizamos a sonda de Iodeto de Propídio (IP). Com exceção do controle positivo, os demais grupos tratados com JW-16.2 e GT-14 induziram alterações morfológicas nos parasitos. Por outro lado, o arredondamento do corpo celular e aumento do volume do parasito, ocasionados pela ação dos compostos JW-16.2 e GT-14, são indicativos de perda da viabilidade celular e morte celular independente de necrose, tais como a autofagia e apoptose visto que a integridade da membrana plasmática não foi significativamente afetada (MENNA-BARRETO et al., 2009). Resultados similares foram obtidos no estudo de Britta et al. (2014), com compostos da classe tiossemicarbazona, no qual as *L. amazonensis* sofreram aumento do volume, inchaço na mitocôndria e aumento de vacuolização. No entanto, alterações de membrana citoplasmática não foram observadas, o que fortalece nossos achados e inferência sobre outro tipo de morte celular.

Uma característica chave dos tripanossomatídeos parasitos é a presença de uma única mitocôndria, sendo esta responsável pelo metabolismo energético. A manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) é insubstituível no processo metabólico e, qualquer alteração, sinaliza a liberação de vários fatores que disparam o processo de morte celular por apoptose (BASMACIYAN et al., 2018). As formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com (1x IC_{50}) JW-16.2 e GT-14 mostraram que não houve efeito sobre o $\Delta\psi m$, conforme demonstrado pelos valores do índice de variação > +1, nem alterações nessa organela foram observadas pela MET, além de presença de espaços eletron-luscentes, corpos eletron-densos e núcleo picnótico, apenas JW-16.2, inferindo a fragmentação da cromatina. Da mesma forma, Braga et al. (2004) relatam que sob condições de estresse, a mitocôndria reage desenvolvendo vacuolização do citoplasma, assim como Caldas et al. (2018) encontraram o núcleo picnótico de *L. amazonensis* e o que também justifica nossos achados.

A análise do composto GT-14, na maior concentração testada (2x IC_{50}), mostrou que houve despolarização do $\Delta\psi m$ o que impulsiona a morte celular. Portanto, é razoável sugerir que os compostos exerceram sua ação leishmanicida desde o encolhimento morfológico, a

presença de espaços eletron-luscentes, inchaço de mitocôndria e fragmentação da cromatina que são características de apoptose ou mesmo processo autofágico (YAMAMOTO et al., 2015; GARZONI et al., 2004) e que foram fortalecidos pelos achados da MET. A apoptose é um processo que elimina células sem causar uma resposta imune, nesse contexto, é um importante processo na patogênese da leishmaniose, entretanto pode facilitar a sobrevivência do parasito dentro do macrófago, fato este que foi relatado durante o uso de vários medicamentos de referência como os antimoniais pentavalentes, Miltefosina e AmB (EL-HANI et al., 2012).

Como os eventos apoptóticos iniciam-se na mitocôndria, KROEMER et al. (2007) afirmam que as alterações nos canais de Ca^{2+} e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) estão associados à perda no potencial de membrana. Assim como, há a vertente positivista que, fisiologicamente, a apoptose é um altruísmo egoísta no parasito, pois este tem a finalidade de regular quantitativamente o parasito dentro do vetor e no hospedeiro vertebrado, evitando o hiperparasitismo (LÜDER et al., 2010), ou em casos de infecções bem sucedidas por *Leishmania* spp., a apoptose pode funcionar como um mecanismo de debelação do sistema imune do hospedeiro (LÜDER et al., 2010).

Conclusão

Diante das limitações no tratamento da LV, nossos resultados fortaleceram os dados existentes na literatura em que composto da classe tiossemicarbazona e tiazól são agentes antiparasitários. No presente estudo, os compostos, JW-16.2 e GT-14, que apresentam o substituinte metóxi na posição *para* do anel fenil, mostraram-se mais eficazes na atividade leishmanicida, sobretudo com destaque para o composto JW-16.2. Por análises qualitativa e quantitativa, o JW-16.2 apresentou núcleo picnótico, alterações ultraestruturais tais como encurtamento do corpo celular, vacuolização do citoplasma e corpos eletrodensos, além de baixa citotoxicidade contra células de mamíferos e ação contra as formas evolutivas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* foram evidenciados, mostrando seu potencial. Outros testes biológicos *in vivo* são necessários para que o mecanismo de ação desses compostos seja melhor esclarecido.

REFERÊNCIAS

ALIANÇA, A. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, 2017.

ATHAYDE-FILHO, P. F. et al. Mesoionic Compounds: Amphiphilic Heterocyclic Betaines. Synthesis. **Journal of Synthetic Organic Chemistry**, Berlim , v. 2000, p. 1565-1568, 2000.

BASMACIYAN, L. et al. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. **Microbial Cell**, v. 5, p. 404-417, 2018.

BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruz*i epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 57-62, 2012.

BHARTI, S. K. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 45, p. 651-660, 2010. Disponível em: <http://dx.doi .org/10.1016/j.ejmech.2009.11.008>. Acesso em 24 dez. 2018.

BOZDAG-DUNDAR, O. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 6012–6017, 2007.

BRAGA, M. V.et al. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 72-78, 2004.

BRANDRISS, M. W. et al. Anemia induced by amphotericin B. **JAMA**. n. 189, p. 663-666, 1964.

BRASIL, **Guia de Vigilância em Saúde.** Brasília. Ministério da Saúde, 2016.

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

BRITTA, E. A. et al. 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces mitochondrial alterations in epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 142, p. 978-988, 2015.

CALDAS, L. A.et al. Antileishmanial activity and ultrastructural changes of sesquiterpene lactones isolated from *Calea pinnatifida* Asteraceae, **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 348-353, 2019.

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

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation, **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 86, p. 48-59, 2014.

COSTA. L. B. et al. Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1608-1618, 2016.

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 FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 23, p. 7478-7486, 2015.

DE OLIVEIRA FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against *Trypanosoma cruzi*, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 346-361, 2017.

EL-HANI, C. N. et al. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v.2, p. 1-6, 2012.

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and structureeactivity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818-835, 2015.

FRANZEN, R.G. Recent advances in the preparation of heterocycles on solid support: A review of the literature. **ACS Combinatorial Science**, v. *2*, p. 195-214, 2000.

GHOSH, M. et al. Immunomodulatory effects of antileishmanial drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 2834-2838, 2013.

GLISONI, R. J. et al. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl-bcyclodextrin, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 596-603, 2012.

GOMES, P. M. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-12, 2016.

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

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

JOSHI, J. et al. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis - an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, p. 612–620, 2014.

KAUSHIK, N. K. et al. Biomedical Importance of Indoles. **Molecules**, v. 18, p. 6620-6662, 2013.

LIESEN, A.P. et al. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 369-376, 2008.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1ß Production Induces Nitric Oxide-mediated Resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.

LIN, A. C. et al. Amphotericin B blunts erythropoietin response to anemia. **The Journal of Infectious Diseases**, n. 161, p. 348-351, 1990.

LÜDER, C. G. et al. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 116, 2010.

LUKMANTARA, A. Y. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 967-974, 2013.

MELO, J. O. F. et al. Heterocíclicos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, p. 157-168, 2009.

MUYLDER, G., et al. A screen against Leishmania intracellular Amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit**. PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1253, 2011.

PAVAN, F. R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 45, p. 1898-1905, 2010.

PINTO, E. G. et al. Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]- naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structureactivity relationships. **PLoS One,** v. 9. 2014.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 1, p. 164-170, 2011.

SANTIAGO, E. D. F. Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. **Journalof Antimicrobial Agents Chemother**, v. 58, p. 352-363, 2014.

SUDO, R. T. et al. Interaction of morphine with a new alpha2-adrenoceptor agonist in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, p. 71-78, 2010.

SUNDAR, S. CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion Pharmacother**, v. 14, p. 53-63, 2015.

VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinone and a biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 897-905, 2008.

YAMAMOTO, E. S. et al. The effect of ursolic acid on *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* is related to programed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis, **PLoS One**, v. 10, p. e0144946, 2015.

World and Health Organization (WHO), 2018. **Leishmaniasis Fact Sheet**. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 02 de dezembro.

5.2 Artigo 2: Avaliação biológica in vitro da eficácia de novo composto derivado da classe Piridil-tiazól contra Leishmania infantum.

Introdução

As leishmanioses apresentam manifestações clínicas desde a Leishmaniose Cutânea até a Leishmaniose Visceral (LV) (TIWARI et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2013), que correspondem a um conjunto de doenças tropicais negligenciadas com aproximadamente 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção. A leishmaniose é causada por protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania,* os quais são transmitidos por fêmeas de insetos flebotomíneos, de gênero *Lutzomyia,* para hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (TIWARI et al., 2018; BELO et al., 2013).

A LV é caracterizada como uma doença infecciosa e representa a forma mais grave da doença afetando o sistema esplênico e hepático, baço e medula óssea causando hipertrofia de órgãos (hepatoesplenomegalia) e disfunção (CHANDER et al., 2018; DE FREITAS et al., 2016). Quando não tratada, pode evoluir para óbito em 95% dos casos (ALMEIDA et al., 2018). No Brasil, a LV é causada pela espécie *Leishmania infantum*, representando 96.5% dos casos da América Latina (WHO, 2018).

Essa doença continua sendo um grande desafio à saúde pública, não apenas devido à frequência, morbidade e mortalidade que ocasiona, mas, sobretudo o seu tratamento e controle. Atualmente, o tratamento e controle da leishmaniose baseiam-se na quimioterapia, uma vez que não há vacina disponível. No Brasil e em outros países em desenvolvimento, o tratamento contra essa parasitose baseia-se no uso de antimoniais pentavalentes e como fármaco de segunda escolha, a anfotericina B (AmB), além de miltefosina, paromomicina e pentamidina (WHO, 2018). Entretanto, severos efeitos colaterais como toxicidade hepática, cardíaca e renal são registrados para essas medicações, além do alto custo de produção e rotina de administração do fármaco colaborar para uma alta desistência de tratamento (ZULFIQAR et al., 2017; JOSHI et al., 2014). Nesse cenário, considera-se de extrema importância a busca de novos compostos com potencial leishmanicida, que sejam mais eficazes e menos tóxico.

Dentre as diversas classes de compostos sintéticos, o núcleo tiazól e piridina por apresentar ação contra *Trypanosoma cruzi* (LESSA et al., 2011; CARDOSO et al., 2014; LIU et al., 2014; DE OLIVEIRA FILHO et al., 2015) e atividade antimalárica (MJAMBILI et al., 2014; BUENO et al., 2016) nos encorajou analisar seu potencial leishmanicida, uma vez que

cada grupamento é capaz de proporcionar ligantes potentes através de modificações de grupos funcionais (LEITE et al., 2018; VERMA; SARAF, 2008).

Tendo em vista o potencial dos núcleos tiazól e piridina frente a sistemas biológicos e aliando-os a necessidade de identificar novos compostos leishmanicidas, selecionamos alguns compostos dessas classes com objetivo de avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* contra as formas evolutivas de *L. infantum*, a citotoxicidade em células de mamíferos, a produção de ON em macrófagos não infectados e infectados, índice de sobrevivência de formas amastigotas e possíveis alvos ultraestruturais.

Metodologia

Avaliação dos compostos: Os compostos de classe tiazól (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C e TAP-06) e piridil-tiazól (TAP-01) foram obtidos e purificados conforme Gomes et al. (2016), Da Santana et al. (2017) e Cardoso et al. (2014). Todos foram quimicamente caracterizados por técnicas espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de massas e a análise elementar (pureza > 95%) (CARDOSO et al., 2014). Para os ensaios *in vitro* cada composto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) a 1%. Cada solução foi então dissolvida em meio de cultura adequado para cada experimento, RPMI para macrófagos/amastigotas e Schneider para promastigotas, objetivando obter diferentes concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) para as análises. As soluções foram preparadas minutos antes de iniciar os experimentos para garantir a estabilidade dos compostos. As leishmanias incubadas com meio de cultura foram consideradas controle negativo e, as leishmanias incubadas com Anfotericina B (AmB) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram consideradas controle positivo. A concentração de DMSO foi estimada a 1% na diluição dos compostos.

Parasitos e condições de cultura: Promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/BH 46) foram acondicionadas a 26 ºC em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina-Estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Esses parasitos em fase de crescimento exponencial foram utilizados nos testes. As formas amastigotas foram obtidas por inoculação de formas promastigotas infectivas em cultura de macrófagos peritoneais coletados de acordo com Teixeira et al. (2002).

Atividade biológica de *L. infantum:* Visando um *screening* inicial dos compostos, foram utilizadas promastigotas a uma concentração de $1x10^6$ parasitos/mL em meio Schneider suplementado com 20% de SFB. As leishmanias foram incubadas nas concentrações 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL dos compostos de classe tiazól (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C e TAP-02) e classe piridil-tiazól (TAP-01) por 72 h, no entanto o seu crescimento acompanhado diariamente através de contagens na câmara de Neubauer (iNCYTO CChip DHC-N01, Cheonan-Si, Coréia do Sul). As leishmanias incubadas apenas com meio Schneider e DMSO, foram consideradas controle negativo, as incubadas com AmB nas mesmas concentrações testes (6.25 a 100 μg/mL) foram consideradas controle positivo. A concentração que inibe 50% do crescimento do parasito (IC_{50}) foi determinada por regressão linear após 72 h de cultivo pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (μM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar atividade na literatura internacional. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

Células de mamíferos: Para os testes de citotoxicidade foram utilizados macrófagos J774. Essas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37 ºC a 5% de CO_2. Os macrófagos peritoneais, para o teste com as formas amastigotas, foram coletados de camundongo machos de linhagem Balb/c, de acordo com o protocolo descrito por Teixeira et al. (2002). Brevemente, foi introduzido 5 mL de meio RMPI-1640 suplementado com 10% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) na cavidade peritoneal do camundongo. Todos os procedimentos seguiram a conduta ética estabelecida pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ/PE), sob número de protocolo 84/2015.

Análise da citotoxicidade: O teste de citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliado através do ensaio de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, que baseia-se na redução de sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas (ALIANÇA et al., 2017). As células foram semeadas em placa de 96 poços ($1x10^5$ células/poço) em várias concentrações (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) por 48 h incubadas a 37 ºC em 5% de CO_2. Para a leitura de absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA, Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA), com comprimento de onda de 490 nm. A concentração capaz de causar a perda de

viabilidade das células saudáveis em 50% (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows e convertida à concentração micromolar (µM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar citotoxicidade na literatura internacional. O índice de seletividade (IS) é determinado pela razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} para cada composto foi calculado. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

Atividade biológica *in vitro* sobre as formas amastigotas de *Leishmania infantum*: Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram coletados e semeados em placas de 24 poços, a uma concentração de $1x10^5$ células/mL, contendo uma lamínula de vidro, com meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e incubadas a 37 ºC a 5% de CO_2. Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com PBS estéril para retirar os macrófagos que não aderiram à lamínula e, em seguida, foram adicionados 500 µL da suspensão de promastigotas infectivas (cepa MHOM/BR/BH46) na proporção de 10:1 amastigotas/macrófago, por três horas e mantidas a 37 °C a 5% de CO_2. Após a infecção, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações (1/2x, 1x e 2x IC_{50}) (5.92, 11.85 e 23.7 µM) de TAP-01, e incubados a 37 ºC a 5% de CO_2. Após 24 h de tratamento as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 h de cultivo por análise de regressão linear e convertida à concentração micromolar (µM) de acordo com o peso molecular de cada composto, a conversão a uM foi adotada por ser a concentração mais utilizada para expressar atividade na literatura internacional. O índice de sobrevivência (ISo) foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. A AmB foi utilizada como controle positivo, enquanto os macrófagos sem tratamento correspondem ao controle negativo.

Atividade hemolítica: A ação hemolítica dos compostos foi realizada através da técnica sobre hemácias de carneiro, descrita por Becerra et al. (2012). A diluição dos compostos foi realizada com solução salina + DMSO 1%, seguida pela microdiluição seriada em solução salina (NaCl 0.85% e $CaCl_2$ 10 nM) em microplacas de poliestireno e fundo "U" com 96 poços. Em paralelo, 2 mL de sangue total de carneiro homogeneizado foram dissolvidos em 18 mL de solução salina. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 2.500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi

desprezado, com repetição dessa etapa por 3 vezes. Cada poço continha solução eritrocitária a 2% e o composto dissolvido (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL). Foi adicionado um controle positivo de lise celular com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% e um controle negativo usando DMSO 1%. Após incubação por 3 h a 37 ºC sob agitação constante, as microplacas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 4 ºC, para separação entre o sobrenadante e o pellet. Por fim, o sobrenadante foi removido para outra placa de poliestireno de fundo chato com 96 poços para leitura em espectrofotômetro, (Benchmark plus, BioRad®, Califórnia, EUA) com filtro de 540 nm para estimar o percentual de hemólise.

Dosagem de óxido nítrico: Através do método colorimétrico reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% NED/H_3PO_4 à 2.5%) (Promega, Madison, USA), foi analisado o ON produzido pelos macrófagos peritoneais, infectados com *L. infantum*, tratados e não tratados com as concentrações testes (6.25, 12.5, 25, 50 e 100 μg/mL) dos compostos derivados da classe tiazól (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C e TAP-06) e piridil-tiazól (TAP-01). O reagente Griess foi utilizado segundo instruções do fabricante. Foi utilizado 100 μL de sobrenadante da cultura de macrófagos tratados ou não com os compostos, por 48 h, foram incubados com 100 μL do reagente Griess à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi determinada utilizando filtro de 540 nm em leitor de ELISA. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Macrófagos não tratados foram utilizados como controle.

Análises ultraestruturais de *L. infantum*: O composto que apresentou melhor IS, TAP-01, foi selecionado para a análise ultraestrutural. As formas promastigotas não tratadas e tratadas por 72 h com concentrações 11.85 e 23.7 μM de TAP-01 foram lavadas e fixadas em solução de glutaraldeído a 2.5%, formaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0.1M, pH 7.4, e processadas para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Para MEV, formas promastigotas foram fixadas às lamínulas revestidas por poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 min, as lamínulas foram lavadas em solução tampão para remover as células não aderentes e, posteriormente, pós-fixadas por 1 h em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em um tampão de cacodilato de sódio, pH 7.2. As células foram então desidratadas em série crescente de etanol e submetidas para secagem usando o equipamento de ponto crítico no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), metalizadas com 20 nm de ouro em um sputter JFC-1100 e examinadas sob um microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

Para MET, as formas promastigotas foram lavadas e pós-fixadas durante 2 h em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em cacodilato de sódio tampão, a pH 7.2. As amostras foram então desidratadas em série crescente de acetona, infiltradas em concentrações crescentes de resina e incorporadas em EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os blocos foram polimerizados em estufa a 70 ºC por 72 h. Cortes ultrafinos (~70nm de espessura), foram obtidos em ultramicrótomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha), corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados no microscópio eletrônico de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, EUA).

Para MEV formas promastigotas foram fixadas às lamínulas revestidas por poli-L-lisina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 min, as lamínulas foram lavadas em solução tampão para remover as células não aderentes e, posteriormente, pós-fixadas por 1 h em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em tampão de cacodilato de sódio, pH 7.2. As células foram então desidratadas em série crescente de etanol e submetidas para secagem no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), metalizado com 20 nm de ouro em um sputter JFC-1100 e examinadas sob um microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

Avaliação da Integridade de Membrana Plasmática: As formas promastigotas de *L. infantum* ($2x10^6$ células/mL) foram tratadas com (IC_{50} e 2x IC_{50}) 11.85 e 23.7 µM de TAP-01, por 72 h. As alíquotas do controle positivo foram previamente centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante, e adicionada a saponina 0.1% por 30 min. Passado esse intervalo de incubação, todas as amostras foram centrifugadas e descartados os sobrenadantes. Posteriormente, as células foram marcadas com 50 µg/mL de Iodeto de Propídio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 min. Ao término da incubação com o marcador, as células foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através do canal FL2-H. Um total de 50.000 eventos analisados por amostra. Os resultados foram emitidos em porcentagem de promastigotas marcadas para cada condição testada.

Avaliação do potencial de mitocôndria (ΔΨm): Com o objetivo de avaliar o potencial da membrana mitocondrial (ΔΨm), as formas promastigotas de *L. infantum* ($2x10^6$ células/mL) foram tratadas com (IC_{50} e 2x IC_{50}) 11.85 e 23.7 µM de TAP-01, por 72 h. Leishmanias solubilizadas com Peróxido de Hidrogênio - H_2O_2 1 µM (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), correspondem ao controle positivo, foi previamente centrifugado a 3000 rpm por 5 min,

descartado o sobrenadante e incubado com H_2O_2 por 1 h em BOD a 26 ºC. Após este intervalo, as amostras tratadas e não tratadas foram incubadas com 2 μg/mL de Rodamina 123 (Rod 123) por 30 min e, em seguida, lavadas três vezes com PBS 1x. Após a incubação, todas as amostras foram colocadas em tubos específicos para serem analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através do canal FL1-H. Um total de 50.000 eventos analisados por amostra. Os resultados foram emitidos em porcentagem de promastigotas marcadas para cada condição testada. As alterações na fluorescência, o que corresponde à polarização da membrana mitocondrial, foram quantificadas a partir do índice de variação (IV) calculado pela equação (MT-MC)/MC, onde MT é a intensidade mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a intensidade da mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (ALIANÇA et al., 2017).

Análise estatística: As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows. Para as análises de significância foi realizada ANOVA e o pós-teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

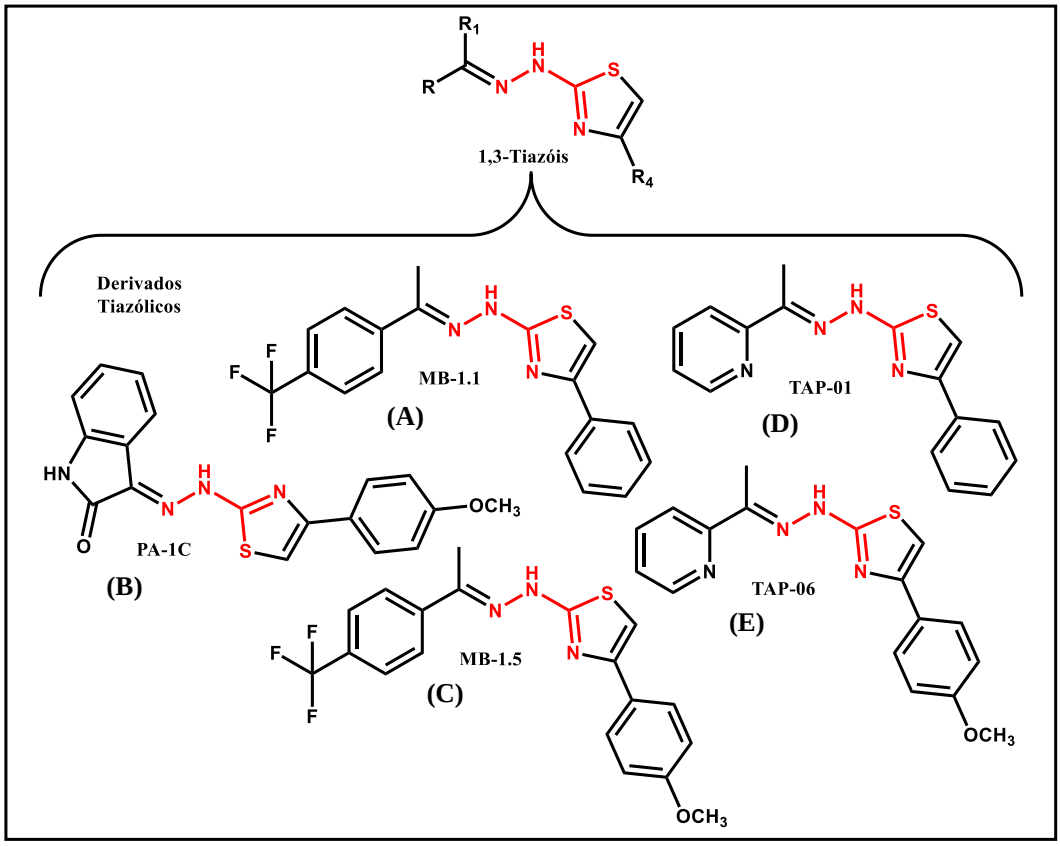
Considerações éticas: O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/Pernambuco sob o número de protocolo 84/2015.

Resultados

Atividade biológica sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*:

Com o objetivo de avaliar os efeitos dos compostos de classe tiazól (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C e TAP-06) e piridil-tiazól (TAP-01) (Fig. 1) sobre o crescimento da *L. infantum*, formas promastigotas foram incubadas com estes compostos e o crescimento foi acompanhado através de contagens diárias.

Figura 1 – Estruturas química dos compostos.



Fonte: Elaborado pela autora (2019)
Legenda: Estrutura química (A) MB-1.1; (B) PA-1C; (C) MB-1.5; (D) TAP-01; (E) TAP-06.

Os compostos MB-1.1 e MB-1.5 têm como principal característica estrutural a presença do radical trifluorometil benzilidino, no entanto o composto MB-1.1 possui um fenil sem substituintes na posição C4 do anel tiazólico, ao contrário do composto MB-1.5 que possui um radical substituinte metóxi na posição *para* do anel aromático, fenil. Essa mesma caracterização estrutural do anel fenil se aplica ao composto PA-1C, TAP-01 e TAP-06, onde com exceção do TAP-01 que não apresenta radical substituinte na posição C4 do fenil no anel tiazólico, os compostos PA-1C e TAP-06 possuem o metóxi posição *para* do anel fenil.

A diferença de atividade contra as formas promastigotas pode ser evidenciada através dos valores da IC_{50} em 72 h, variando de 11.85 a 150.57 µM (Tab. 1). A IC_{50} representa a concentração do composto capaz de causar 50% de inibição de crescimento das formas promastigotas e está diretamente relacionada ao efeito do composto sobre o parasito. Os compostos que demonstraram maior inibição de crescimento foram TAP-01 (11.85 µM) e TAP-06 (14.82 µM), o composto PA-1C foi o menos efetivo, apresentando o menor valor de IC_{50}, 150.57 µM. A AmB inibiu o crescimento de forma promastigotas de *L. infantum* em 100% em concentrações 0.25, 0.5 e 1.0 µM (Tab. 1).

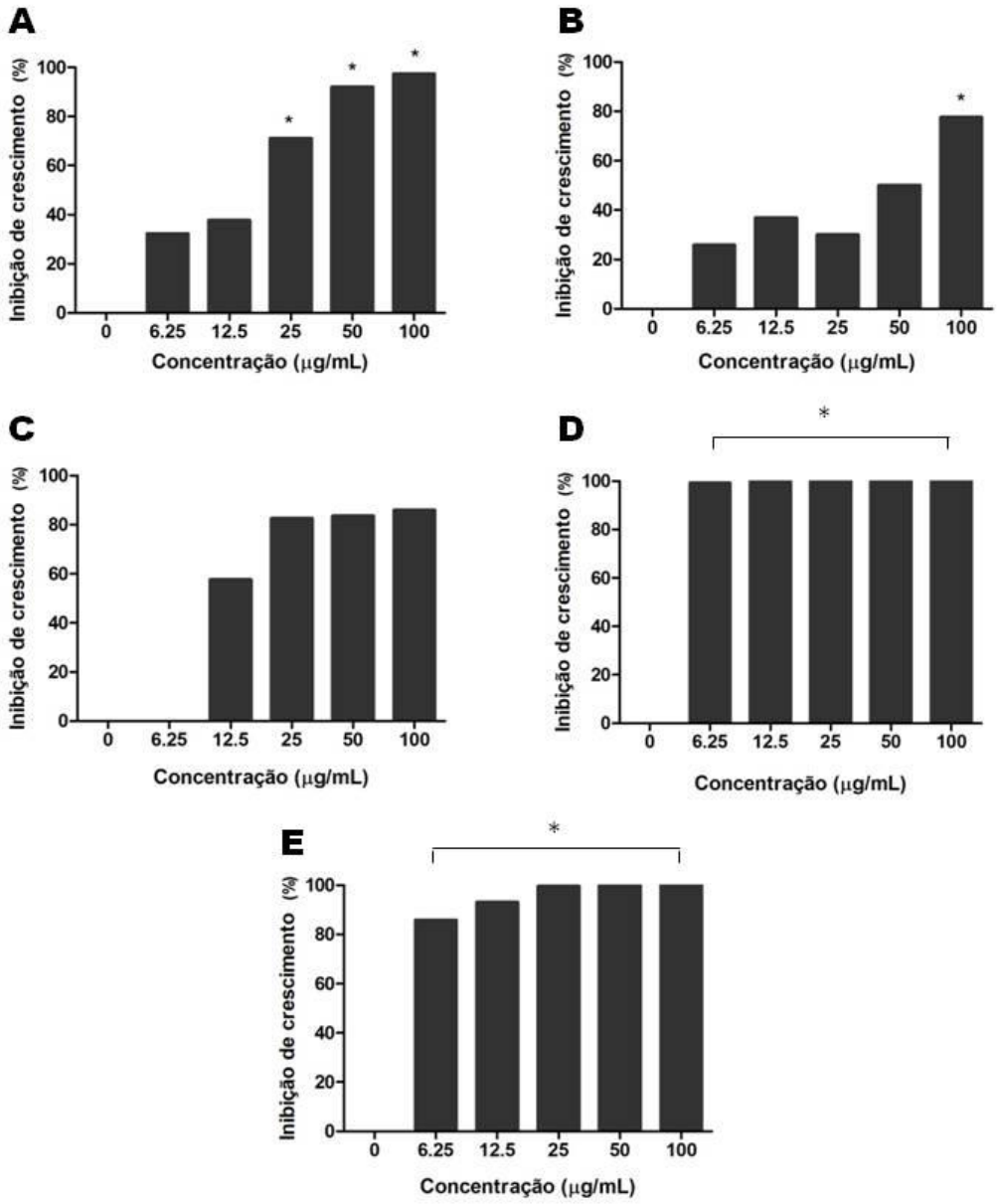
Tabela 1 – Ação dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e macrófagos J774.

Compostos	**µM**		**IS**
	IC_{50}	**$CC_{50\ (J774)}$**	
MB-1.1	60.5 ± 1,0	196.88 ± 16,59	3.2
MB-1.5	62.26 ± 1,8	757.43±11,89	12
PA-1C	150.57 ± 2,9	195.17 ± 9,23	1.3
TAP-01	11.85 ± 0	141.21 ± 3,52	12
TAP-06	14.82 ± 0,3	88.77 ± 5,16	6
AmB	0.047 ±0.03	37.61 ±1.4	808.1

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Os resultados mostram que todos os compostos testados apresentaram efeito sobre o crescimento do parasito, conforme demonstrado nos gráficos de inibição de crescimento (Fig. 2A-E). Nas concentrações de 0.25 a 1 µM, a inibição de crescimento foi significativa em relação ao controle para o composto MB-1.1 (Fig. 2A). O tratamento com o composto PA-1C induziu efeito apenas na maior concentração 1 µM (Gráf. 1B). Nas concentrações entre 0.12 a 1 µM, apenas o composto MB-1.5 mostrou atividade (Fig. 1C). O composto TAP-06 mostrou que todas as concentrações testadas inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* (Fig. 1D), enquanto que o composto TAP-01 atingindo quase 100% de inibição já na menor concentração testada, 0.06 µM (Fig. 1E).

Figura 2 - Efeito da média (24, 48 e 72 h) dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum.*



Fonte: Elaborado pela autora (2019).
Legenda: (A) MB-1.1; (B) PA-1C; (C) MB-1.5; (D) TAP-01; (E) TAP-06. As barras representam a média de 03 experimentos realizados em triplicata. *Valores estatisticamente significativos no teste ANOVA ($p < 0.05$).

Análise da citotoxicidade:

A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC_{50}) das células de mamíferos foi determinada por análise de regressão logarítmica dos dados de absorbância e calculados pelo software SPSS 8.0 para Windows. Nossos resultados mostraram que nenhum dos compostos testados apresentaram citotoxicidade maior que a AmB (Tab. 1). Comparando os compostos, MB-1.1 e MB-1.5, a adição do substituinte metóxi ao anel aromático fenil diminuiu significantemente a citotoxicidade em quase 4 vezes (196.88 e 757.43 µM, respectivamente), sendo o composto MB-1.5 o menos tóxico dentre os avaliados, seguido do PA-1C, TAP-01 e TAP-06, frente aos macrófagos J774 (Tab. 1).

O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} para cada composto ($IS = CC_{50}/ IC_{50}$). Nossos dados mostraram que os compostos avaliados são mais seletivos ao parasito do que à célula de mamíferos. Os compostos MB-1.5 e TAP-01 apresentaram o mesmo IS, 12 vezes mais seletivos ao parasito do que a célula de mamífero. No entanto, o composto TAP-01 foi mais eficaz na inibição das formas promastigotas de *L. infantum* mesmo apresentando o mesmo IS. A AmB mostrou concentração citotóxica de 37.61 ± 1.4 µM frente aos mesmos macrófagos (Tab. 1). A partir dessas análises, o melhor composto (TAP-01) foi selecionado para os experimentos posteriores.

Na avaliação contra as formas promastigotas o composto TAP-01 foi o mais ativo, inferindo ser capaz de induzir ação leishmanicida sobre as formas intracelulares de *L. infantum* em macrófagos peritoneais de camundongos. A CC_{50} para os macrófagos peritoneais demonstrou que a concentração citotóxica mínima do composto TAP-01 é de 270.36 ± 10 (Tab. 2). A AmB mostrou concentração citotóxica de 74.86 ± 9.5 µM frente aos macrófagos peritoneais (Tab. 2). O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da divisão da citotoxicidade dos macrófagos pela atividade contra as formas amastigotas ($IS = CC_{50}/ IC_{50}$). Nossos achados mostraram que o composto TAP-01 é mais seletivo frente às formas amastigotas que para os macrófagos peritoneais com IS=15.

Tabela 2 - Ação do composto TAP-01 sobre as formas amastigotas de *L. infantum* e macrófagos peritoneais.

Composto	µM		IS
	IC_{50} (Amastigotas)	CC_{50} (Macrófagos peritoneais)	
TAP-01	17.8±0.35	270.36±10	15
AmB	2.1±0.1	74.86 ± 9.5	35.6

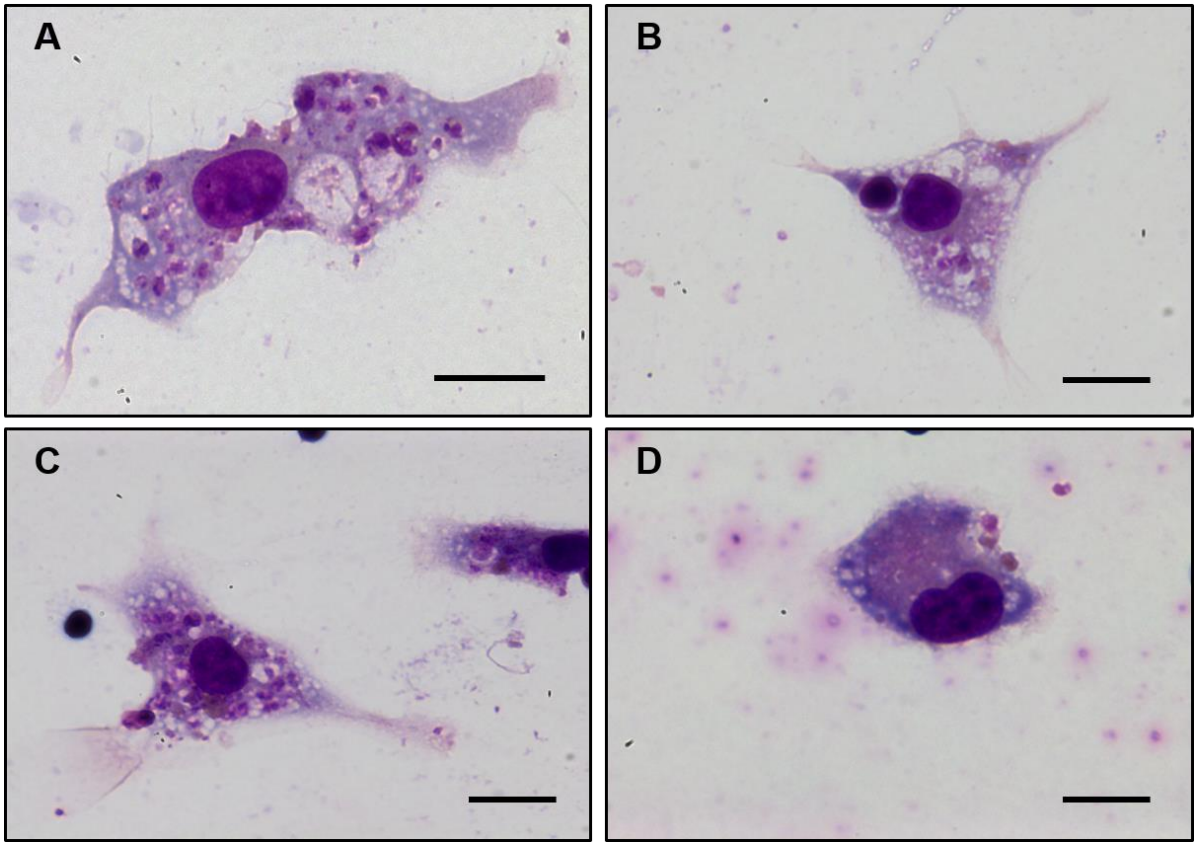
- IC_{50}: Concentração que inibi em 50% o crescimento das amastigotas de *L. infantum*
- CC_{50}: Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos peritoneais
- IS (Índice de seletividade): CC_{50} das células de mamíferos / IC_{50} *L. infantum*
- AmB: Anfotericina B

Ação leishmanicida dos compostos sobre as formas amastigotas:

A concentração que inibiu 50% do crescimento das formas amastigotas (IC_{50}) em macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum*, em 24 h, foi de 17.8 µM para o composto TAP-01 (Tab. 2), diminuindo dessa forma o número de amastigota por macrófagos (Fig. 3). O composto TAP-01 é 15 vezes mais seletivo às formas amastigotas que aos macrófagos peritoneais (Tab. 2).

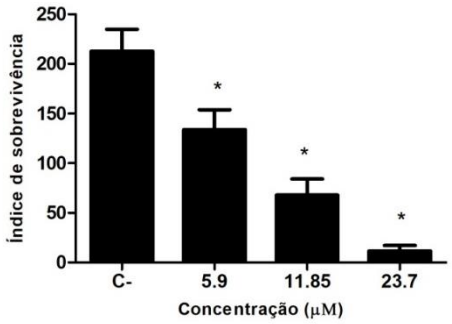
Na avaliação contra as formas amastigotas, nossos achados mostram que o composto TAP-01 reduziu significativamente, no tempo de 24 h, o índice de sobrevivência (Iso) das formas amastigotas nas três concentrações testadas (5.9, 11.85 e 23.7 µM) (Fig. 4).

Figura 3 - Macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. infantum* e tratados por 24 h com o composto TAP-01.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).
Legenda: (A) Células não tratadas. (B) células tratadas com 11.85 µM do composto TAP-01. (C) células tratadas com 5.92 µM do composto TAP-01. (D) Promastigotas tratadas 23.7 µM do composto TAP-01. Barras = 100 µm.

Figura 4 - Efeito do composto TAP-01 na infecção e sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos.

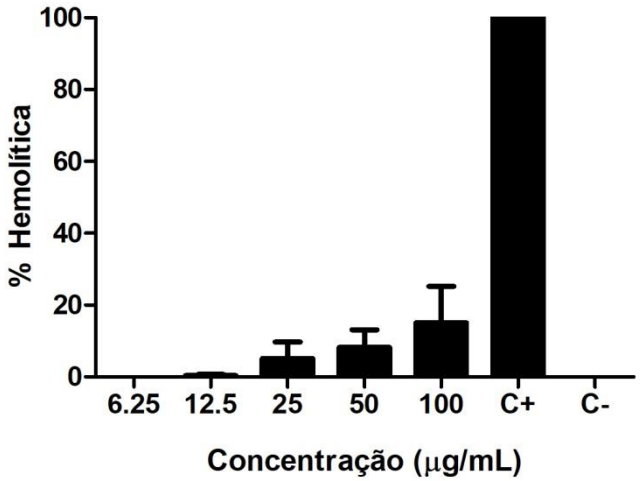


Fonte: Elaborado pela autora (2019).
Legenda: Cada barra corresponde à média de dois experimentos em duplicata biológica e triplicata técnica ± desvio padrão. C-: controle negativo. *Significância de cada média em relação ao controle (ANOVA, p <0.05).

Atividade hemolítica:

Com o intuito de verificar um possível efeito do composto sobre a membrana celular de hemácias de carneiro e evidenciar um possível efeito tóxico, o composto TAP-01 foi testado. Observou-se, segundo suas médias e erros-padrão, atividade hemolítica dose dependente nas concentrações testadas (0.06 a 1 µM). Foi verificado que, na concentração 0.06, 0.12 e 0.25, o composto TAP-01 promoveu lise de hemácias menor que 10%, entretanto, promoveu aproximadamente 15% de hemólise na maior concentração testada (1 µM), evidenciando a resposta dose dependente (Fig. 5).

Figura 5 - Efeito do composto TAP-01 sobre a atividade hemolítica.



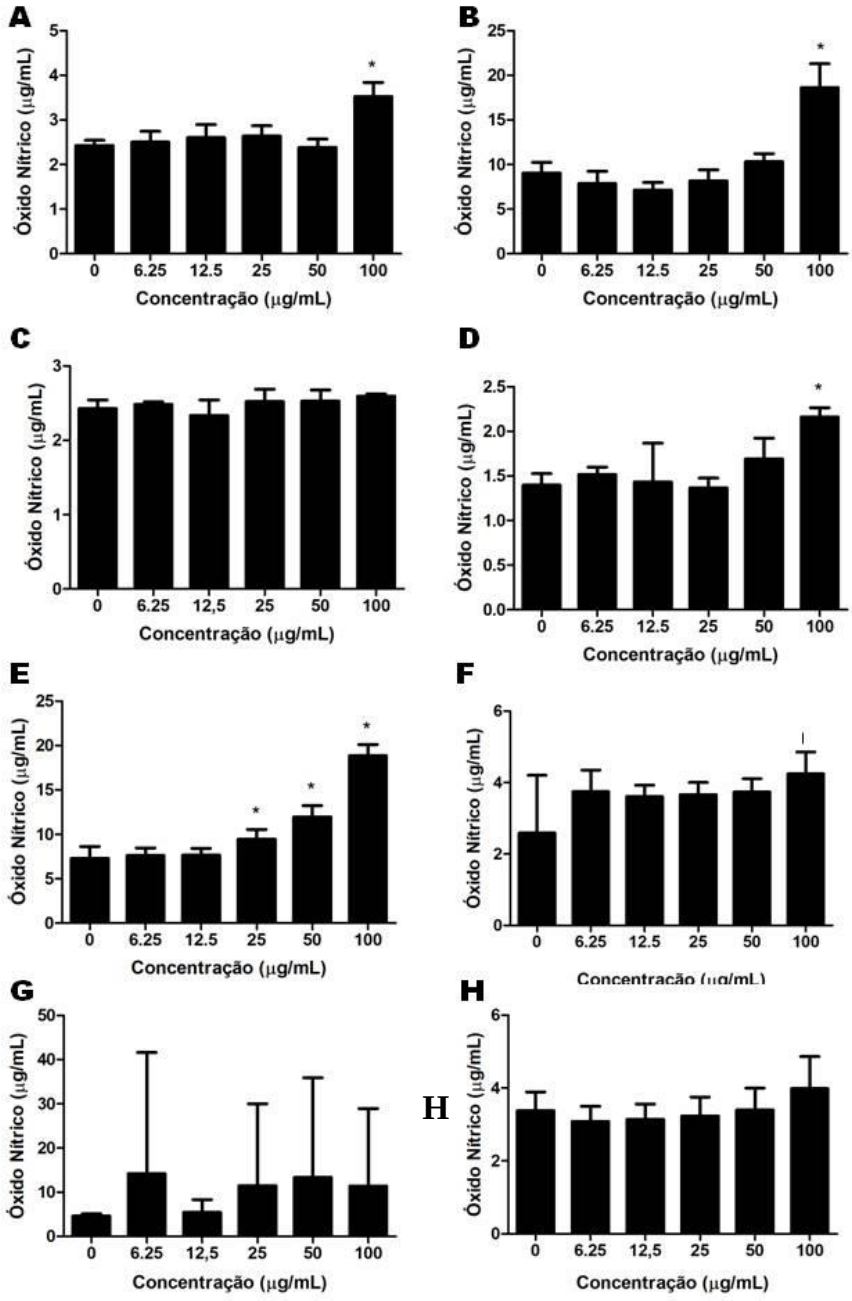
Fonte: Elaborado pela autora (2019).
Legenda: C+ = Triton X-100 a 1%; C- = solução salina + DMSO 1%

Produção de Óxido Nítrico (ON):

Foi avaliada a produção de ON sobre os macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* tratados e não tratados com os compostos (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C, TAP-01, TAP-06) nas concentrações 0.06 a 1 µM (Fig. 6). Nossos resultados mostraram que os compostos MB-1.5, MB-1.1 e TAP-06 foram capazes de induzir a produção significativa ($p < 0,05$) de ON na maior concentração testada (1 µM). O composto PA-1C induziu a produção de ON a partir da concentração 0.25 a 1 µM. Para o composto TAP-01, não foi observada alterações significativas na produção de ON em nenhuma das concentrações testadas (0.06 a 1 µM), tanto

em macrófagos infectados como para os não infectados. O tratamento com a AmB não induziu produção significativa de ON em macrófagos infectados, apenas não infectados (Fig. 6).

Figura 6 - Produção de Óxido Nítrico (ON) por macrófagos peritoneais infectados e não infectados com *L. infantum*.



Fonte: Autora (2019).

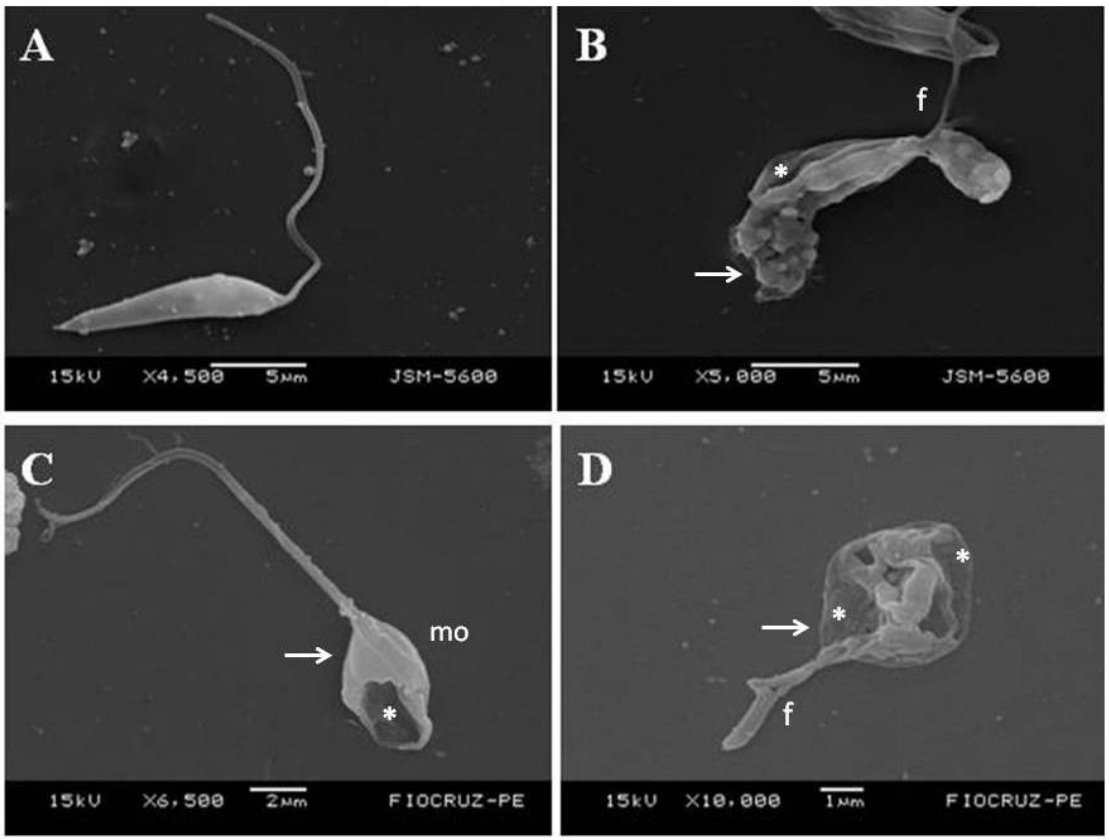
Legenda: Macrófagos peritoneais não infectados: (A) composto MB-1.1, (B) composto MB-1.5, (C) composto TAP-01, (D) composto TAP-06, (E) composto PA-1C, (F) AmB. Macrófagos peritoneais infectados: (G) composto TAP-01, (H) AmB. * Significância em relação ao controle (0) (ANOVA, p <0.05).

Análises Ultraestruturais:

Os efeitos ultraestruturais das formas promastigotas tratadas com o composto TAP-01, o qual apresentou melhor atividade leishmanicida, foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), após submissão nas concentrações correspondentes a IC_{50} e 2x IC_{50} (11.85 e 23.7 μM), revelando alterações morfológicas.

Na análise ultraestrutural através da MEV, promastigotas de *L. infantum* não tratadas apresentaram morfologia típica do parasito como o formato fusiforme, superfície topologicamente normal e flagelo longo, livre e preservado (Fig. 7A). As promastigotas submetidas à AmB, a 0.047 μM, alterações ultraestruturais, ondulações de membrana plasmática, bolhas, flagelo alterado, além de encolhimento do corpo celular e desintegração celular (Fig. 7B). O grupo tratado com 11.85 μM de TAP-01 apresentou alterações na topologia celular, com morfologia arredondada e grande degradação da membrana do parasito pela ação do composto (Fig. 7C). Na maior concentração analisada (23.7 μM) do composto TAP-01, as alterações morfológicas foram muito mais agressivas e visíveis (Fig. 7D) em relação ao tratamento anterior, apresentando extensa desintegração celular, bem como encurtamento de flagelo.

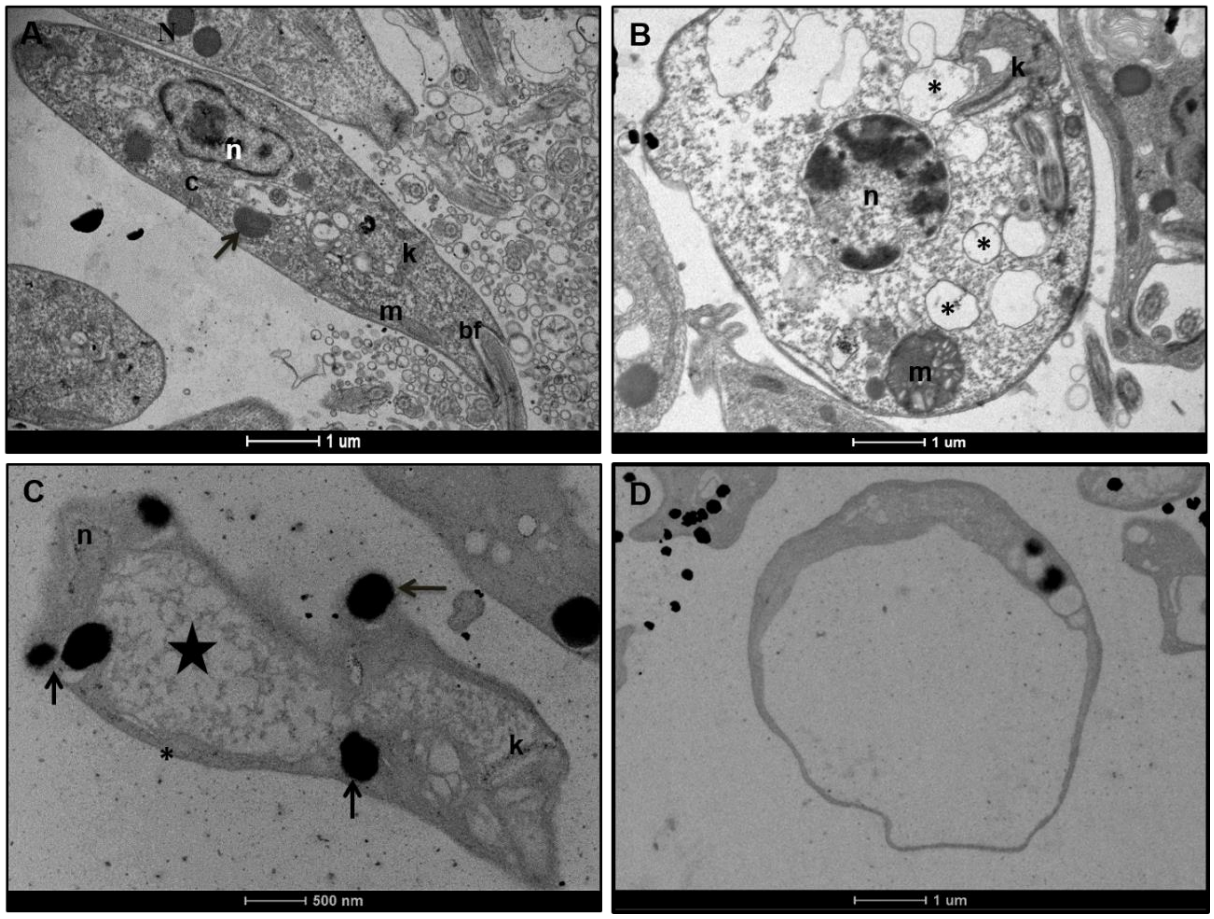
Figura 7 - Eletromicrografias de varredura em promastigotas de *L. infantum* tratados, por 72 h, pelo composto TAP-01.



Legenda: (A) meio + DMSO, controle negativo; (B) AmB, controle positivo; (C-D) tratados com 11.85 e 23.7 µM do composto TAP-01.

Nas análises realizadas na MET, as formas promastigotas não tratadas apresentaram forma e morfologia ultraestrutural normal, com a mitocôndria (M), núcleo (N), bolsa flagelar (BF) bem preservados (Fig. 8A). O controle positivo, representado pela AmB, apresentou vacuolização do citoplasma, presença de partículas eletrodensas, inchaço mitocondrial (Fig. 8B). Quando submetidas ao tratamento com 11.85 µM de TAP-01, foi possível notar vacuolização do citoplasma ao longo da forma promastigota, presença de partículas eletrodensas e núcleo picnótico (Fig. 8C). Já no grupo tratado com 23.7 µM de TAP-01, foi possível visualizar a destruição maciça da forma promastigota devido à vacuolização do citoplasma severamente mais intensa e unificada, podendo indicar ação dose dependente profunda do composto (Fig. 8D).

Figura 8 - Eletromicrografias de transmissão em promastigotas de *L. infantum* tratados, por 72 h.



Legenda: (A) promastigotas não tratadas mostrando a estrutura normal das organelas, mitocôndria (M), núcleo (N) e bolsa flagelar (BF) bem preservados; (B) Promastigotas tratadas com 0.047 µM de AmB mostrando inchaço mitocondrial (m), intensa vacuolização do citoplasma (*); (C-D) Promastigotas tratadas com 11.85 e 23.7 µM do composto TAP-01, em (C) é possível notar a presença de vacuolização do citoplasma (estrela), partículas eletrodensas (seta preta) e núcleo picnótico (n); em (D) promastigota destruída.

Avaliação da atividade do composto TAP-01 sobre a integridade da membrana e potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm):

Com o objetivo de avaliar a ação do composto TAP-01 sobre a integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm), promastigotas tratadas e não tratadas foram submetidas à marcação com Iodeto de Propídio (IP) e Rodamina 123 (Rod 123), respectivamente. O IP se liga ao DNA de células apenas quando há alteração de sua membrana plasmática, enquanto a Rod 123 é um corante catiônico utilizado para marcar membranas mitocondriais de células viáveis. As análises do efeito do composto frente a *L. infantum* foram realizadas de forma quantitativa, através da citometria de fluxo.

Promastigotas não tratadas, que correspondem ao controle negativo, foram marcadas (0,03%) com IP, indicando integridade da membrana plasmática dessas células, enquanto o grupo tratado com saponina, que corresponde ao controle positivo, foi marcado 81,82%. Promastigotas tratadas por 72 h em concentrações de 11.85 e 23.7 µM de TAP-01, demonstraram um discreto aumento na porcentagem de células marcadas com IP conforme aumento de concentração (Tab. 3).

Tabela 3 - Ação do composto TAP-01 na integridade da membrana plasmática.

Tratamento	IP+ (%)
Controle	0.03
Saponina	81.82
TAP-01 (11.85 µM)	0.05
TAP-01 (23.7 µM)	0.09

IP + (morte): porcentagem de células positivas para o Iodeto de Propídio.

A tabela 4 representa as alterações induzidas pelo composto TAP-01. O controle negativo mostrou incorporação da Rod 123 na mitocôndria dos parasitos, consolidando que o Δψm apresenta-se preservado nestas células. Promastigotas tratadas com o composto TAP-01 mostraram diminuição de intensidade de fluorescência de células marcadas causando considerável efeito no potencial de membrana, como mostra os valores negativos dos índices de variação (IV) de - 0.60 e - 0.87 para promastigotas tratadas com 11.85 e 23.7 µM de TAP-

01, assim como as incubadas com o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) apresentaram uma redução no valor da porcentagem de marcação quando comparado ao controle. A redução na fluorescência foi quantificada pelo cálculo do Índice de Variação (IV) calculado pela equação (MT-MC)/MC, onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC a mediana de fluorescência dos parasitos sem tratamento (Tab. 4).

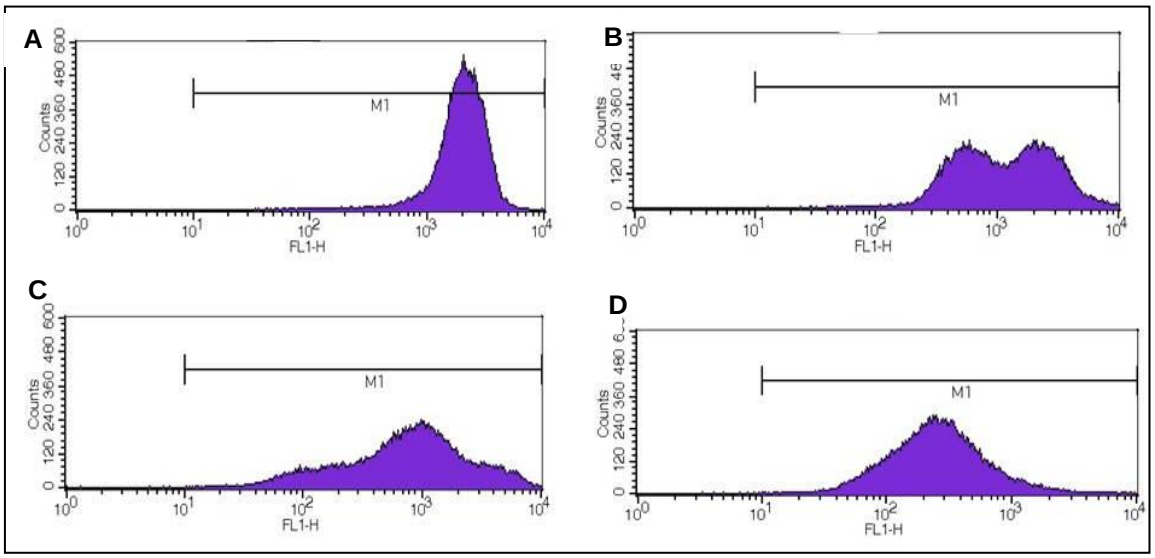
Tabela 4 - Efeito dos compostos TAP-01 na integridade da membrana mitocondrial utilizando o marcado Rodamina 123.

Tratamento	Mediana	IV
Controle	1980.96	0
Peróxido de Hidrogênio	1134.19	- 0.42
TAP-01 (11.85 µM)	784.39	- 0.60
TAP-01 (23.7 µM)	241.44	- 0.87

IV - Índice de Variação = MT – MC/MC, onde MT é a mediana da intensidade de fluorescência em células tratadas; MC é a mediana da intensidade de fluorescência em células não tratadas (controle negativo).

Pode-se observar no deslocamento do histograma para esquerda (Fig. 9), que houve despolarização do $\Delta\Psi m$ com diminuição da intensidade de fluorescência diferenciada do controle negativo, onde M1 corresponde às células marcadas com Rho 123.

Figura 9 - Análises por citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto TAP-01 e marcadas com Rod 123.



Legenda: (A) Controle de promastigotas; (B) Promastigotas tratados com H_2O_2; (C-D) Promastigotas tratados com 11.85 e 23.7µM do composto TAP-01.

Discussão

Apesar de suas limitações, como alta toxicidade e aumento da resistência desses fármacos, os antimoniais pentavalentes continuam sendo o tratamento de primeira escolha para as leishmanioses na maioria das áreas endêmicas (MESQUITA et al., 2014). Como consequência, há uma urgente necessidade de buscar novos agentes leishmanicidas que sejam de fácil síntese, baixo custo, eficazes e que não induzam à efeitos colaterais. Um critério importante na busca de compostos ativos contra parasitos intracelulares com potencial terapêutico é sua ação contra as formas parasitárias, além de baixa toxicidade para células hospedeiras.

Nossos resultados mostraram que os compostos da classe tiazól (MB-1.1, MB-1.5, PA-1C e TAP-06) e piridil-tiazól (TAP-01) apresentaram ação leishmanicida sobre as formas promastigotas, sendo este último o que apresentou melhor atividade. Da Santana et al. (2017) e Barbosa (2015) testaram compostos derivados de 1,3-tiazól contendo 4-(trifluorometil)-benzilideno, inclusive o MB-1.1 e MB-1.5 testados no presente estudo, e relataram ação destes compostos como agentes antitumorais e tripanocidas. Diante dos dois estudos, pode-se inferir que o substituinte metóxi na posição "*para*" do fenil, no composto MB-1.5, pode estar relacionado a essa boa ação (SANTANA et al., 2017). No entanto, em nosso estudo, a ausência do metóxi no composto MB-1.1 tornou-o mais eficaz para as formas promastigotas de *L. infantum* do que o MB-1.5, apresentando IC_{50} de 60.5 e 62.26 µM respectivamente. Ausência ou presença dos substituintes no anel fenil mostrou diferenças *in vitro* na atividade desses compostos.

Derivados de piridina triazól cetonas foram testados contra quatro diferentes espécies de *Leishmania* (*L. infantum, L. braziliensis, L. guyanensis e L. amazonensis*), observando-se que, em geral, os núcleos piridil-tiazól atua de forma eficiente e independente da espécie de *Leishmania* contra as formas promastigotas (ADAM et al., 2014). Já Musonda et al. (2009) demonstraram a eficiente atividade antiplasmodial e leishmanicida (*L. donovani*) de compostos piridil-pirimidinas. Da mesma forma, observou-se que o composto TAP-01 (piridil tiazól), testado no presente estudo, exibiu maior ação contra promastigotas de *L. infantum* na concentração de 11.85 µM quando comparado aos demais compostos estudados. O que reforça a ação leishmanicida de compostos com esses núcleos. Gomes et al. (2016) mostrou potente inibição de derivados tiazolil-hidrazona sob tripomastigotas, no entanto, neste presente estudo,

o composto PA-1C não confirmou sua potente ação frente a *L. infantum*, apresentando IC_{50} de 150.57 µM.

Conforme Gillis et al. (2015), compostos que possuem Fluor (F) ligado ao Carbono (C) tem um diferencial na lipofilicidade, permeabilidade, estabilidade metabólica e propriedades farmacocinéticas, como também inserir o átomo de F, e/ou um grupo que o contenha, em outro composto pode melhorar a seletividade, a potência intrínseca e aumentar a eficácia (ZHU et al., 2014). Esses achados corroboram com o que foi descrito no presente estudo, uma vez que os compostos MB-1.1 (196.88 µM) e MB-1.5 (757.43 µM) apresentaram baixo potencial citotóxico (CC_{50}) frente aos macrófagos J774 dentre os compostos analisados. Já o composto TAP-01 demonstrou baixo valor de inibição (CC_{50}), frente aos macrófagos J774 (141.21 µM) e macrófagos peritoneais (270.36 µM), com alto índice de seletividade (IS), 12 e 15. Relato parecido foi descrito por Adam et al. (2014) em seu trabalho com derivados piridina triazól cetonas, no qual demontraram baixa citotoxicidade (CC_{50} > 300 µM) em macrófagos J774 frente a compostos com anel piridil. Cardoso et al. (2014) em seu estudo com *T. cruzi*, demonstraram que a inserção do anel piridina aumentou notavelmente a atividade tripanocida e que os compostos *para* substituídos foram mais potentes que o fármaco de referência, o Benzonidazol, a exemplo do TAP-06, indicando assim a importância da posição do substituinte metóxi no anel fenil na atividade tripaniocida. Este mesmo composto, também testado neste presente estudo, não obteve bons resultados na ação leishmanicida.

A forma intracelular é a encontrada nos hospedeiros vertebrados, sendo esta responsável por causar a doença nesses organismos. Desse modo, a avaliação dessas formas é mais relevante para a atividade leishmanicida, conforme Fernandes et al. (2012), enquanto que as formas promastigotas podem ser consideradas como um parâmetro preliminar para definir novos compostos (MESQUITA et al., 2014). Em relação ao efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas de *L. infantum*, Tajería et al. (2018) testaram vários derivados 1,5-naftilridina que apresentaram IC_{50} baixo, a partir de 0.29 µM entre os derivados estudados, e CC_{50} > 100 µM em esplenócitos de camundongos, significando que o IS tem alto efeito de morte seletiva aos parasitos. Esses dados reforçam o potencial leishmanicida de fármaco com núcleo piridina sob as formas amastigotas, assim como foi verificado em nosso estudo, onde o TAP-01 diminuiu o índice de sobrevivência (Iso) com valor de IC_{50} de 17.8 µM. Ainda corroborando com nossos resultados, no trabalho de Cardoso et al. (2014), o composto TAP-01 apresentou inibição quase que absoluta (99.3%) da Cisteína protease (cruzaína), enzima relacionada à atividade proteolítica e penetração do parasito na célula hospedeira. Logo, diante desses achados, pode-se inferir que a ausência do substituinte metóxi na posição *para* do anel fenil incrementou a

atividade leishmanicida frente à cepa MHOM/BR/BH46 de *L. infantum* em suas fases evolutivas. Pode-se observa também que o valor de IC_{50} em amastigotas foi superior ao encontrado em promastigotas.

Muylder et al. (2011) afirmam que, devido às diferenças biológicas existentes entre as formas e o ambiente em que se encontram no organismo de cada hospedeiro, o IC_{50} das formas intracelulares pode ser maiores devido a necessidade de permeabilidade do composto em atravessar a membrana do macrófago e do vacúolo parasitóforo até alcançar o parasito. No trabalho de Adam et al. (2014), testando compostos derivados de piridina triazól cetonas contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, também foi constatado a redução de sobrevivência de amastigotas em macrófagos. Esse trabalho reforça os resultados do presente estudo em relação ao potencial leishmanicida dessa classe de fármaco contra essa forma evolutiva.

A membrana dos eritrócitos pode ser alterada caso ocorra algum tipo de interação com agentes químicos, o que nos leva a inferir um possível mecanismo de ação indesejada na membrana (MOHANTY et al., 2014). Assim, o teste hemolítico foi realizado como mais um parâmetro citotóxico para verificar o perfil de segurança da formulação do composto TAP-01. Os resultados encontrados mostram que houve hemólise de 10 e 15% a depender da concentração testada, sendo não significante ($p>0.05$) em relação ao controle negativo. Essa porcentagem hemolítica pode ser justificada devido a lipofilicidade da estrutura química do composto, que interage com a parte lipídica da membrana celular da hemácia, tornando-a mais permeável e conduzindo à lise (BAKKALI et al., 2008).

Um mecanismo de resistência primária à infecção por *Leishmania* é a produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos infectados (LIMA-JÚNIOR et al., 2013). No presente estudo foi observado que o composto TAP-01 não induziu produção de ON nos macrófagos infectados, em nenhuma das concentrações testadas (0.06 a 1 μM), nem nos macrófagos não infectados. Isso nos leva a inferir que este composto utiliza outra via para potencializar sua ação leishmanicida, diferente do aumento do ON. Da mesma forma, o tratamento com a AmB em macrófagos infectados também não induziu produção significativa de ON. Resultados similares foram encontrados no estudo de De Mello et al. (2014), no qual os macrófagos J774 infectados com *L. braziliensis*, após 6 horas de incubação, e tratados a produção de ON caiu para um nível insignificante, embora tenha havido uma redução significativa no índice de infecção. Esse dado reforça que o composto TAP-01 testado nesse estudo, de fato, estimula a eliminação dos parasitos por um mecanismo diferente, uma vez que ele manteve reduzido o Iso de amastigotas em macrófagos. Torres-Santos et al. (2009) também descobriram que a atividade antiamastigota

de determinados compostos pode não ser devida à ação do ON, e sugeriram que o composto pode ter efeito direto sobre o parasito. Os resultados reforçam os encontrados por Aliança et al. (2017), no qual compostos testados não induziram produção de ON por macrófagos infectados por *L. infantum*.

A produção de ON não é a única via para o controle da infecção intracelular por *Leishmania* em macrófagos, mas pode ser realizada tanto por mecanismos independentes de oxigênio, como também da produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e peróxido de oxigênio (H_2O_2) (SINGH et al. 2012). Ainda no nosso estudo, macrófagos peritoneais não infectados e tratados com os compostos MB-1.1, MB-1.5, PA-1C, TAP-01 e TAP-06 induziram à produção de ON. Segundo Holzmuller et al. (2002), os macrófagos mesmo não estando infectados podem ser induzidos por substâncias a produzirem ON, corroborando com nossos resultados.

Com o objetivo de avaliar as alterações ultraestruturais do parasito, as formas promastigotas em *L. infantum* foram tratadas com TAP-01, observando-se arredondamento e grande degradação da membrana do parasito pela ação do composto de acordo com a concentração testada, além da vacuolização citoplasmática, núcleo picnótico, encolhimento do corpo celular e encurtamento do flagelo. Alterações semelhantes foram relatadas no estudo de Caldas et al. (2018) estudando a atividade de derivados de lactonas em *L. amazonensis* e Menna-Barreto et al. (2009) analisando a ação de naftomonas em *T. cruzi*. As atividades desencadeadas pelos compostos testados nesse estudo estão relacionadas a presença de substituintes nos seus radicais. Logo, a ausência do grupo metóxi na posição *para* do anel fenil propiciou o aumento da atividade leishmanicida do composto TAP-01, o que fortalece relatos da literatura do potencial lipofílico do anel piridil (TAJERIA et al., 2018; MUSONDA et al. 2009). Alterações ultraestruturais induzidas por compostos candidatos à fármacos permitem interpretações acerca do modo de ação e a via de morte celular em protozoários (RODRIGUES; DE SOUZA, 2008).

Como o composto TAP-01 mostrou-se promissor como agente leishmanicida, foi realizada análise para inferirmos se houve alteração na integridade da membrana plasmática das formas promastigotas de *L. infantum* tratadas. Foram marcadas com Iodeto de Propídio (IP) que tem afinidade por ácidos nucléicos, além de ser impermeável às células intactas. Nossos ensaios demonstraram que, com exceção do controle positivo, os grupos tratados com 11.85 e 23.7 µM induziram alterações morfológicas nos parasitos. Segundo Menna-Barreto et al. (2009), o arredondamento do corpo celular e aumento de seu volume, provoca a perda do equilíbrio osmótico e aumento de vacuolização citoplasmática mesmo não havendo ruptura de membrana. Sugerindo, dessa forma, o mecanismo de morte celular por apoptose.

Por ser uma organela única e desempenhar atividade singular no metabolismo energético dos tripanossomatídeos, a mitocôndria torna-se um alvo promissor em ensaios leishmanicidas uma vez que sua forma é fortemente regulada, e um desequilíbrio no seu potencial mitocondrial ($\Delta\psi m$) é irremediável no processo bioenergético (OSELLAME et al., 2012). Este fato pode levar à mudanças na sua morfologia e viabilidade, o que induz o parasito à apoptose (BASMACIYAN et al., 2018). Os testes foram realizados com o fluorocromo Rodamina 123 (Rod 123) que se concentra em mitocôndrias ativas viabilizando a análise do potencial eletroquímico dessa organela. O composto TAP-01 foi capaz de induzir despolarização em promastigotas tratadas com 1x IC_{50} (-0.60), conforme demonstrado pelos valores do índice de variação < +1, bem como inchaço mitocondrial, vacuolização citoplasmática, presença de partículas eletrodensas e fragmentação da cromatina que são características de apoptose ou mesmo processo autofágico (YAMAMOTO et al., 2015) e que foram fortalecidos pelos achados da MET. Resultados semelhantes, como alteração na mitocôndria, distribuição de cromatina e membrana plasmática foram encontradas por Do Campo et al. (1978) sob as três formas evolutivas de *T. cruzi*, também sugerindo processos apoptóticos.

Da mesma forma na maior concentração testada 2x IC_{50} (-0.87), o mesmo composto induziu à uma maior despolarização do $\Delta\psi m$ e intensa degradação citoplasmática no parasito. Segundo Salomão et al. (2013) e Sharma et al. (2012), estes eventos estão relacionados aos que ocorrem durante o processo apoptótico. Portanto, é razoável sugerir que o composto TAP-01 exerceu seu efeito leishmanicida em promastigotas de *L. infantum* por afetar a função mitocondrial do parasito. Sendo esta organela o alvo inicial que induz a morte celular. Ainda corroborando com nossos resultados, tratamentos com compostos que induzem alterações na membrana e na cromatina, sugerem envolvimento de um processo de morte celular por apoptose (RODRIGUES et al., 2008).

Conclusão

Conclui-se que os resultados apresentados indicam que o composto com núcleos piridil-tiazól, sem substituintes na posição *para* do anel aromático fenil, demonstrou ser o agente leishmanicida mais promissor do estudo, quando comparado aos demais compostos que possuem o núcleo tiazól.

O composto TAP-01 apresentou atividade leishmanicida contra as formas evolutivas de *L. infantum*, baixa citotoxicidade frente às células de mamíferos e danos ultraestruturais, que sugerem afetar a função mitocondrial do parasito. Assim, esses resultados fornecem embasamento para estudos posteriores das propriedades químicas do núcleo piridil-tiazól (TAP-01) para o possível uso dessa estrutura em novos fármacos leishmanicidas. Além da necessidade de também investigar sobre o mecanismo de ação deste em estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ADAM, R. et al. Triazolopyridyl ketones as a novel class of antileishmanial agents. DNA binding and BSA interaction, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p.1-31, 2014.

ADAMS, M. et al. The synthesis and antiparasitic activity of aryl- and ferrocenyl-derived thiosemicarbazone ruthenium(ii)earene complexes, **Dalton Transactions,** v. 42. p. 4677-4685, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3dt32740j> Acesso em: 24dez. 2018.

ALIANÇA, A. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, 2017.

ALMEIDA-SOUZA, F. et al. In vitro activity of *Morinda citrifolia* Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of *Leishmania amazonensis* and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages. **BMC Research Notes,** v. 11, p. 492-499, 2018

ANNANG, F. et al. High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human african trypanosomiasis, leishmaniasis, and chagas disease. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, p. 82-91, 2015.

BAKALLI, et al. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. **Metabolic & Immune Drug Discovery**, New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. v.9, p. 90-102, 2015.

BASMACIYAN, L. et al. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. **Microbial Cell**, v. 5, p. 404-417, 2018.

BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruz*i epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 57-62, 2012.

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v. 7, p. 1-12, 2013.

BONGARZONE, S.; BOLOGNESI, M. L. The concept of privileged structures in rational drug design: focus on acridine and quinoline scaffolds in neurodegenerative and protozoan diseases. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 251-268, 2011.

BUENO, M. M. et al. Design, synthesis and antimalarial evaluation of novel thiazole derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 26 p. 3938-3944, 2016.

CALDAS, L. A.et al. Antileishmanial activity and ultrastructural changes of sesquiterpene lactones isolated from *Calea pinnatifida* Asteraceae, **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 348-353, 2019.

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

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation, **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 86, p. 48-59, 2014.

CHANDER, S. et al. Synthesis and activity of benzopiperidine, benzopyridine and phenyl piperazine based compounds against *Leishmania infantum*, **Experimental Parasitology,** v. 189, p. 49-60, 2018.

CHEN, H. et al. Evolutions in fragment-based drug design: the deconstruction- reconstruction approach. **Drug Discovery. Today**, v. *20*, n. 1, p. 105-113, 2015.

DA COSTA FILHO, A. V. et al. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.41, p. 424-427, 2008.

DA SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v.17. p. 874-886, 2017.

DE FREITAS, et al. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers Immunology**, v. 7, p. 153, 2016.

DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

DE OLIVEIRA FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 23, p. 7478-7486, 2015.

DE VRIES, J. C. H. et al. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, p. 99/109, 2015.

DOCAMPO, R. et al. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in defferent stages of *Trypanosoma cruzi*. **Zeitschrift für Parasitenkunde,** v. 57, p. 189-198, 1978.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, p. 476-485, 2012.

FRANZEN, R.G. Recent advances in the preparation of heterocycles on solid support: A review of the literature. **ACS Combinatorial Science**, v. *2*, p. 195-214, **2000**.

GLISONI, R. J. et al. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl-bcyclodextrin, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 596-603, 2012.

GILLIS, E. P. et al. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 8315-8359, 2015.

GOMES, P. M. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-12, 2016.

GRADONI, L. et al. Drung regimens for visceral lishmaniasis in Mediterranean countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, p. 1272-1276, 2008.

HALL, M. D. et al. Synthesis, Activity, and Pharmacophore Development for Isatin-_-thiosemicarbazones with Selective Activity toward Multidrug-Resistant Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 3191–3204, 2009.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. **Accounts of chemical research**, v. 34, n. 9, p. 727-736, 2001.

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

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

JOSHI, J. et al. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-na experimental study. **Parasitology International**, v. 63, p. 612–620, 2014.

KAUSHIK, N. K. et al. Biomedical Importance of Indoles. Molecules, v. 18, p. 6620-6662, 2013.

LARSSON, C. E; LUCAS,R. **Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária.** São Caetano do Sul: Interbook, p. 313-344.2016.

LEITE, A. C. L. et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1-30, 2018.

LESSA J . A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: structural studies and investigation on the anti-trypanosomal activity. Polyhedron , v. 30, p. 372-380, 2011.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1ß Production Induces Nitric Oxide-mediated Resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, p. 909-915, 2013.

LIU, Z. Y. et al. Boykin, Synthesis and antiparasitic activity of new bis-arylimidamides:

DB766 analogs modified in the terminal groups. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 83, p. 167-173, 2014.

LUKMANTARA, A. Y. et al. Synthesis and biological evaluation of substituted 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones: novel structure-activity relationships underpinning their anti-proliferative and chelation efficacy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 967-974, 2013.

MJAMBILI, F. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-aminothiazole derivatives as antimycobacterial and antiplasmodial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistr**y, v. 24. p. 560-564, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, p. 157-168, 2009.

MESA-ARANGO, A. C. et al. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 286, p. 1- 10, 2012.

MESQUITA, J. T. et al. Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi:* reactive oxygen species induced by econazole. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 389, p. 293–300, 2014.

MISHRA, J.; SINGH, S. Miltefosine resistance in Leishmania donovani involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 397-406, 2013.

MUSONDA, C. C. et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridyl pyrimidines with in vitro antiplasmodial and antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 401-405, 2009.

MUYLDER, G., et al. A screen against Leishmania intracellular Amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit**. PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e1253, 2011.

OSELLAME, L. D. et al. "Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function," **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 26, p. 711-723, 2012.

PAVAN, F. R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity, **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 45, p. 1898-1905, 2010.

RABITO, M. F. et al. In vitro and in vivo anti-*Leishmania*activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from*Tanacetumparthenium*(L.) Schultz-Bip. **Experimental Parasitology,** v. 143, p. 18-23, 2014.

RIBEIRO, T. G. et al. Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective antileishmanial drug-delivery system. **Journal of International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 877-890, 2014.

RODRIGUES, J. C., DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Desing**, v. 14, p. 925-938, 2008.

SALOMÃO, K. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. BMC Microbiol. v. 13, 196. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-196. 2013.

SANTIAGO, E. D. F. Evaluation of the Anti-Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicar bazones and Thiazoles. **Journalof Antimicrobial Agents Chemother**, v.58, p. 352-363, 2014.

SARAVOLATZ, L. D. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious. Diseases**, v. 43, n. 7, 917-924, 2006.

SHARMA, N. et al. Stilbene-chalcone hybrids: design, synthesis, and evaluation as a new class of antimalarial scaffolds that trigger cell death through stage specific apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 55, p. 297-311, 2012.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2012.

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B treatment of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **Journal of the European Academy of Dermatology Venereology,**v. 25, p. 973-977, 2011.

TAJERÍA, A. et al. Substituted 1,5-naphthyridine derivatives as novel antileishmanial agents. Synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, 137-147, 2018.

TEIXEIRA, M. C. et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of diferent *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 88, p. 963-968, 2002.

TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: **Ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CEDERJ, 2013.

TIWARI, N. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 26-41, 2018.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 469-472, 2009.

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **THE LANCET,** v. 359, p. 2188-2194, 2002.

VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinone e A biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 897-905, 2008.

WERMUTH, C. G. et al. Chemistry and Human Health Division Medicinal Chemistry Section, **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1129, 1998.

World and Health Organization (WHO), 2018. **Leishmaniasis Fact Sheet**. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 02 de dezembro.

YAMAMOTO, E. S. et al. The effect of ursolic acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is related to programed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis, **PLoS One**, v. 10, p. e0144946, 2015.

ZULfiQAR, B. et al. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development, **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 1516-1531, 2017

ZHU, W. et al. Soloshonok, V. A. Recent Advances in the Trifluoromethylation Methodology and New CF3-Containing Drugs. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 167, p. 37-54, 2014.

6 CONCLUSÕES

a) Todos os compostos utilizados foram capazes de inibir o crescimento dos parasitos, bem como são mais seletivos ao parasito quando comparados às células de mamíferos;

b) Os compostos da classe tiossemicarbazona (JW-16.2), tiazól (GT-14) e piridil-tiazól (TAP-01) foram os mais promissores contra *Leishmania infantum*, por apresentarem potente ação leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas, baixa citotoxicidade (>100 µM) para as células de mamíferos, causaram danos ultraestruturais nas formas promastigotas, fornecendo embasamento para estudos posteriores acerca de seu mecanismo de ação em outras organelas.

c) O composto JW-16.2, por análises qualitativa e quantitativa, mostrou melhor potencial leishmanicida, quando comparados ao GT-14 e TAP-01.

d) Nossos dados apontam para o uso dos compostos GT-14, TAP-01 e, especialmente, JW-16.2 em outros testes biológicos *in vivo* como potenciais agentes quimioterápicos no tratamento da leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular.** 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

AFONSO, M. M. S. **"Estudos sobre *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana"**. 2013. 172f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública)-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

AL-ABDELY, H. M. et al. Efficacy of the Triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2910–2914, 1999.

ALMEIDA‐SOUZA, F. et al. In vitro activity of Morinda citrifolia Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of Leishmania amazonensis and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages. **BMC Research Notes**, v. 11, p. 492-499, 2018.

ALTINTOP, M. D. et al. Design, synthesis, and evaluation of a new series of thiazole-based anticancer agents as potent Akt inhibitors. **Molecules,** v. 23, p. 1318, 2018.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of *curcumin* studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemical and Biologycal Interact**. v. 174, n.2, p. 134-9. 2008.

BARBOSA, J. F. et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. **Metabolic & Immune Drug Discovery**, New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention : A Review of Recent Patents. v.9, p. 90-102, 2015.

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-12, 2013.

BHARTI, S. K. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 45, p. 651-660, 2010. Disponível em: <http://dx.doi .org/10.1016/j.ejmech.2009.11.008>. Acesso em 24 dez. 2018.

BOGDAN, C. et al. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 17-26, 2000.

BOZDAG-DUNDAR, O. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p. 6012–6017, 2007

BRASIL, **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília. Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, **Manual de recomendações para o diagnóstico, tratamento de acompanhamento de pacientes com a coinfecção *Leishmania*-HIV**. Brasília. Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL, **Guia de Vigilância em Saúde.** Brasília. Ministério da Saúde, 2016.

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

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

BRITTA, E. A. et al. 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces mitochondrial alterations in epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 142, p. 978-988, 2015.

BUENO, M. M. et al. Design, synthesis and antimalarial evaluation of novel thiazole derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 26 p. 3938-3944, 2016.

BYRNES, R. W. et al. Oxidative stress induced by a copper-thiosemicarbazone complex. **Biochemistry**, v. 29, p. 7046-7056, 1990.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation, **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 86, p. 48-59, 2014.

CASANOVA, M. et al. Characterisation of polyglutamylases in trypanosomatids. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 45, n. 2-3, p. 121-132, 2015.

CHANDER, S. et al. Synthesis and activity of benzopiperidine, benzopyridine and phenyl piperazine based compounds against Leishmania infantum, **Experimental Parasitology,** v. 189, p. 49-60, 2018.

CHATZIS, M. K. et al. Evaluation of indirectimmunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmaniainfantum*in clinically normal and sick cats. **Experimental Parasitology**, v. 147, p. 54-59, 2014.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.

CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, n. 5, p. 365-372, 2011.

CHIYANZU, I. et al. Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. *13*, n. 20, p. 3527-3530, 2003.

CUNHA-JÚNIOR, EDÉZIO FERREIRA**. Estudos pré-clínicos da pterocarpanoquinona LQB-118: toxicidade subaguda, eficácia em leishmaniose visceral experimental e**

mecanismo de ação. 2015. 190f. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DE SOUZA, W. et al. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, Oxford, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

DE FREITAS, et al. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers Immunology**, v. 7, p. 153, 2016.

DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

DE SOUZA, W. et al. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. International. **Journal of Cell Biology**, Oxford, v. 10, 2010.

DIAZ, N. L. et al. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 288-93, 2003.

DOCAMPO, R. et al. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. **Philophisical Transactions of the Royal Society,** London, v. 365, p. 775-784, 2010.

FEIJÓ, D. et al. Dendritic cells and Leishmania infection: Adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, Baltimore, v. 2016, 2016.

GLUENZ, E. et al. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 13, p. 473-479, 2010.

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, p. 3212-3219, 2004.

GOMES, P. M. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-12, 2016.

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

HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

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

JHA, R. K. et al. The treatment of visceral Leishmaniasis: Safety and Efficacy. **Journal of Nepal Medical Association,** v. 52, n. 192, p. 645-651, 2013.

JOSHI, J. et al. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-na experimental study. **Parasitology International**, v. 63, p. 612–620, 2014.

KAPPAGODA, S. LOANNIDIS, J. P. Prevention and control of neglected tropical diseases: overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. **Bulletin of the World Health Organization** , v. 92, n. 5, p. 356-366, 2014.

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

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 8, p. 1–10, 2012.

LESSA J . A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: structural studies and investigation on the anti-trypanosomal activity. Polyhedron , v. 30, p. 372-380, 2011.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitologia**. v. 32. p. 161-259, 1993.

LIESEN, A.P. et al. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 369-376, 2008.

LIU, Z. Y. et al. Boykin, Synthesis and antiparasitic activity of new bis-arylimidamides: DB766 analogs modified in the terminal groups. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 83, p. 167-173, 2014.

MATHEW, B. et al. Oxazole and thiazole analogs of sulindac for cancer prevention. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 743-753, 2018.

MELO, J. O. F. et al. Heterocíclicos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **Biomedical Research International**, New York, v. 2014, 2014.

MERCALDI, G. F**. Fosfoglicerato Mutase de Trypanosoma brucei: estrutura e mecanismo de reação.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.

MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.

MIRANDA, K. et al. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 2-9, 2008.

MJAMBILI, F. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-aminothiazole derivatives as antimycobacterial and antiplasmodial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24. p. 560-564, 2014.

MORENO-RODRÍGUEZ, A. et al. In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of Trypanosoma cruzi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 23-29, 2014.

MUNDER, M. et al. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **TheJournal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3771-3777, 1999.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Bioscience Reports**, v. 19, p. 133-154, 1999.

MURRAY, H. W.; TEITELBAUM, R. F. L- arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocyte. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 513-517, 1992.

MUSONDA, C. C. et al. Synthesis and evaluation of 2-pyridyl pyrimidines with in vitro antiplasmodial and antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 401-405, 2009.

MUTISO, J. M. et al. Leishmania parasite specific CD4+ synergizes and correlates positively with CD8+ T cells in the production of gamma interferon following immunization of the vervet monkey (Chlorocebus aethiops) model. **Scientia Parasitologica**, v. 14, n. 1, p. 7-19, 2013.

NEVES, Davi Pereira et al. **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in Leishmania infantum-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v.29, n.3, p. 122-7, 1999.

PESCE, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. **PLoS Pathogens: A Peer-Reviewed Open-Access Journal**, v. 5, n. 4, p. e1000371, 2009.

PERANZONI, E. et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology.**Immunobiology**, v. 212, n. 9-10, p. 795-812, 2007.

PERROTTA, I. et al. iNOS induction and PARP-1 activation in human atherosclerotic lesions: an immunohistochemical and ultrastructural approach. **Cardiovascular Pathology**, v. 20, p. 195-203, 2011.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, Brasília, DF, v. 16, p. 79-82, 2004.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 2005. P. 713- 732.

POPOVIC, P. J. et al. Arginine and immunity. **Journal of Nutrition**, v. 137, Suppl 2, p. 1681S-1686S, 2007.

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

ROTTINI, M. M. et al. In vitro evaluation of (-)α-bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66-72, 2015.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The journal of infection in developing countries,** v. 9, p. 588-596, 2015.

SCHAD, C. et al. Development of a New Antileishmanial Aziridine-2, 3-Dicarboxylate- based Inhibitor with High Selectivity for Parasite Cysteine Proteases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 797-805, 2016.

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **International Journal Parasitology**, Oxford, v. 31, p. 403-1415, 2001.

SCHROEDERELY, C. **Amplificação e Clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma* evansi**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2011.

SIBLEY, D. L. Invasion and intracelular Suvival by Protozoan Parasites. **Immunological Reviews**, v. 18, p. 1199-1216, 2011.

SILVA, S. C. **"Estudo comparativo de cepas de *Leishmania Infantum* – Avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da ixpressão de micrornas em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados"**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Rio Preto, Minas Gerais, 2017.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2013.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, 2016.

SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, p. 1065-1078, 2012.

TEIXEIRA, D. E. et al. Atlas didático: **Ciclo de vida da *Leishmania***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ: Consórcio CEDERJ, 2013.

TIWARI, N. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 26-41, 2018.

VALE DE GATO, M. I. C. **Análise da resposta imunitária celular à Leishmania sp. em murganhos tratados e vacinados**. 2009. 55p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Aplicada) - Universidade de Lisboa, Portugal, 2009.

VILAS, V. et al. Visceral leishmaniasis : a One Health approach. **Veterinary Research**, p. 42-45, 2014.

VINTONYAK, V. V. et al. Identification of thiazolidinones spiro-fused to indolin-2-ones as potent and selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis proteintyrosine phosphatase B. **Angewandte Chemie Internation Edition,** v. 49, p. 5902-5905, 2010.

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

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. **Immunology Research**, v. 41, p. 15-25, 2008.

World and Health Organization (WHO), 2018. **Leishmaniasis Fact Sheet**. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 02 de dezembro.

YEUNG, B. K.et al. Spirotetrahydro beta-carbolines (spiroindolones): a new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 5155-5164, 2010.

ZHANG, K. et al. Sphingolipids in parasitic protozoa. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 688, p. 238-248, 2010.

ZULfiQAR, B. et al. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development, **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 1516-1531, 2017.

APÊNCIDE A - ARTIGO 1 SUBMETIDO À ACTA TROPICA

Thiosemicarbazone and thiazol: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity against *Leishmania infantum*

Camila Marques Queiroz[1,4,] Gevanio Bezerra de Oliveira Filho[3], José Wanderlan Pontes Espíndola[3], Amanda Vasconcelos do Nascimento[1], Virginia Maria Barros de Lorena[5], Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves[1,2], Paula Roberta da Silva[1], Luiz Carlos Alves[1,2], Ana Cristina Lima Leite[3], Fábio André Brayner dos Santos[1,2,4].

[1]Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 50670-420.

[2]Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 52171-011.

[3] Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 50740-520.

[4]Departamento de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 52171-011.

[5]Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 50670-420.

The corresponding author is Camila Marques Queiroz – cmilacg@hotmail.com

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, especially in developing countries. *Leishmania infantum* corresponds to the species responsible for the most severe form of this infection, called Visceral Leishmaniasis (VL). It affects the splenic and hepatic system and, when left untreated, can lead to death in 95% of cases. There is no human vaccine available and the recommended treatment, pentavalent antimonials and amphotericin B have side effects and allow the development of resistant strains when treatment is abandoned. Therefore, the search for new leishmanicidal compounds is of urgent need. In the present work, we evaluated the in vitro leishmanicidal action of new thiosemicarbazonic and thiazolid compounds against the evolutionary forms of *L. infantum*, hemolytic activity, ultrastructural alterations, cytotoxicity and nitric oxide levels on macrophages. The data show that compounds JW-16.2, GT-14 were shown to be the most potent of the classes tested. They presented in vitro leishmanicidal activity

against the evolutionary forms of *L. infantum*, low cytotoxicity to mammalian cells, induced NO production in uninfected and infected macrophages, reduced the survival of amastigotes and ultrastructural alterations. Promastigote forms treated with compounds GT-14 showed depolarization of mitochondria.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, thiosemicarbazone, thiazol, *L. infantum*, ultrastructure.

APÊNCIDE B - ARTIGO 2 SUBMETIDO À MICRON

In vitro biological evaluation of the efficacy of a new compound derived from the Pyridyl thiazol class against *Leishmania infantum*

Camila Marques Queiroz[1,4], Amanda Silva dos Santos Aliança[6], Miria de Oliveira Barbosa[3], Paulo André Teixeira de Moraes Gomes[3], Ana Paula Sampaio Feitosa[1,2,], Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso[5], Jana Messias Sandes[2], Luiz Carlos Alves[1,2], Ana Cristina Lima Leite[3], Fábio André Brayner dos Santos[1,2,4].

[1]Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 50670-420.

[2]Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 52171-011.

[3]Laboratório de Planejamento em Química Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 50740-520.

[4]Departamento de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, 52171-011.

[5]Colegiado de Nutrição, Universidade de Pernambuco (UPE), Rodovia BR 203, Km 2, s/n - Vila Eduardo, Petrolina-PE, Brazil, 56328-903.

[6]Departamento de Biomedicina, Universidade CEUMA, Rua Josué Montello, n. 1, Renascença II, São Luís-MA, Brazil, 65.075-120.

The corresponding author is Camila Marques Queiroz – cmilacg@hotmail.com

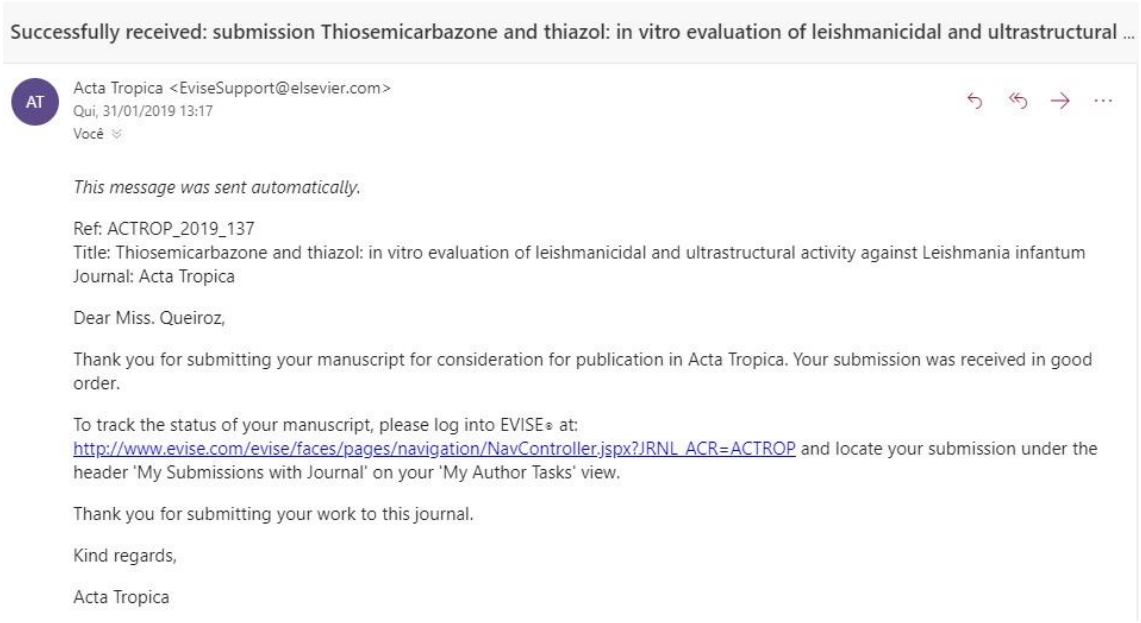
Abstract

Visceral Leishmaniasis (LV) represents the most severe form of the disease affecting the splenic and hepatic system, spleen and bone marrow, with uncontrolled parasitism in macrophages causing organ hypertrophy (hepatosplenomegaly) and dysfunction. Currently, the control is based on chemotherapy, with the use of pentavalent antimonials and as second choice drug, amphotericin B (AmB), miltefosine, paromomycin and pentamidine. In this scenario, it is considered of extreme importance the search for new compounds more effective and less toxic

with leishmanicide potential. In the present work, we evaluated the action of new thiazolidine and pyridyl thiazolidine compounds against the promastigote and amastigote forms of *L. infantum*, cytotoxicity mammalian cells, hemolytic activity, ultrastructural changes, and nitric oxide production in macrophages. Among the analyzed, it was observed that the compound TAP-01 was outstanding in relation to the others, with high leishmanicidal action in vitro, low hemolytic activity, considerable ultrastructural changes, low cytotoxicity and absence of nitric oxide production in macrophages, it is inferring that the compound uses another mechanism of action to exert its leishmanicidal potential. These results provide a basis for further studies of the chemical properties of the pyridyl thiazol nucleus (TAP-01) for the possible use of this structure in new leishmanicidal drugs.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, thiazole, pyridil-thiazole, *L. infantum*, ultrastructure.

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA ACTA TROPICA



Successfully received: submission Thiosemicarbazone and thiazol: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural ...

AT

Acta Tropica <EviseSupport@elsevier.com>
Qui, 31/01/2019 13:17
Você

This message was sent automatically.

Ref: ACTROP_2019_137
Title: Thiosemicarbazone and thiazol: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity against Leishmania infantum
Journal: Acta Tropica

Dear Miss. Queiroz,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Acta Tropica. Your submission was received in good order.

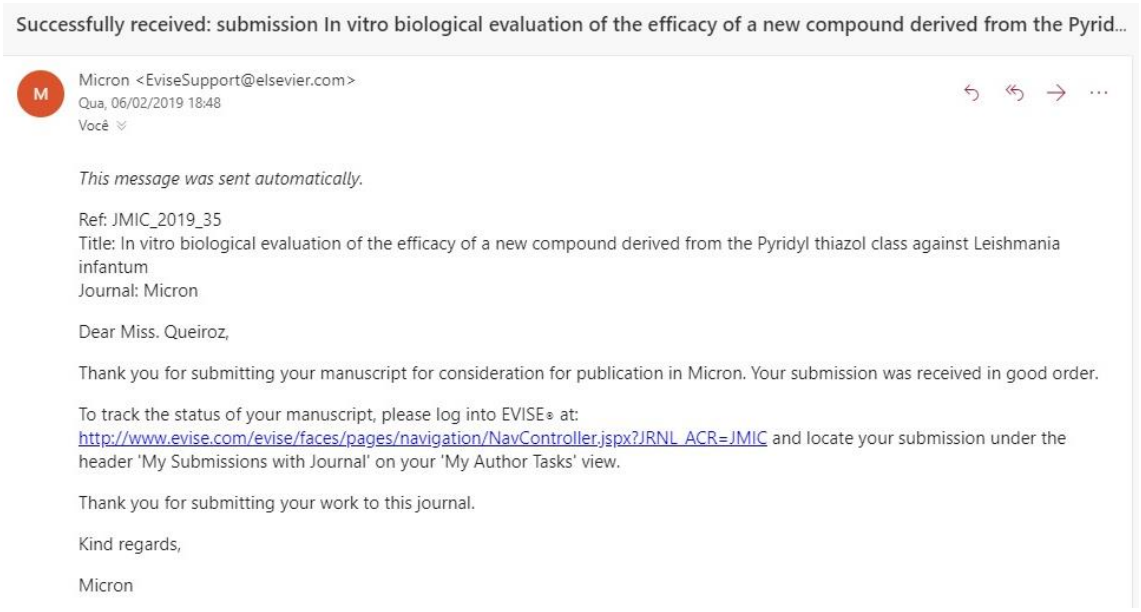
To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:
http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ACTROP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Acta Tropica

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO À REVISTA MICRON



Successfully received: submission In vitro biological evaluation of the efficacy of a new compound derived from the Pyrid...

M

Micron <EviseSupport@elsevier.com>
Qua, 06/02/2019 18:48
Você

This message was sent automatically.

Ref: JMIC_2019_35
Title: In vitro biological evaluation of the efficacy of a new compound derived from the Pyridyl thiazol class against Leishmania infantum
Journal: Micron

Dear Miss. Queiroz,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Micron. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:
http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JMIC and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Micron