



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PERFIL LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN*
SÍLICO DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS

RECIFE
2021

MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PERFIL LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN*
SÍLICO DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

RECIFE
2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

N754a	Nobre, Michelangela Suelleny de Caldas Avaliação farmacológica do perfil Leishmanicida <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de derivados espiro-acridínicos / Michelangela Suelleny de Caldas Nobre. – 2021. 120 f. : il., tab. Orientador: Ricardo Olímpio de Moura. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021. Inclui referências e apêndices. 1. Leishmaniose. 2. Simulação de Acoplamento Molecular. 3. Citocinas. 4. Citocinas. 5. Farmacocinética. I. Moura, Ricardo Olímpio de (orientador). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2021 - 199)
-------	--

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO PERFIL LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN*
SÍLICO DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS

MICHELANGELA SUELLENY DE CALDAS NOBRE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Tese aprovada em: 03/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof.Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Titular Externo)
Instituto Aggeu Magalhães- Recife

Prof. Dr. Anekécia Lauro da Silva (Titular Externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco-UNIVASF

Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza (Titular Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof.Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Suplente externo)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
UNILAB

Prof. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva (Suplente Interna)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

RECIFE
2021

Aos meus familiares: minha mãe, Suely Caldas e meus irmãos,
Mickelangela e Mickael, pelo amor incondicional.
Em especial ao meu esposo, Ivan da Silva, por todo amor, incentivo
e parceria.

Partilho com vocês esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela luz e força concedida a todo o momento.

À minha mãe, Suely, e meus irmãos, Mickelangela e Mickael, pela força, incentivo e apoio.

Ao meu esposo Ivan, pela compreensão e paciência nas horas de ausência, pela parceria, incentivo e amor durante todo este trajeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, pelos ensinamentos, dedicação, apoio, parceria e confiança que tornou possível a realização deste trabalho, sendo muito além de um orientador, um amigo.

Aos meus colaboradores de pesquisa Paula Roberta, Malu, Gleyton, Miguel, Jamire, Yvinny e Mirelly pelas horas dedicadas ao trabalho.

Meus agradecimentos aos amigos do LDSF, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade

A todos os professores que durante esta jornada contribuíram com conhecimento, sugestões e revisões.

A UEPB, UFPE e UnB que abriram suas portas para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As leishmanioses fazem parte do grupo das doenças tropicais negligenciadas, constituindo um grave problema de saúde pública devido sua alta incidência principalmente nas Américas. Devido ao escasso arsenal de fármacos para o tratamento desta doença, além das reações adversas e ao aparecimento de resistência do parasito aos medicamentos preconizados, buscou-se a síntese de 4 novos derivados espiro-acridínicos partindo-se da estruturas não substituídas AMTAC-1 e ACMD-1 para avaliar a atividade leishmanicida nas formas promastigotas e amastigotas axênicas do parasita, sua citotoxicidade em hemácias, células Vero e macrófagos, seu possível mecanismo de ação por regulação das respostas Th1, Th2, Th17, expressão de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de análises *in silico* de ancoragem molecular e ADME-Tox. Este trabalho relatou a atividade antipromastigota (IC_{50PRO} entre 0,05 e 13,8 μM para *L. infantum* e IC_{50PRO} entre 0,73 e 234,95 μM para *L. amazonensis*) de seis derivados espiro-acridínicos, AMTAC-1, AMTAC-2, AMTAC-6, ACMD-1, ACMD-3 e ACMD-6, com satisfatória hemocompatibilidade ($HC_{50} > 400 \mu M$). A atividade amastigota axênica, citotoxicidade em macrófagos, perfil imunomodulador, ancoragem molecular e ADME-Tox foi realizado apenas para os compostos AMTAC-2 e ACMD-3 em *L. amazonensis*, por serem os compostos mais promissores nos testes antipromastigotas com IC_{50PRO} 0,73 e 10,95 μM , respectivamente. O AMTAC-2 (IC_{50AMA} 13,50 μM , $CC_{50macrof}$ 569,50 μM e IS 39,6), aumentou a expressão de espécies reativas de oxigênio e o ACMD-3 (IC_{50AMA} 10,47 μM , $CC_{50macrof}$ 27,22 μM e IS 2,6) demonstrou modulação positiva da IL-17A, espécies reativas de oxigênios e nitrogênio. Os estudos de ancoragem demonstraram o AMTAC-2 com possível perfil multi-alvo, com efetividade principalmente para *Tripanotona reductase* (score 71,42 PDB 4APN) e os estudos ADME possibilitaram predizer que estes compostos têm bom potencial para administração oral e/ ou tópica. Sendo assim, o AMTAC-2 apresenta-se como a molécula mais promissora para atividade leishmanicida nas duas formas do parasita, com boa seletividade e baixa toxicidade, além de um possível perfil multi-alvo que deve ser melhor investigado ampliando os estudos para outros potenciais alvos e mecanismos de morte celular no parasita.

Palavras chaves: Leishmaniose; Ancoragem Molecular; Citocinas; Farmacocinética.

ABSTRACT

Leishmaniasis is part of the group of neglected tropical diseases, constituting a serious public health problem due to its high incidence, mainly in the Americas. Due to the scarce arsenal of drugs for the treatment of this disease, in addition to adverse reactions and the appearance of parasite resistance, we sought to synthesize 4 new spiro-acridine derivatives starting from the unsubstituted structures AMTAC-1 and ACMD -1 to assess the leishmanicidal activity in promastigotes and axenic amastigotes of the parasite, its cytotoxicity in red cells, Vero cells and macrophages, its possible mechanism of action by regulating Th1, Th2, Th17 responses, expression of reactive oxygen species and nitrogen, in addition to in silico Molecular Docking and ADME-Tox analyses. This work reports the antipromastigote activity (IC_{50PRO} between 0.05 and 13.8 μM for *L. infantum* and IC_{50PRO} between 0.73 and 234.95 μM for *L. amazonensis*) of six spiro-acridine derivatives, AMTAC-1, AMTAC- 2, AMTAC-6, ACMD-1, ACMD-3 and ACMD-6, with satisfactory hemocompatibility ($HC_{50} > 400 \mu M$). The axenic amastigote activity, macrophage cytotoxicity, immunomodulatory profile, molecular docking and ADME-Tox were performed only for the compounds AMTAC-2 and ACMD-3 in *L. amazonensis*, as they are the most promising compounds in antipromastigote tests with IC_{50PRO} 0.73 and 10.95 μM , respectively. AMTAC-2 (IC_{50AMA} 13.50 μM , $CC_{50macrof}$ 569.50 μM and IS 39.6) increased the expression of reactive oxygen species and ACMD-3 (IC_{50AMA} 10.47 μM , $CC_{50macrof}$ 27.22 μM and IS 2, 6) demonstrated positive modulation of IL-17A, reactive oxygen and nitrogen species. The docking studies showed AMTAC-2 with a possible multi-target profile, with effectiveness mainly for Trypanothione reductase (score 71.42 PDB 4APN) and the ADME studies made it possible to predict that these compounds have good potential for oral administration and / or topical. Therefore, AMTAC-2 presents itself as the most promising molecule for leishmanicidal activity in both forms of the parasite, with good selectivity and low toxicity, in addition to a possible multi-target profile that should be better investigated by expanding the studies to others potential targets and cell death mechanisms in the parasite.

Keywords: Leishmaniasis, Molecular Docking Simulation; Citokynes; Pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FÊMEA DE FLEBOTOMÍNIO ADULTO.....	23
FIGURA 2 -	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT).....	24
FIGURA 3 -	PACIENTE COM LEISHMANIOSE VISCERAL APRESENTANDO HEPATOESPLENOMEGALIA.....	25
FIGURA 4 -	ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR E VISCERAL POR MUNICÍPIO DE INFECÇÃO. BRASIL, 2017 A 2019.	28
FIGURA 5 -	MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	29
FIGURA 6 -	CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	30
FIGURA 7 -	FÁRMACOS DE PRIMEIRA LINHA PARA TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.	35
FIGURA 8 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA ANFOTERICINA B	37
FIGURA 9 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA PENTAMIDINA.....	39
FIGURA 10 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA PARAMOMICINA	40
FIGURA 11 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS ANTIFÚNGICOS AZÓIS.....	41
FIGURA 12 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA MILTEFOSINA.....	41
FIGURA 13 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA ACRIDINA	45
FIGURA 14 -	ESTRUTURA QUÍMICA BASE DO 7-ARILBENZO [C] ACRIDINA -5,6-DIONAS	46
FIGURA 15 -	ESTRUTURA QUÍMICA BASE DOS COMPOSTOS ACS01 E ACS02	47
FIGURA 16 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO 3A.....	47
FIGURA 17 -	ESQUEMA DE TOPLISS PARA A OTIMIZAÇÃO DE SUBSTITUINTES AROMÁTICOS: M, É MAIS ATIVO; E, É IGUALMENTE ATIVO; L, É MENOS ATIVO QUE O COMPOSTO ANTERIOR DA CHAVE. OS GRUPOS ENTRE COLCHETES ([]) REPRESENTAM SUBSTITUINTES ALTERNATIVOS. AS LINHAS DESCENDENTES.	50
FIGURA 18 -	ESTRUTURA QUÍMICA DOS AMTAC-1 (A) E ACMD-1 (B)	57
FIGURA 19 -	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS REALIZADAS NO AMTAC-1 E ACMD-1.....	58

FIGURA 20 - DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE A SÉRIE AMTAC E ACMD...	74
FIGURA 21 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS 2- AMINO-TIOFENICOS SB-44 (A.), SB-83 (B.) E SB-200 (C.).....	75
FIGURA 22 - COMPOSTOS ESPIRO-ACRIDINICOS E SEUS SUBSTITUINTES...	76
FIGURA 23 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO 5 E 6	77
FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS TIAZOPIRIDINAS (TP) E SUAS SUBSTITUIÇÕES.....	78
FIGURA 25 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS TIOSEMICARBAZÔNICOS TS-03 E TS-04.....	79
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA TH1 ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE IL-2, INF- γ E TNF- α PARA OS DERIVADOS ESPIRO- ACRIDINICOS AMTAC-2 E ACMD-3. BASAL- MACRÓFAGO NÃO INFECTADO; LEISH- MACRÓFAGO INFECTADO COM <i>L. AMAZONENSIS</i> ; 2, 4 E 8 μ G/ML SÃO AS CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS; * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.....	83
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA TH2 ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE IL-10 E IL-4 PARA OS DERIVADOS ESPIRO- ACRIDINICOS AMTAC-2 E ACMD-3. BASAL- MACRÓFAGO NÃO INFECTADO; LEISH- MACRÓFAGO INFECTADO COM <i>L.</i> <i>AMAZONENSIS</i> ; 2, 4 E 8 μ G/ML SÃO AS CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS; * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.....	85
FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA TH17 ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE IL-6 E IL-17A PARA OS DERIVADOS ESPIRO- ACRIDINICOS AMTAC-2 E ACMD-3. BASAL- MACRÓFAGO NÃO INFECTADO; LEISH- MACRÓFAGO INFECTADO COM <i>L. AMAZONENSIS</i> ; 2, 4 E 8 μ G/ML SÃO AS CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS; * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.....	86
FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E DE NITROGÊNIO (ERNS) DOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDINICOS AMTAC-2 E ACMD-3. BASAL- MACRÓFAGO NÃO INFECTADO; LEISH- MACRÓFAGO INFECTADO COM <i>L. AMAZONENSIS</i> ; 2, 4 E 8 μ G/ML SÃO AS CONCENTRAÇÕES DOS DERIVADOS; * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.....	88
FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MEPACRINA, PERFENAZINA, AMTAC-2	

(-OCH ₃) E ACMD-3 (-CL).....	91
FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO 3D DA ANCORAGEM MOLECULAR PARA O AMTAC-2 (-OCH ₃) (AMARELO) E LIGANTE À BASE DE DIARILPIRROL (AZUL) NA TRYR (PDB: 4APN).	92
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO 2D DA INTERAÇÃO ENTRE AMTAC-2 (-OCH ₃) E A TRYR (PDB: 4APN).	93
FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO 3D DA ANCORAGEM MOLECULAR PARA O AMTAC-2 (-OCH ₃), MEPACRINA (ROSA ESCURO) E PERFENAZINA (AZUL) NO ALVO PDB 4APN	93
FIGURA 34 - REPRESENTAÇÃO 3D DA ANCORAGEM MOLECULAR PARA O AMTAC-2 (-OCH ₃) (AMARELO) E ACMD-3 (-CL) (ROSA CLARO NO ALVO PDB 4APN	94
FIGURA 35 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FLUCONAZOL E LIGANTE (8-NITRO XANTINA).....	95
FIGURA 36 - REPRESENTAÇÃO 3D DA ANCORAGEM MOLECULAR PARA O AMTAC 02 (-OCH ₃) (AMARELO) COM FLUCONAZOL (AZUL) NA CYP51 (PDB: 3L4D) (B.).	96
FIGURA 37 - REPRESENTAÇÃO 2D DAS INTERAÇÕES DO AMTAC 02 (-OCH ₃) NA CYP51 (PDB: 3L4D).....	96
FIGURA 38 - ESTRUTURA QUÍMICA DO INIBIDOR CAMPTOTECINA.....	97
FIGURA 39 - REPRESENTAÇÃO 3D DA INTERAÇÃO ENTRE O AMTAC-2 (-OCH ₃) (AMARELO) E A CAMPTOTECINA (ROSA CLARO) COM A TOPOISOMERASE I DE <i>LEISHMANIA</i> (PDB 2B9S)	99
FIGURA 40 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LIGANTE INDENOISOQUINOLINA AI-III- 52 DA 1TL8 (A.) E REPRESENTAÇÃO 3D DA INTERAÇÃO DO LIGANTE (AZUL) E DO AMTAC-2 (-OCH ₃) (AMARELO) COM O ALVO (PDB 1TL8) (B.).	99

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SUBSTITUIÇÕES NO ANEL AROMÁTICO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS BASE AMTACS E ACMDS	59
QUADRO 2 - POSSÍVEIS ALVOS EM <i>LEISHMANIA SP</i> DISPONIBILIZADOS NO <i>PROTEIN DATE BASE</i> E SEUS RESPECTIVOS LIGANTES COMPLEXADOS.....	70
QUADRO 3 - POSSÍVEIS ALVOS BIOLÓGICOS COM POTENCIAL LEISHMANICIDA E SEUS RESPECTIVOS INIBIDORES COMERCIAIS.....	71

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 - ESTRUTURAÇÃO SEQUENCIAL DO DESENVOLVIMENTO DAS ANÁLISES, SÍNTESE, ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> E ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	56
--	-----------

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL, SEGUNDO UF DE INFECÇÃO, BRASIL, 2016 A 2019...	27
TABELA 2 - ESPECIFICAÇÕES DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS DA SÉRIE AMTAC E ACMD	59
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO (IC ₅₀) DE PROMASTIGOTAS (<i>L. INFANTUM</i> E <i>L. AMAZONENSIS</i>) E CONCENTRAÇÃO CAPAZ DE PROMOVER 50% HEMÓLISE (HC ₅₀).	73
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO (IC ₅₀) DE AMASTIGOTAS AXÊNICAS (<i>L. AMAZONENSIS</i>), CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA EM 50% DOS MACROFÁGOS J774 (CC ₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).	80
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO (IC _{50AMA}) DE AMASTIGOTAS AXÊNICAS (<i>L. AMAZONENSIS</i>), CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA EM 50% DE CÉLULAS VERO (CC _{50VERO}) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).	82
TABELA 6 - PONTUAÇÃO NOS ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR NO ALVO TRIPANOTONA REDUTASE (PDB 4APN).....	90
TABELA 7 - PONTUAÇÃO NOS ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR NO ALVO ESTEROL 14-A DESMETILASE (PDB 3L4D)	95
TABELA 8 - PONTUAÇÃO NOS ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR NOS ALVOS TOPOISOMERASE I DE <i>LEISHMANIA</i> (PDB 2B9S) E TOPOISOMERASE I HUMANA (PDB 1TL8).....	98
TABELA 9 - PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO, <i>IN SILICO</i> , DE ABSORÇÃO.	101
TABELA 10 - PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO, <i>IN SILICO</i> , DE DISTRIBUIÇÃO	103
TABELA 11 - PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO, <i>IN SILICO</i> , DO METABOLISMO: INIBIÇÃO DAS ENZIMAS DO CITOCROMO P450(CYP)	105
TABELA 12 - PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO, <i>IN SILICO</i> , DA EXCREÇÃO.	106
TABELA 13 - PARÂMETRO FARMACOCINÉTICO, <i>IN SILICO</i> , DE TOXICIDADE.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME/TOX-	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ALA -	Alanina
APCs -	Células apresentadoras de antígenos (do inglês, Antigen Presenting Cells)
Arg-	Arginase
ASN-	Asparagina
B.O.D -	Demanda bioquímica de oxigênio (do inglês, Biochemical Oxygen Demand)
CCD -	Cromatografia em camada delgada
CORe -	Cordiaquinona E
CPT-	Camptotecina
CYP51 -	14 alfa esterol desmetilase
CYS –	Cisteína
DA-	DNA e Adenina
DCs –	Células dendríticas
DFA-FM -	4-amino-methylamino-2-7-difluororescein diacetato
DFC -	2-7-diclorodihidrofluoresceína
DFC- DA -	2-7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DMPC-	Dimiristoil fosfatidilcolina
DMPG-	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMSO –	Dimetilsufóxido
DSPG -	Colesterol e distearoilfosfatidilcolina
DT –	DNA e Timina
DTNs -	Doenças tropicais negligenciadas
ECG –	Eletrocardiograma
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
FBDD -	Desenho de fármaco baseado em fragmentos
GLU -	Glutamato ou ácido glutâmico
HEM-	HEME ou protoporfirina
HIS -	Histidina
HSPC-	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada

HTS -	Triagem biológica automatizada em alta escala
IAM -	Instituto Aggeu Magalhães
ICLT-	Índice composto de leishmaniose tegumentar
IL-	Interleucina
ILE -	Isoleucina
INF- γ -	Interferon gama
iNOS2 -	Óxido nítrico sintetase 2 indutível
IS -	Índice de seletividade
LBCM-	Laboratório de biologia celular e molecular
LBDD -	Desenho de fármaco baseado no ligante (do inglês “ <i>ligand-based drug design</i> ”)
LC -	Leishmaniose cutânea
LCD-	Leishmaniose cutânea difusa
LCL –	Leishmaniose cutânea localizada
LEU -	Leucina
LM -	Leishmaniose mucosa
LT -	Leishmaniose Tegumentar
LV-	Leishmaniose visceral
LYS -	Lisina
M1-	Macrófago tipo 1
M2 –	Macrófago tipo 2
MET –	Metionina
MFI –	Intensidade média de fluorescência
MTT -	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NETs -	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês “ <i>neutrophil extracellular traps</i> ”)
NK –	<i>Natural killer</i>
NO -	Oxido nítrico (do inglês “ <i>nitric oxido</i> ”)
NOS2 -	Sintase do óxido nítrico
ODC –	Ornitina descarboxilase
OMS -	Organização Mundial de Saúde
PBS -	Solução salina tamponada com fosfato
PCM –	Paracoccidioidomicose

PDB -	Banco de dados de proteína (do inglês " <i>Protein DATA Bank</i> ")
PHE –	Fenilalanina
PRO -	Prolina
Sb ⁺⁵ -	Antimoniais Pentavalentes
SBDD -	Desenho de fármacos baseado no receptor (do inglês " <i>struture-based drug design</i> ")
SER –	Serina
SFB-	Soro fetal bovino
SVS-	Secretária de Vigilância em Saúde
T[SH] ₂ –	Tripanotiona
TGF- β –	Fator de transformação do crescimento beta
Th1-	Linfócitos T <i>help</i> 1
Th17-	Linfócitos T <i>help</i> 17
Th2 –	Linfócitos T <i>help</i> 2
THR -	treonina
TNF- α –	Fator de necrose tumoral alfa
TOPO I -	Topoisomerase I
Treg –	Linfócitos T regulatórios
TryR -	Tripanotiona redutase
TXN –	Triparedoxina
TXPNx -	Triparedoxina peroxidase
TYR-	Tirosina
UF-	Unidade Federativa
VAL -	Valina
VS -"	Triagem virtual (do inglês " <i>virtual screeming</i> "

SUMÁRIO

1	ELEMENTOS INTRODUTÓRIOS	20
1.1	INTRODUÇÃO	20
1.2	OBJETIVOS.....	22
1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	22
1.2.2	<i>Ojetivos específicos</i>	22
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	23
2.2	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES	25
2.3	CICLO DE VIDA	28
2.4	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	30
2.4.1	<i>Imunidade inata</i>	30
2.4.2	<i>Imunidade adaptativa: resposta Th1, Th2, Th17 E Treg</i>	32
2.5	TRATAMENTO FÁRMACOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES.....	34
2.5.1	<i>Fármacos antimoniais</i>	35
2.5.2	<i>Anfotericina B</i>	37
2.5.3	<i>Outras drogas e tratamentos leishmanicidas</i>	39
2.6	RESISTENCIA AO TRATAMENTO ATUAL E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	42
2.7	ACRIDINA E SEUS DERIVADOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	45
2.8	PLANEJAMENTO E ESTRATÉGIAS <i>IN SILICO</i> PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	48
2.9	POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS DA <i>LEISHMANIA SP.</i>	52
3	METODOLOGIA	55
3.1	DELINEAMENTO ESPERIMENTAL.....	55
3.2	PLANEJAMENTO E ESCOLHA DOS COMPOSTOS	57
3.3	AValiação DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	60
3.3.1	<i>Ensaio preliminares</i>	60
3.3.1.1	Cultivo dos parasitos	60
3.3.1.2	Avaliação da atividade antipromastigota (IC _{50Pro}) dos derivados espiro-	

acridínicos frente a cepas de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> pelo método de contagem em câmara de Neubauer	60
3.3.1.3 Avaliação da hemocompatibilidade dos derivados espiro-acridínicos em hemácias (HC ₅₀)	61
3.3.2 Avaliação da atividade antiamastigota	62
3.3.2.1 Breve relato do cenário mundial e desenvolvimento da pesquisa	62
3.3.2.2 Cultivo das amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	63
3.3.2.3 Avaliação da atividade antiamastigota nas formas axênicas de <i>L. amazonensis</i> (IC _{50AMA}) pelo método de MTT	63
3.3.3 Cultivos das células e determinação da citotoxicidade em macrófagos J774 (EC _{50macrof})	64
3.3.4 Determinação do índice de seletividade	65
3.3.5 Avaliação da toxicidade renal através da citotoxicidade em células vero (CC _{50vero}) e índice de seletividade para estas células	65
3.3.6 Avaliação da influência dos derivados espiro-acridínicos no perfil de citocinas das respostas imunológicas Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α), Th2 (IL-4, IL-10 e IL-12) e Th17 (IL-6 e IL-17a).	66
3.3.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	67
3.3.8 Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	68
3.3.9 Análise estatística	69
3.4 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR	69
3.5 ESTUDOS PREDITIVOS DE ADME-Tox (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE)	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA (IC _{50PRO}) E HEMOCOMPATIBILIDADE (HC ₅₀)	73
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA (IC _{50AMA}) E CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774 (EC _{50MACROF})	80
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO (CC _{50VERO})	82
4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AMTAC-2 E ACMD-3 NO PERFIL DE CITOCINAS DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS TH1, TH2 E TH17	83
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	87

4.6	ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR.....	89
4.6.1	<i>Ancoragem molecular do alvo tripanotiona redutase (PDB 4APN)</i>	90
4.6.2	<i>Ancoragem molecular do alvo estero1 14-α desmetilase (PDB 3L4D).....</i>	94
4.6.3	<i>Ancoragem molecular do alvo Topoisomerase I da Leishmania infantum (PDB 2B9S) e Homo sapiens (PDB 1TL8).....</i>	97
4.7	ESTUDOS PREDITIVOS ADME-TOX	100
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
5.1	PERSPECTIVAS	109
	REFERENCIAS.....	110

1 ELEMENTOS INTRODUTÓRIOS

1.1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) com ampla distribuição geográfica e consideradas um problema de saúde pública em vários países, conforme relatado pela Organização Mundial da Saúde. Entre os países afetados, o Brasil tem um dos maiores números de casos notificados, segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (SANTOS-PEREIRA et al., 2019).

As manifestações clínicas das leishmanioses são influenciadas por diversos fatores, incluindo a espécie e genética da *Leishmania sp.*, a interação do parasita com a resposta imune e a genética do hospedeiro, podendo ser classificada em duas formas clínicas principais, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). Entre os fatores que predisõem à resolução ou persistência da infecção por *Leishmania sp.* estão a salubridade do sistema imune do hospedeiro até a espécie do parasita, além dos possíveis padrões de relacionamento entre o parasita e célula hospedeira (PAIXÃO e PITA, 2016; SANTOS-PEREIRA et al., 2019).

Infecção por *Leishmania sp.* induz a produção de certas citocinas pelas células infectadas e inibe outras para modular o recrutamento celular local e a diferenciação celular, facilitando a reprodução do parasita, sendo reguladas tanto pela imunidade inata como celular, principalmente por respostas celulares do tipo Thelp1 (Th1), Thelp2 (Th2), Thelp17 (Th17) e Tregulatórias (Treg) (SANTANA et al., 2017).

Embora as doenças tropicais representem 11,4% do total de doenças que acometem humanos, apenas 21 (1,3%) dos 1556 medicamentos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos especificamente para as DTNs. (COPELAND e ARONSON, 2015; BRASIL, 2016; PETRI E SILVA et al., 2016; BRASIL, 2017). Dentre estes, os medicamentos comerciais usados desde 1912 para o tratamento da leishmaniose são o antimonato N-metilglucamina (Glucantime), o estiboglucona-to sódico (Pentostan), a anfotericina B e a pentamidina. Estes medicamentos apresentam algumas desvantagens para os pacientes relacionadas às dificuldades de administração, já que são exclusivamente por via parenteral, alto custo, alta toxicidade e diversos efeitos colaterais, além de apresentarem resistência do parasita em alguns casos específicos (GONÇALVES et al., 2018).

Como consequência dos problemas de toxicidade, do aumento da resistência parasitária, aumento nas taxas de falha dos tratamentos atuais e da falta de agentes terapêuticos eficazes contra essas DTNs, existe uma necessidade urgente no desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros em comparação aos tratamentos atuais (ROMERO e LOPEZ, 2017).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, sendo ligado as inovações científicas e tecnológicas. A triagem virtual e, em particular, a triagem virtual baseada em receptores, que surgiu como um método confiável e acessível para identificar novos compostos, além da triagem *in silico* de bases de dados químicos e de predição de modelos farmacocinéticos (FIGUEIREDO et al., 2018).

Nas últimas décadas, avanços na bioquímica, biologia molecular e campos genéticos permitiram identificar alvos no parasito leishmania. Entre os principais, estão a tripanotiona redutase (TryR), que age como antioxidante, estando envolvida no metabolismo do tiol nos parasitas; a topoisomerase I (TOPO I), que está relacionado ao superenrolamento do DNA sendo essencial para processo de replicação, transcrição e recombinação do DNA e a 14- α -esterol-desmetilase (CYP51) responsável pela biossíntese de ergosterol da membrana do parasito (HARGROVE et al., 2011; TEJERIA et al., 2016; ROMERO e LOPEZ, 2017; ROSTAMI e KHAMESIPOUR, 2021).

Neste contexto, a família das acridinas tem demonstrado um amplo espectro de propriedades farmacológicas, sendo empregada como agente antibacteriano e revelado atividade antiproliferativa contra protozoários e células tumorais o que possibilitou sua utilização na quimioterapia antiparasitária, inclusive com uma ampla gama de novos derivados de acridinas sintetizados e avaliados com sucesso para atividade leishmanicida (CHTITA et al., 2016).

Entre os derivados acridínicos estão as espiro-acridinas, que têm apresentado significativa atividade antiparasitária, em especial leishmanicida, em estudos anteriores realizado por este grupo de pesquisa (ALMEIDA et al, 2021), o que tornou este grupo químico um importante alvo de pesquisa para descoberta de novos fármacos que possam vir a apresentar melhor resposta terapêutica e/ou menos efeitos adversos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar atividade leishmanicida e possíveis mecanismos de ação de novos derivados espiro-acridínicos através de estudos *in vitro* e *in sílico*.

1.2.2 Ojetivos específicos

- ✓ Estudos preliminares
 - Avaliar atividade antipromastigota dos derivados espiro-acridínicos em cepa de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*;
 - Verificar a hemocompatibilidade dos derivados espiro-acridínicos através da atividade hemolítica;
- ✓ Ensaios principais em *Leishmania amazonensis* com os compostos mais promissores nos ensaios preliminares
 - Avaliar a atividade antiamastigota axênica
 - Verificar a citotoxicidade dos derivados espiro-acridínicos frente a macrófagos J774 e células VERO;
 - Avaliar o índice de seletividade dos compostos;
 - Avaliar imunomodulação nas respostas Th1, Th2 e Th17 dos compostos espiro-acridínicos através das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α ;
 - Avaliar produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
 - Realizar estudos de ancoragem molecular com possíveis alvos no parasita;
 - Realizar estudos *de ADME/Tox* para prever possíveis parâmetros farmacocinéticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por flebotomíneos fêmeas hematófagas da subfamília Phlebotominae, **Figura 1**. As doenças são endêmicas em países da Europa, Oriente Médio, Sudeste Asiático e Américas, onde são consideradas um problema de saúde pública afetando cerca de 350 milhões de pessoas juntamente com dois milhões de novos casos anuais no mundo (GUIMARÃES- E-SILVA et al., 2017; BRASIL, 2021).

Figura 1: Fêmea de Flebotomíno adulto.



Fonte: Brasil, 2016

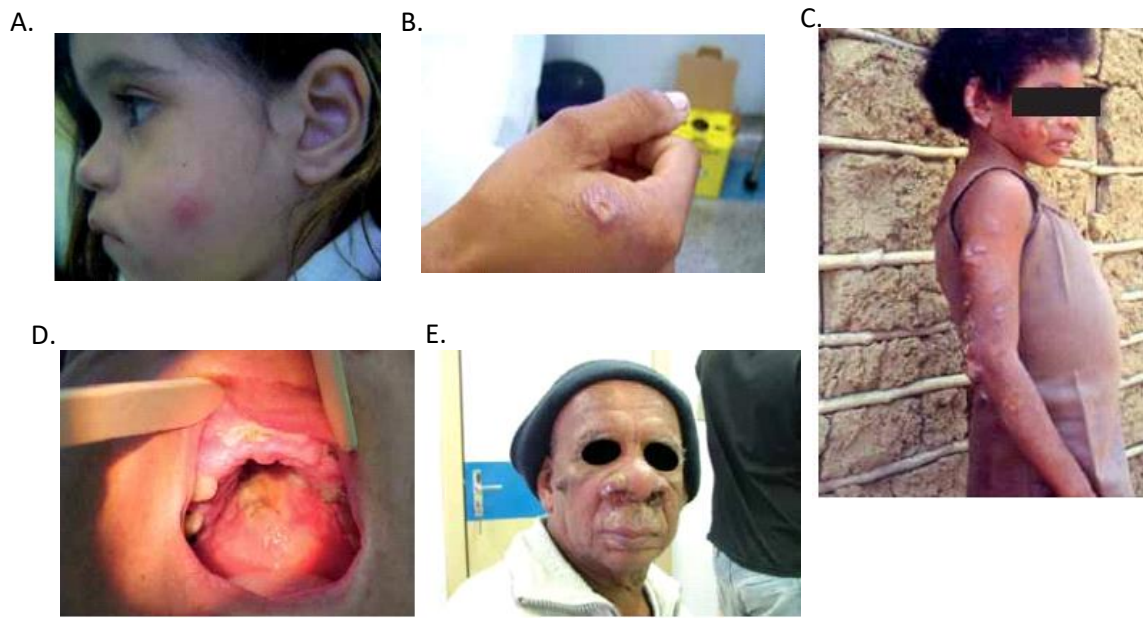
Nas Américas, a leishmaniose está presente em 18 países e ocorre como dois tipos clínicos principais: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), sendo a LT a forma clínica mais comum (BRASIL, 2021; SINGH et al., 2017; KAPIL, SINGH e SILAKARI, 2018).

As Leishmanioses são caracterizadas por uma diversidade de manifestações clínicas, ocasionada pela existência de mais de 20 espécies capazes de infectar humanos. Outro fator importante para as diversas manifestações clínicas desta doença são o grau de infectividade, patogenicidade e virulência de cada cepa, capacidade imunológica e constituição genética do hospedeiro vertebrado infectado (RABELO et al., 2017; ALMEIDA, 2018).

No Brasil, o principal agente causador da LV é a *Leishmania infantum* e da LT é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GUIMARÃES-E-SILVA et al, 2017). A LT é conhecida popularmente no Brasil, como úlcera de bauru ou ferida brava, os sintomas são localizados na superfície cutânea e/ou subcutânea, sendo classificadas

em cutâneas, mucocutâneas e cutâneas difusas a depender do aspecto e localização das lesões, **Figura 2** (CAVALCANTI, 2018, KUMAR, SAHA, SINGH, 2017).

Figura 2: Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (LT)



Fonte: Brasil, 2017-Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana

A forma cutânea, **Figura 2A e 2B**, é a mais comum da doença, e costuma causar o desenvolvimento de uma ferida, que se inicia como um pequeno nódulo no local da picada do vetor e evolui para uma ferida aberta indolor em algumas semanas ou meses e, posteriormente, pode cicatrizar, até mesmo, sem a necessidade de tratamento ou tornar-se crônica (BRASIL, 2017; ISAZA-JAIMES et al., 2018).

A forma cutânea difusa, **Figura 2C**, ocorre em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania* sp. Inicia-se com uma ferida (lesão única) que não responde de forma eficaz ao tratamento, posteriormente, evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões cutâneas (BRASIL, 2017; PASSALACQUA, 2018).

Por fim, a forma mucocutânea também chamada de mucosa tardia, **Figura 2D e 2E**, é a mais rara, surgindo após a lesão cutânea clássica, e se caracteriza por lesões destrutivas na mucosa das vias aéreas superiores, como nariz, orofaringe,

palatos, lábios, língua, laringe e, mais dificilmente, traqueia e parte superior dos pulmões (BRASIL, 2017; ISAZA-JAIMES et al., 2018).

A LV é popularmente conhecida no Brasil como Calazar, doença do cachorro, febre negra ou esplenomegalia tropical, entre outros. Afeta especialmente crianças e pessoas imunodeprimidas, podendo variar desde manifestações discretas, até mais graves, caracterizando-se por febre irregular, hepatomegalia e esplenomegalia, **Figura 3** (PANDEY et al., 2015).

Figura 3: Paciente com Leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia



Fonte: Brasil, 2017-Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar

O início da LV é insidioso, com perda de apetite, palidez, aparecimento de febre alta que é o sintoma mais notável pela sua constância, aumento de volume do baço e fígado, anemia e hemorragias da gengiva e digestiva. A alteração do apetite leva a desnutrição grave e a evolução da doença pode ser rápida, levando à morte em algumas semanas. Os pacientes podem apresentar uma forma crônica assintomática desta doença, com curso lento que pode durar anos, ou a forma aguda que é rápida e pode ser fatal (ZAHEERA et al., 2015; KUMAR, SAHA, SINGH, 2017).

2.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças com elevada incidência e ampla distribuição geográfica nas Américas e, por isso, requerem um grande esforço técnico, operativo e político para manter o desenvolvimento sistemático de ações de vigilância, prevenção e controle destas doenças (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2018).

Desde 2017, a classificação epidemiológica dos municípios com transmissão de LT no Brasil é realizada de acordo com a metodologia proposta pela Organização

Pan-Americana de Saúde (OPAS), que desenvolveu o índice composto de leishmaniose tegumentar (ICLT) para classificar as áreas de transmissão em cinco estratos (muito intenso, intenso, alto, médio e baixo). Esse indicador tem como base o número absoluto de casos novos e o coeficiente de detecção da doença nos últimos três anos (BRASIL, 2021).

Segundo boletim epidemiológico emitido pela Secretária de Vigilância em Saúde (2021), em 2019 foram confirmados 2.529 casos novos de LV no Brasil, com uma taxa de incidência de 1,2 casos a cada 100 mil habitantes. A presença da doença foi confirmada em 24 Unidades Federativas, distribuídas nas cinco regiões brasileiras, sendo a região Nordeste responsável pelo maior registro de casos do país (49,1%), **Tabela 1 e Figura 4**. A taxa de letalidade por LV em 2019 foi de 9%, sendo a mais elevada dos últimos 10 anos. Nesse período, apesar da maior taxa de letalidade da LV ter sido registrada em adultos acima de 50 anos de idade (19,2%), destaca-se o elevado percentual nos menores de um ano (10,3%) (BRASIL, 2021).

Tabela 1: Distribuição de número de casos de leishmaniose visceral, segundo UF de infecção, Brasil, 2016 a 2019.

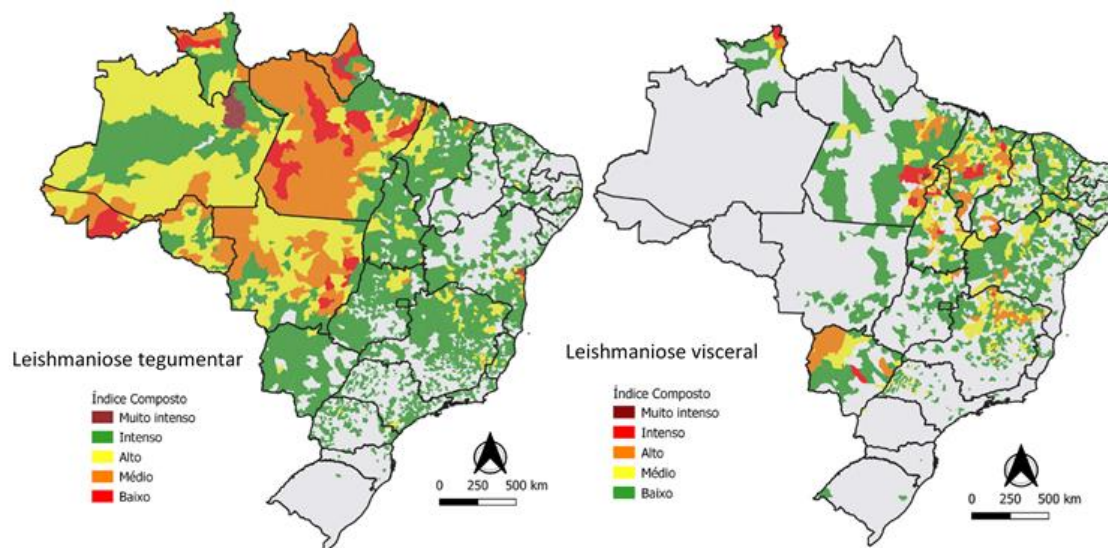
País/Região	2016				2017				2018				2019			
	Nº	%	Incid.	Incid.	Nº	%	Incid.	Incid.	Nº	%	Incid.	Incid.	Nº	%	Incid.	Incid.
			Pop.	Pop.			Pop.	Pop.			Pop.	Pop.			Pop.	Pop.
			Risco ¹	Geral ²			Risco ¹	Geral ²			Risco ¹	Geral ²			Risco ¹	Geral ²
Brasil	3128	100,00	4,80	1,52	4103	100,00	5,54	1,98	3466	100,00	5,05	1,66	2529	100,00	3,08	1,20
Norte	569	18,19	8,25	3,21	765	18,64	11,98	4,27	737	21,26	11,46	4,05	480	18,98	6,43	2,60
Nordeste	1490	47,63	5,02	2,62	1824	44,46	5,37	3,19	1735	50,06	5,21	3,06	1241	49,07	3,74	2,17
sudeste	587	18,77	3,10	0,68	908	22,13	3,41	1,04	428	12,35	2,13	0,49	323	12,77	1,06	0,37
Sul	9	0,29	0,48	0,03	15	0,37	0,57	0,05	11	0,32	0,62	0,04	13	0,51	0,64	0,04
Centro-Oeste	154	4,92	1,99	0,98	182	4,44	4,04	1,15	122	3,52	1,72	0,76	129	5,10	1,44	0,79

Fonte: Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação),

Legenda: ¹Incidência por 100 mil habitantes considerando a população das áreas de transmissão de LV nas UF.

²Incidência por 100 mil habitantes considerando a população total das UFs com transmissão de LV.

Figura 4: Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar e visceral por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019.



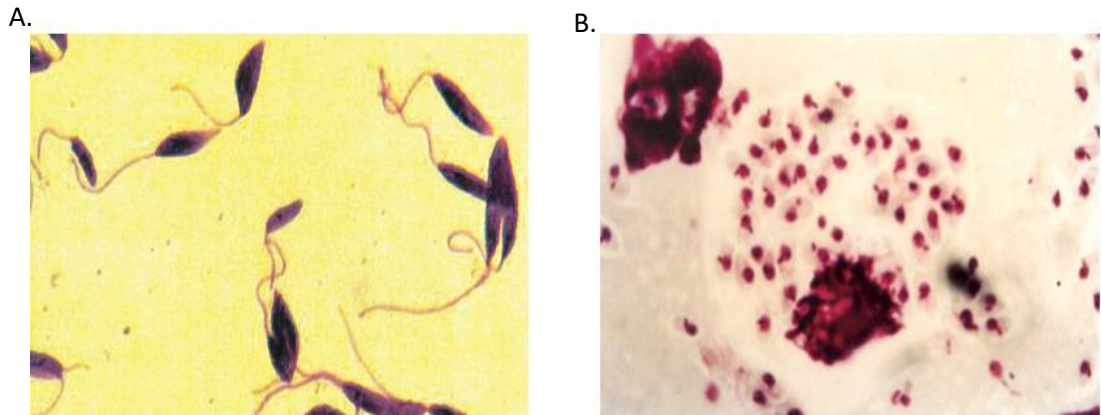
Fonte: Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

Ainda em 2019, segundo a Secretária de vigilância em saúde (2021) foram confirmados 15.484 casos novos de LT no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes. Conforme a série histórica apresentada na **Figura 4**, a doença se distribui em todo o território brasileiro, com os maiores percentuais de casos registrados na região Norte (42,8%), acometendo principalmente os adultos jovens, na faixa etária de 20 a 49 anos (54,9%), do sexo masculino (75,2%). Do total de pacientes notificados em 2019, 67,1% evoluíram para cura clínica, enquanto 1,9% abandonaram o tratamento e foram registrados, ainda, 19 óbitos por LT.

2.3 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida da *Leishmania sp.* é digenético, acontecendo uma parte em hospedeiro invertebrado e outra em hospedeiro vertebrado. Os agentes etiológicos do gênero *Leishmania sp.* são parasitas intracelulares obrigatório das células do sistema fagocitário mononuclear, com uma forma promastigota, **Figura 5-A**, alongada e flagelar, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e meios de cultura para crescimento como o Schneider (Sigma), enquanto a forma amastigota, **Figura 5-B**, arredondada e sem flagelo visível, alojam-se nos fagossomos dos monócitos/macrófagos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2014; KUMAR, SAHA e SINGH, 2017, ALMEIDA, 2018).

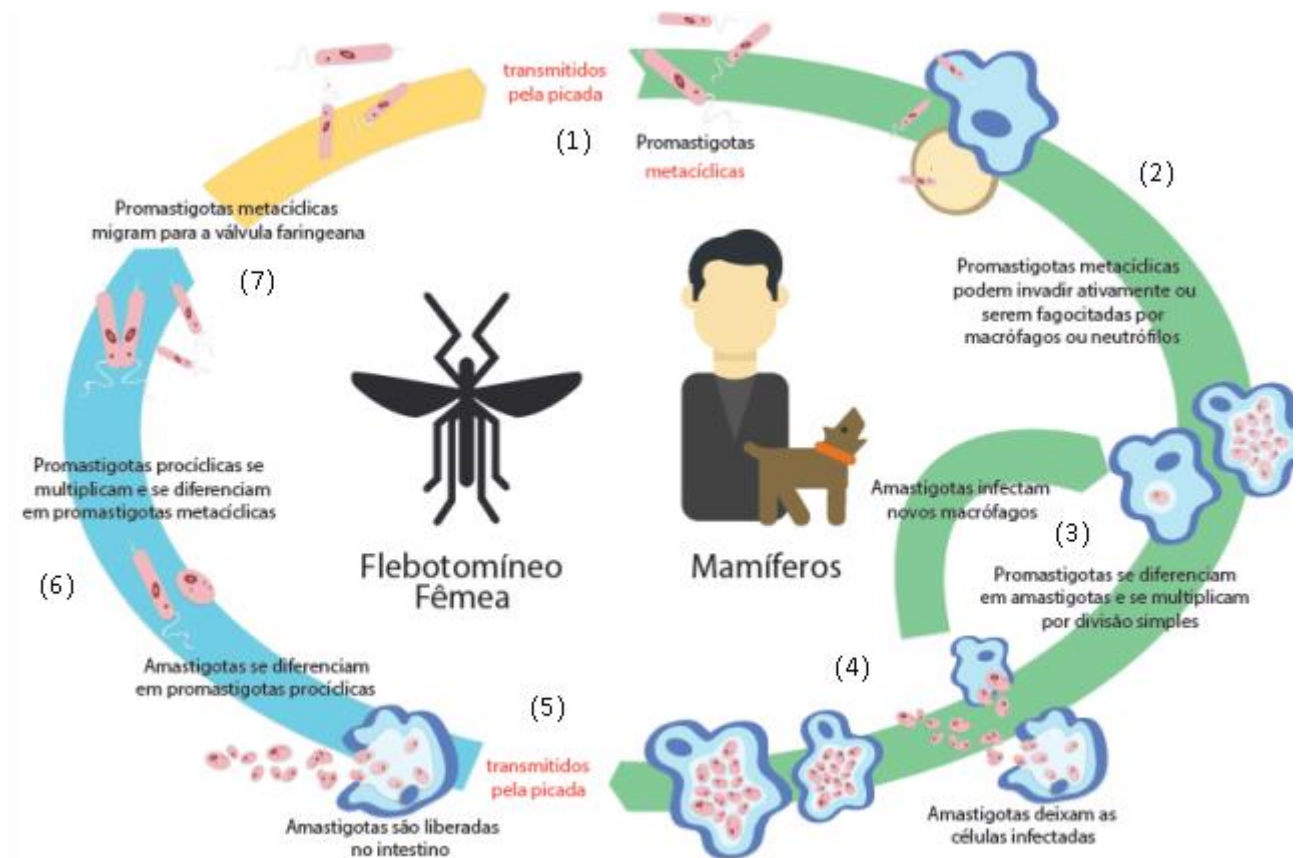
Figura 5: Micrografias representativas da *Leishmania* sp.
A. Formas promastigotas; B. Formas amastigotas



Fonte: BRASIL, 2014

O ciclo biológico do parasito, **Figura 6**, se inicia com a picada do vetor hematófago da subfamília *Phlebotominae* no hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) inoculando formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro mamífero (1). Após a infecção, as formas promastigotas metacíclicas podem invadir ativamente ou serem fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (em especial, macrófagos) (2). As formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, as quais se multiplicam no fagolisossomo (3). Em condições apropriadas, as amastigotas irão se proliferar até ocasionarem subsequente lise da célula hospedeira e posteriormente infectam novas células (4). O flebotomíneo fêmea ao exercer seu repasto sanguíneo, ingere as formas amastigotas que são liberadas no interior do seu intestino e se transformam em promastigotas procíclicas (5). As promastigotas procíclicas se multiplicam e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (6) que migram para a válvula faríngea (7) e em uma nova hematofagia infetam novos hospedeiros mamíferos reiniciando o ciclo (1) (BRASIL, 2014; FRÉZARD, 2015; KELLY et al., 2017).

Figura 6: Ciclo biológico da *Leishmania* sp.



Fonte: Frézard, 2015

2.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA *Leishmania* sp.

2.4.1 Imunidade inata

A resposta imune contra parasitas *Leishmania* é bastante complexa e o desenvolvimento de uma resposta imune protetora a patógenos intracelulares requer ação coordenada entre imunidade inata e adaptativa. Após a infecção, uma resposta inflamatória aguda envolvendo elementos humorais e celulares atua para ajudar a controlar ou promover a infecção. As células apresentadoras de antígenos (APC) ou células dendríticas (CDs) desempenham um papel importante ligando as respostas imunes inatas e adaptativas, e migram do local de inoculação até os linfonodos de drenagem para apresentar antígenos e estimular a diferenciação de subconjuntos de linfócitos. Dependendo da produção de citocinas, essas células podem mediar a proteção e cura ou conferir suscetibilidade e patogênese (FLORES et al., 2020).

As células imunes inatas, incluindo neutrófilos, células *natural killer* (NK), macrófagos e células dendríticas (CDs) são chamadas para o local da infecção e podem ser infectadas induzindo as respostas imunológicas contra a infecção por *Leishmania*. Durante a leishmaniose os neutrófilos se infiltram rapidamente no local da infecção e contribuem com a proteção do hospedeiro ou a progressão da doença, dependendo da espécie do parasita. Por exemplo, as promastigotas de *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) são mortas por armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs do inglês do inglês “*neutrophil extracellular traps*”), enquanto as promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela interação da atividade de macrófagos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), no entanto o parasita desenvolveu vários mecanismos para evitar o aprisionamento e a morte mediados por NETs, como por exemplo, reduzir as espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico sintase 2 (NOS2), inibindo assim o estresse oxidativo e consequentemente as armadilhas extracelulares de neutrófilos e morte do parasita (JAFARZADEH et al, 2019; MIRZAEI et al, 2021).

Como parasita intracelular, a *Leishmania sp.* invade principalmente macrófagos que são células efetoras decisivas que matam ou hospedam os parasitas intracelulares dependendo do equilíbrio de duas enzimas induzíveis, NOS2 e arginase (Arg). Essas duas enzimas usam um substrato comum, a L- arginina, e são reguladas competitivamente por citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2. As citocinas Th1 induzem a ativação clássica de macrófagos e NOS2 que oxida a L- arginina em um processo de duas etapas em óxido nítrico (NO), um metabólito responsável pela morte do parasita. As citocinas Th2 resultam na ativação alternativa de macrófagos e na indução de arginase, que hidrolisa a L- arginina em ornitina, um aminoácido que é a principal fonte intracelular para a síntese de poliaminas, metabólitos essenciais em protozoários tripanossomatídeos como a *Leishmania* (ROSTAMI e KHAMESIPOUR, 2021)

Na leishmaniose humana, níveis mais elevados de Arg, TGF- β , ornitina descarboxilase (ODC) e prostaglandina E2 no plasma e maior expressão de Arg e ODC em biópsias de lesão foram mostrados em pacientes infectados por *L. amazonensis* com leishmaniose cutânea difusa (LCD) em comparação com pacientes com leishmaniose cutânea localizado (LCL), indicando um papel para Arg/poliaminas no desenvolvimento de LCD (FRANÇA-COSTA et al., 2015).

Embora a imunidade inata do hospedeiro desempenhe um papel na resistência contra a leishmaniose, está claro que a imunidade mediada por células T e as citocinas secretadas por diferentes células do sistema imunológico desempenham um papel mais vital na promoção do resultado da doença (MIRZAEI et al., 2021).

2.4.2 Imunidade adaptativa: resposta Th1, Th2, Th17 E Treg

A resposta imune adaptativa mediada por células T auxiliares é heterogênea e se baseia no desenvolvimento de diferentes subtipos celulares caracterizados por diferentes perfis de produção de citocinas (FLORES et al., 2020). Células T CD4 + virgens podem migrar para a pele, onde são diferenciadas em vários tipos de células T efectoras (como células Th1, Th2, Th17 e Treg) que produzem padrões particulares de citocinas. As citocinas relacionadas às células Th1 e Th17 contribuem para a eliminação do parasita, enquanto as citocinas relacionadas às células Th2 e Treg exercem atividade de pró-leishmania (JAFARZADEH et al., 2020).

As células Th1 se associam à resistência do hospedeiro contra a leishmaniose por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo IL-2, *Interferon-γ* (IFN-γ) e TNF-α. A IL-12 e IFN-γ orientam a diferenciação das células T CD4 + virgens para células Th1, estas por sua vez ao gerar o IFN-γ e o TNF-α ativam macrófagos para produzir substâncias leishmanicida como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (GABRIEL et al., 2019; JAFARZADEH et al., 2020).

Os macrófagos estão normalmente em repouso como macrófagos ingênuos (M0), mas o microambiente no qual essas células são encontradas fornece diferentes sinais que as ativam e levam ao desenvolvimento de fenótipo de macrófago funcionalmente distinto, em direção a "classicamente ativado" (M1) ou "alternativamente ativado" (M2) com diferentes desfechos de doença. Portanto, a ativação de macrófagos M1 pela subpopulação de linfócitos Th1, através das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-2, é crucial para a eliminação deste patógeno intracelular por meio do desencadeamento de uma explosão oxidativa, na qual as células hospedeiras aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (ERNS), incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, e óxido nítrico (NO), que apresentam alta capacidade microbicida (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; GABRIEL et al., 2019; MIRZAEI et al., 2020).

Em contraste, a ativação de linfócitos Th2, que produzem citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, induz o perfil M2 caracterizado pela biossíntese de poliamina via ativação da enzima arginase (Arg) e produção de ureia e L -ornitina, que são benéficas para crescimento intramacrófago da *Leishmania* sp., favorecendo a sobrevivência do parasita nos macrófagos infectados e a progressão da doença. A IL-10 e IL-4 são importantes citocinas reguladoras que inibem a fagocitose e afetam a capacidade dos macrófagos de matar parasitas intracelulares, contribuindo para o crescimento e disseminação da *Leishmania*. Essas citocinas desempenham um papel central na promoção de um tipo alternativo de ativação de macrófagos (M2), que aumenta a expressão de arginase e facilita a expansão do parasita (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018)

A expansão da resposta Th2 está associada com a progressão e cronicidade da lesão cutânea que é frequentemente refratária ao tratamento leishmanicida clássico, levando a mutilações graves. Estas citocinas aumentadas, em especial a IL-10, restringem a resposta do tipo Th1 levando a um ambiente imunológico permissivo à replicação do parasita (GABRIEL et al., 2019; MIRZAEI et al., 2020).

Além das células efectoras Th1 e Th2, outro subtipo de células T *help*, denominado Th17, tem sido descrito, produzindo principalmente IL-17A, que é altamente inflamatória e medeia a lise de vários patógenos extracelulares. Essa citocina também pode ser produzida por outros tipos de células, como linfócitos T CD8, células T $\gamma\delta$, células NK e neutrófilos. A ativação de células T virgens na presença de citocinas específicas, como TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23, além do fator de transcrição ROR- γ t, medeia o desenvolvimento e manutenção de células Th17. Em infecções por protozoários, fungos e bactérias, a IL-17A foi extensivamente estudada em modelo murinos, constatando seu efeito microbicida. No entanto, seu papel nas infecções parasitárias humanas, especialmente na leishmaniose, ainda não está totalmente esclarecido. (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; FLORES et al., 2020)

Estudos têm mostrado que uma sinergia entre IL-6 e TGF- β é necessária para uma ótima produção de IL-17A e para diferenciação completa e manutenção de células Th17, cuja principal função é eliminar microrganismos sendo atuante na ativação e recrutamento de neutrófilos para mediar as respostas inflamatórias (FLORES et al., 2020). Um exemplo deste efeito microbicida da IL-17A é o estudo realizado por Tristão et al. (2017) que avaliou a resposta imune Th17 e o papel das citocinas associadas a ela (IL-6, IL-23 e IL-17A) durante uma infecção de

paracoccidioidomicose (PCM) experimental causada por *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) [cepa de levedura virulenta 18 de *P. brasiliensis* (Pb18)] em camundongos C57BL/6], na qual observou aumento da produção de IL-17A *in vitro* e todas as citocinas associadas a Th17 avaliadas no tecido pulmonar dos camundongos estudados. Além disso, a deficiência de IL-6, IL-23 ou receptor A de IL-17 (IL-17RA) prejudicou a formação de granuloma compacto e conferiu suscetibilidade durante a infecção, associada com redução do fator de TNF- α , IFN- γ e expressão da enzima iNOS. Os estudos dos autores sugerem que a produção de IL-6 por macrófagos derivados da medula óssea é importante para promover a diferenciação de Th17 durante a infecção por *P. brasiliensis* (Pb18).

Por fim, os linfócitos T reguladores (Treg) representam uma subpopulação de linfócitos T que são essenciais para o controle da resposta imune excessiva contra microrganismos ou autoantígenos. Essas células atuam em conjunto com as células T efectoras na modulação da resposta imune celular, tendo seu papel mediado pela secreção de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β , que afetam diretamente a atividade das células T efectoras e células apresentadoras de antígenos. A produção dessas citocinas no local da infecção pode comprometer a proliferação adequada de células T efectoras e a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo a eliminação total do parasita, entretanto os mecanismos exatos do efeito microbicida destas células no tratamento da leishmaniose e possível modulação farmacológica pelos medicamentos disponíveis no mercado ainda carecem de mais estudos (FLORES et al., 2018).

2.5 TRATAMENTO FÁRMACOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES

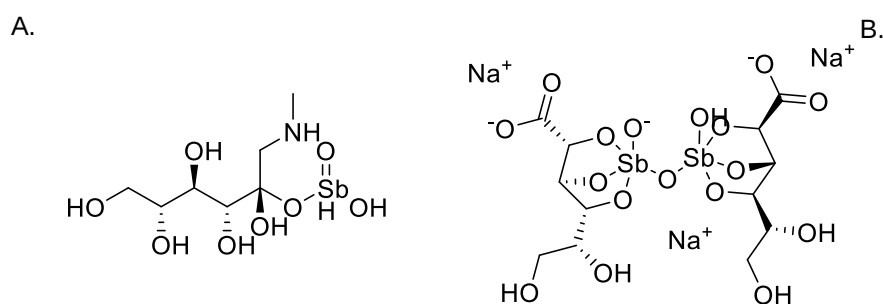
O tratamento para leishmanioses no Brasil é gratuito e está disponível na rede de serviços do Sistema Único de Saúde, baseando-se na utilização do antimoniato N-metil glucamina (Glucantime®) como medicamento de primeira escolha, e a anfotericina B e derivados como drogas de segunda escolha (MARTINS e LIMA, 2013; BRASIL, 2014; RODRIGUES et al., 2015; ZAHEERA et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

2.5.1 Fármacos antimoniais

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Na leishmaniose visceral a droga só foi utilizada dois anos após, na Itália. Os derivados pentavalentes (Sb^{+5}), só foram introduzidos na década de 40 e, desde então, os mesmos têm sido considerados como medicamento de primeira escolha no tratamento dessa protozoose (BRASIL, 2014).

Atualmente, existem duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis no mercado internacional: o antimoniato de meglumina também chamado de antimoniato-N-metil glucamina e o estibogluconato de sódio, **Figura 7**. Apesar de não haver diferenças quanto à eficácia terapêutica destas formulações, no Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato de meglumina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5mL, contendo 405 mg de Sb^{+5} (1 mL = 81mg de Sb^{+5}). O antimonial pentavalente pode ser utilizado para o tratamento de todas as formas clínicas das Leishmanioses (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Figura 7: Fármacos de primeira linha para tratamento das leishmanioses.
A. Antimoniato de meglumina e B. Estibogluconato de sódio



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

O Mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (BRASIL, 2014).

Dois modelos foram propostos como possíveis mecanismos de ação dos Sb^{+5} . O primeiro modelo é o pró-fármaco, que sugere que os Sb^{+5} , dentro das células hospedeiras, atravessem a membrana fagolisossomal e são convertidos em antimônio

trivalente (Sb^{+3}). Em seguida, o Sb^{+3} atua contra amastigotas ao comprometer o potencial redox, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e, conseqüentemente, inibindo a *tripanotiona redutase* (TR). A redução de Sb^{+5} pode ser não enzimática, devido a condição ácida no interior dos macrófagos. Por outro lado, o modelo ativo Sb^{+5} sugere que este fármaco possui atividade leishmanicida intrínseca, e podem atuar inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos na forma amastigota. O Sb^{+5} , segundo este modelo, também podem eliminar os parasitas por mecanismos indiretos, como o aumento dos níveis de citocinas, e também atuam no DNA, induzindo danos ao mesmo *in vivo* (Sb^{+3} em baixas concentrações induzem a fragmentação do DNA, sugerindo a aparição de eventos tardios de morte celular programada), além de inibir DNA Topoisomerase I (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; ALMEIDA, 2018, KAPIL, SINGH e SILAKARI, 2018).

Neste sentido, Santana et al. (2017) afirma que os antimoniais pentavalentes são a primeira escolha para o tratamento das lesões cutâneas e viscerais da *Leishmania* por induzirem o aumento de várias citocinas pró-inflamatórias no plasma dos pacientes tratados, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , contribuindo para uma resposta imunológica mais eficaz. No entanto, a alta probabilidade de resistência aos medicamentos tem sido um fator limitante para o uso do antimônio pentavalente. Além disso, vários efeitos colaterais são relatados como dor no músculo esquelético, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, anorexia, astenia, fadiga, febre, erupção cutânea, eritema e urticária.

Os estudos sobre farmacocinética dos Sb^{+5} mostram que esses compostos são rapidamente eliminados da circulação através dos rins (meia vida de ± 2 horas), exigindo cautela em pacientes com disfunção renal. Além disso, por serem medicamentos potencialmente arritmogênicos, os antimoniais pentavalentes estão contraindicados em pacientes que fazem uso de betabloqueadores e drogas antiarrítmicas. Os antimoniais também estão contraindicados em pacientes com insuficiência renal ou hepática, em mulheres grávidas nos dois primeiros trimestres da gestação e nos casos que apresentam alterações no eletrocardiograma (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Os Sb^{+5} são administrados por via parenteral, sendo tóxicos para o parasito e, também, para o homem. Estas substâncias induzem uma variedade de efeitos adversos, alguns deles bem graves, tais como: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaleia, tontura,

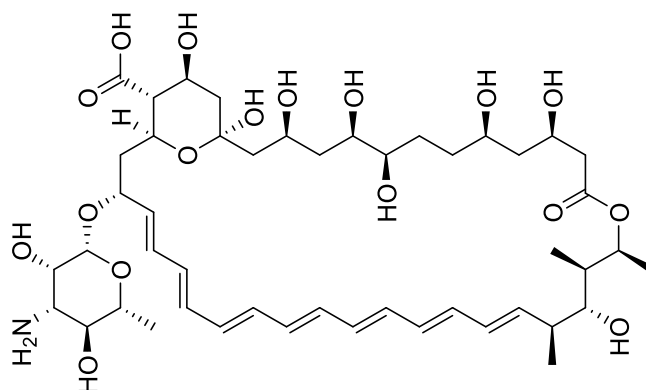
palpitações, insônia, nervosismo, insuficiência renal, arritmias, anemia, tosse, supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e pancreatite química (ZAHEERA et al., 2015).

Em alguns casos, os antimoniais são substituídos pelos fármacos alternativos de segunda escolha, como a anfotericina B e seus derivados, principalmente devido a crescente resistência dos parasitas aos antimoniais ou alguma condição associada a doença (CHTITA et al., 2016; KHATTAB et al., 2018).

3.5.2 Anfotericina B

A anfotericina B, **Figura 8**, é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente na forma de desoxicolato sódico, todavia também é altamente tóxica, exigindo administração intravenosa cuidadosa e lenta, sendo considerada droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses. Este Fármaco tem ações nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo disponibilizado no Brasil pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LV e da LT na forma química de desoxicolato de anfotericina B e nas formulações lipídicas de anfotericina B, como a lipossomal (BRASIL, 2014, BRASIL, 2017; CASA et al., 2018).

Figura 8: Estrutura química da Anfotericina B



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da *Leishmania*. Os complexos de anfotericina B com esteróis 24-substituídos da membrana biológica,

como o ergosterol abrem poros que alteram o equilíbrio dos íons e levam à morte celular (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; BRASIL, 2014).

Os efeitos colaterais da anfotericina B são inúmeros e frequentes, todos, dose-dependentes, sendo altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite. Durante a infusão poderá ocorrer cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. A infusão rápida (menos de 1 hora) é responsável pela instalação de hiperpotassemia, determinando alterações cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca. Outros efeitos adversos importantes são anorexia, comprometimento da função renal, hipopotassemia, hipomagnesemia, anemia e leucopenia (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; KHATTAB et al., 2018; CASA et al., 2018).

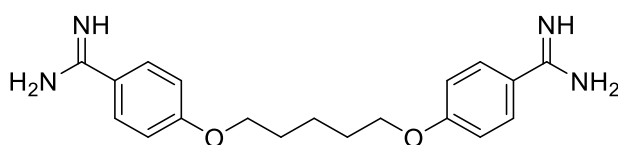
Formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas a fim de melhorar suas propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade, reduzindo consideravelmente os efeitos colaterais. As formas lipossomais tem a vantagem de conferir a anfotericina B uma maior biodisponibilidade, já que os lipossomas de maior tamanho são rapidamente assimilados pelo sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos hepáticos, tendo ação leishmanicida principalmente nas formas amastigotas do parasita, por outro lado os lipossomas menores tem a capacidade de permanecerem na corrente sanguínea durante mais tempo devido o seu perfil anfifílico, conferindo importante atividade contra as formas promastigotas do parasita. A formulação lipossomal é de alto custo por conferir toxicidade reduzida, uma melhor meia-vida e um alto nível de eficácia, com 90% de taxa de cura, devendo, apesar de ter seu uso aprovado para as duas formas da doença, ter aplicação principalmente na forma visceral devido a sua gravidade e risco de morte mais frequente (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; CASA et al., 2018).

As principais limitações são falta de estabilidade a altas temperaturas, devendo ser transportadas e armazenadas à frio, e custo elevado, impossibilitando o seu uso na rotina dos serviços de saúde. Está sendo indicada aos pacientes graves de leishmaniose visceral, que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do Antimoniato de N-metil glucamina e de outras drogas de escolha não obtendo melhora ou cura clínica (BRASIL, 2014)

2.5.3 Outras drogas e tratamentos leishmanicidas

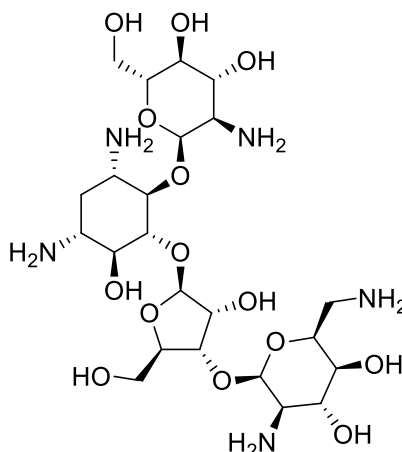
Outras alternativas farmacológicas para o tratamento das leishmanioses incluem as pentamidinas (isotonato e mesilato), **Figura 9**, principalmente, nos continentes Europeu e Africano. Sua eficácia é inferior à dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e seus efeitos adversos são maiores e mais frequentes. Entre os efeitos colaterais mais comuns são encontrados anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal em 25% dos pacientes, geralmente reversível e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes *mellitus*, em 10 a 15% dos casos (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Figura 9: Estrutura química da Pentamidina



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Paromomicina, **Figura 10**, é um antibiótico aminoglicosídeo isolado de *Streptomyces krestomuceticus*, usado para tratar infecções intestinais. Este fármaco liga-se à subunidade 30S do ribossomo que leva à inibição da síntese proteica, além de interromper o potencial de membrana mitocondrial levando-a a morte por apoptose (KAPIL, SINGH e SILAKARI, 2018).

Figura 10: Estrutura química da Paramomicina

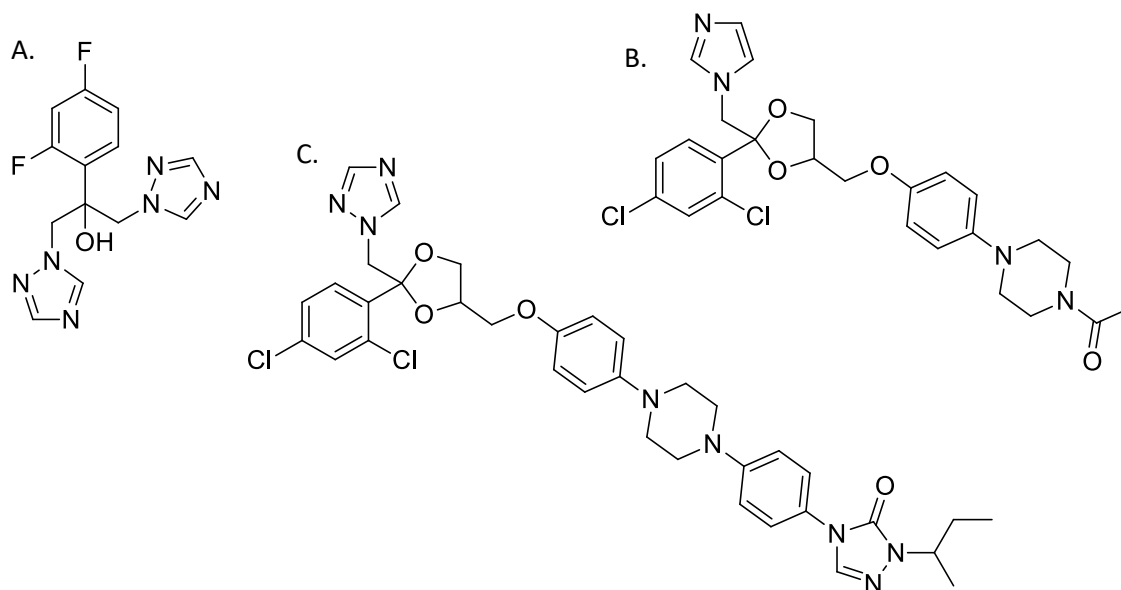
Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Pentamidina e paromomicina são drogas potenciais para o tratamento da leishmaniose, mas seu uso é limitado em regiões endêmicas devido à sua toxicidade e biodisponibilidade, respectivamente (CASA et al., 2018).

Outra observação quanto ao tratamento das leishmanioses é a utilização de medicamentos baseando-se no seu reposicionamento, como por exemplo a classe dos antifúngicos azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol), **Figura 11**, que podem ter utilidade clínica devido ao seu mecanismo de ação que é a inibição do ergosterol. A reutilização de azóis para o tratamento da leishmaniose ampara-se principalmente no fato de que as células de *Leishmania sp.* também têm ergosterol como o principal componente de esterol de membrana (observe que as células de mamíferos, em contraste, têm colesterol como o esterol de membrana principal). Isso significa que, para os azólicos, o reaproveitamento não é devido a uma ação multialvo, mas sim pela existência coincidente do mesmo alvo, a lanosterol 14- α -desmetilase. É importante ressaltar que o esterol 14- α -desmetilases (CYP51) tem um sítio ativo muito rígido, ao contrário de muitas outras enzimas da família do citocromo P450, o que pode ajudar a explicar a transversalidade da atividade inibidora do crescimento dos azóis em várias espécies de microrganismos (BRAGA, 2019).

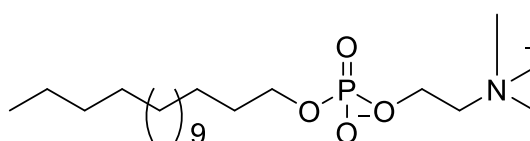
Figura 11: Estrutura química dos antifúngicos azóis.

A. Fluconazol B. Cetoconazol C. Itraconazol



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Nos últimos anos, uma droga oral chamada de miltefosina, **Figura 12**, vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano, demonstrando eficácia de 95% contra a leishmaniose visceral. O miltefosine é um derivado alquil-lisofosfolípídico, com atividade antiproliferativa, que foi inicialmente testado por suas propriedades antitumorais. Recentemente, começou a ser utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral, constituindo-se no primeiro medicamento bem-sucedido por via oral. Seu mecanismo de ação está relacionado a alteração da composição da membrana, com redução do conteúdo de fosfatidilcolina e ergosterol, também mostrou agir no nível da célula hospedeira, estimulando produção de óxido nítrico sintetase 2 indutível (iNOS₂) que catalisa a geração NO para matar o parasita dentro do macrófago, entretanto, não apresenta eficácia nas espécies mais frequentes no Brasil (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; KHATTAB et al., 2018).

Figura 12: Estrutura química da Miltefosina

Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

As reações adversas mais frequentes, relacionadas ao uso de miltefosina são distúrbios gastrointestinais transitórios como vômitos e diarreia. A maior limitação ao seu uso até o momento está relacionada aos efeitos teratogênicos (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; KAPIL, SINGH e SILAKARI, 2018).

Baseando-se na ação antitumoral inicialmente descrita para a miltefosina e posteriormente na comprovação de seus efeitos leishmanicidas, surge a possibilidade de investigar outros compostos que também apresentam atividade antiproliferativa para o tratamento desta doença, buscando novas opções terapêuticas mais eficazes, menos tóxicas e que gerem menor resistência dos parasitas.

2.6 RESISTENCIA AO TRATAMENTO ATUAL E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

A resistência dos antimoniais é atualmente um dos maiores obstáculos na quimioterapia das leishmanioses que vem sendo descrito desde que os antimoniais começaram a ser usados na clínica, constituindo uma das principais causas de falha terapêutica. Ao longo das décadas, a resistência destes fármacos tornou-se um problema emergente mundial, abrangendo a leishmaniose visceral e cutânea, sendo relatada não apenas na Índia e na África do Sul, como primeiros casos, mas recentemente no continente africano. Esses relatórios, combinados com o uso extensivo de antimoniais como tratamento de primeira linha em vários países, ainda sugerem uma progressão da resistência levando um alerta ao mundo (GERVAZONI, GONCALVES-OZÓRIO e ALMEIDA-AMARAL, 2018)

Assim, diferentes mecanismos têm sido sugeridos para resistência a fármacos, como amplificação gênica, redução do acúmulo do fármaco ativo devido à diminuição do influxo ou aumento do fluxo de efluente, desintoxicação de compostos tóxicos e sequestro de moléculas ativas em vesículas intracelulares do parasita, além de mecanismos de resistência pela regulação do sistema imunológico do hospedeiro (MOREIRA et al., 2015; PANDEY et al., 2015; GERVASONI, GONCALVES-OZÓRIO e ALMEIDA-AMARAL, 2018).

Patino, Muskus e Ramírez (2019) por exemplo, utilizaram a tecnologia de sequenciamento de última geração (RNA-seq) para analisar perfis de transcriptoma e identificar mudanças globais na expressão gênica entre promastigotas de *L. amazonensis* de cepas modificadas para serem resistentes (La-Sb III -R) e sensíveis (La-Sb III -S) ao antimônio. A análise transcriptômica comparativa revelou que os

genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo (ácidos graxos) e na resposta ao estresse, bem como aqueles associados à resistência ao antimônio em outras espécies de *Leishmania* foram regulados positivamente na linha resistente ao antimônio, sugerindo que, na presença de estibogluconato trivalente (Sb III), *L. amazonensis* pode ativar esses genes como estratégia de sobrevivência ou para induzir a morte celular.

Quase todas as drogas atualmente usadas para tratar as leishmanioses são sujeitas a resistência e a causar inúmeros efeitos colaterais (KHATTAB et al., 2018). Na Índia, até 65% dos pacientes previamente não tratados não responderam após terapia com antimônio devido ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Há também um aumento na resistência recentemente introduzida como a miltefosina, onde 7 a 10% dos pacientes recaem aos 6 meses e até 20% aos 12 meses nos ensaios clínicos realizados em região endêmica (PANDEY et al., 2015).

Segundo Hefnawy et al., (2017) em estudos com os isolados clínicos de *Leishmania donovani* observou-se alta aptidão e tolerância contra droga miltefosina que também suporta características de resistência.

Em relação a anfoterina B, acredita-se que a depleção de ergosterol e de outros esteróis do tipo ergostano com forte afinidade para se ligar a anfotericina B estejam associados ao desenvolvimento de resistência a esse medicamento droga (BRAGA, 2019).

Em estudo realizado por Mwenechanya et al. (2017) no qual os autores utilizaram a cepa MNYC / BZ / 62 / M379 de *L. mexicana*, foi demonstrado que o mecanismo de resistência desta cepa a anfotericina B é devido a uma mutação na enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) que reprograma a enzima para produzir colesterol e esteróis do tipo colestano em vez de ergosterol, assim, uma vez que estes se ligam menos fortemente a anfotericina B a eficácia da droga é prejudicada.

É importante ressaltar que a ampla utilização da monoterapia, contribuiu para ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados. Dessa forma, as combinações mostraram-se boas alternativas e têm apresentado diversas vantagens em relação à monoterapia, incluindo a minimização dos efeitos tóxicos através da redução do tempo de tratamento; maior adesão ao tratamento; redução dos custos diretos e indiretos para o sistema de saúde e a atenuação do desenvolvimento de resistência por parte do parasito. Dentre estas combinações terapêuticas estão: estibogluconato de sódio e paromomicina; antimoniato de meglumina e paromomicina;

anfotericina B e miltefosina; anfotericina B e paromomicina e, por fim, miltefosina e paromomicina (BASTOS et al., 2016; SANTIAGO; PITA e GUIMARÃES, 2021).

Em 2019 a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) finalizou um ensaio de fase II e iniciou um de fase III, combinando termoterapia e miltefosina para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC) não complicada. Nesse estudo foi avaliada a eficácia e a segurança da combinação de termoterapia (uma sessão) + miltefosina (dose padrão de 2,5 mg/kg/dia por 21 dias, via oral), em comparação à apenas uma sessão de termoterapia no tratamento da LC não complicada no Peru e na Colômbia. Esse estudo contou com 130 participantes e os resultados preliminares mostraram evidências a favor da combinação. O estudo de fase III, ainda em andamento, tem como objetivo determinar se a combinação de tratamentos não é inferior ao tratamento padrão de primeira linha (antimoniato de meglumina de 20 mg/kg/dia por 20 dias, uso parenteral) e a monoterapia com miltefosina (dose padrão de 2,5 mg/kg/dia por 28 dias, por via oral) (BONI, 2019; SANTIAGO; PITA e GUIMARÃES, 2021).

Ainda em 2019, a DNDi desenvolveu um portfólio, totalizando 21 projetos com dez novas classes químicas: quatro séries líderes (*série DNDI 5421/5610, Aminopirazol, série CGH LV e série Leish), quatro candidatos pré-clínicos (DDD 853661, GSK 3494245, DDD 1305143 e CpG-D35) e dois candidatos clínicos (DNDI-6148 e DNDI-0690) com diferentes mecanismos de ação contra os parasitos do gênero *Leishmania*. Esta cadeia de desenvolvimento oferece uma base sólida para que se avance com uma ou mais novas terapias orais seguras e acessíveis para a leishmaniose visceral e cutânea (DNDi, 2019; SANTIAGO; PITA e GUIMARÃES, 2021).

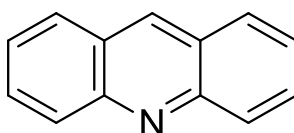
Com relação aos tratamentos atuais, podemos considerar que são insatisfatórios devido aos grandes efeitos colaterais, alto custo, baixa eficácia e aparecimento de resistência pelos parasitas. Além disso, ainda não há vacina humana aprovada, que apesar dos grandes esforços em desenvolver uma vacina contra esta patologia, ainda não há resultados concretos, acarretando uma dependência aos limitados fármacos disponíveis no mercado (KHATTAB et al., 2018; BEZERRA et al., 2019). Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina bem-sucedida para a leishmaniose humana tem sido elusivo; portanto, medidas adicionais para reduzir a transmissão mediada por flebotomíneos em áreas endêmicas são extremamente necessárias, entre estas medidas estão a vacinação dos hospedeiros animais, principalmente, os cães (SCOTTI et al., 2015; ABID et al., 2017; KELLY et al., 2017).

Neste contexto, é necessário buscar novos compostos com atividade leishmanicida, na esperança da descoberta de um composto mais eficaz contra o parasita, com menos efeitos tóxicos para o homem e melhor perfil farmacocinético (ABID et al., 2017, CAVALCANTI, 2018).

2.7 ACRIDINA E SEUS DERIVADOS COM POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA

A acridina, **Figura 13**, é uma substância estável, cristalina e básica que foi identificada em 1870 por Graebe e Caro, recebendo este nome devido seu efeito irritante na pele. Desde sua descoberta, a família das acridinas tem demonstrado um amplo espectro de propriedades farmacológicas. Primeiro empregado como agente antibacteriano durante o começo do vigésimo século, até serem quase substituídos por penicilinas e outros antibióticos. No entanto, ainda é considerável o interesse na sínteses e aplicações de derivados acridínicos, resultantes de modificações químicas estruturais, que lhes confere uma diversidade de atividades biológicas descritas na literatura, tais como antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica, antialzheimer, antiparasitária e antitripanossomal. Um dos principais mecanismos que caracterizam a atividade biológica desses compostos é atribuído à planaridade de suas estruturas aromáticas, que podem se intercalar na dupla hélice do DNA e interferir nas funções celulares e enzimáticas com consequente morte celular (CHTITA et al., 2016; NOWAK, 2017; FONTE et al., 2021).

Figura 13: Estrutura química da acridina



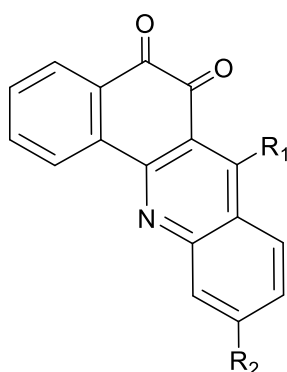
Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Devido a sua ampla gama de propriedades biológicas e farmacêuticas, existem várias pesquisas de literatura interessantes e análises de patentes sobre compostos de acridina que foram publicados desde os anos 2000. Alguns deles são dedicados a atividade biológica destes compostos, principalmente a atividade anticâncer, no

entanto a atividade antiparasitária frente a *Leishmania* sp. ainda é pouco explorada (NOWAK, 2017; LISBO et al., 2020).

Nos últimos anos, tem surgido interesse particular para avaliar a atividade antiparasitária de derivados acridínicos, principalmente de doenças negligenciadas como é o caso das leishmanioses. Neste sentido, Mahajan et al. (2018) avaliaram a atividade leishmanicida de uma série de 33 derivados da 7-arilbenzo [c] acridina-5,6-dionas. O composto 14, **Figura 14**, foi identificado como o composto mais potente contra promastigotas de *L. donovani*, provavelmente pela presença de um grupamento cloro e metoxila, enquanto o composto 27 mostrou atividade de inibição mais significativa contra amastigotas quando substituído os compostos anteriores por grupo nitro e metil, respectivamente. Os compostos 14 e 27 mostraram uma notável atividade inibidora com valores de IC₅₀ 2,55 µM e 1,50 µM, respectivamente, quando testados em linhagem celular de macrófagos humanos infectados com formas amastigotas de *L. donovani*.

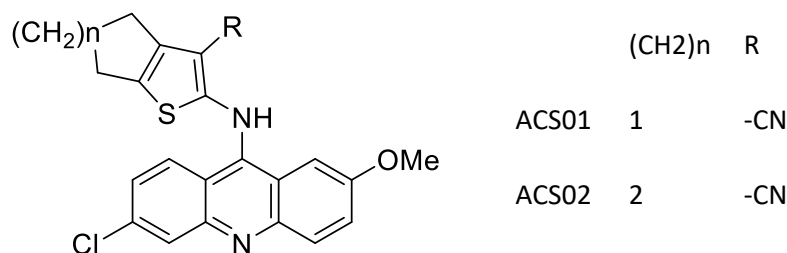
Figura 14: Estrutura química base do 7-arilbenzo [c] acridina-5,6-dionas



Composto 14 - R1: 4-Ph-Cl
R2: OCH₃
Composto 27- R1: 4-Ph-NO₂
R2: CH₃

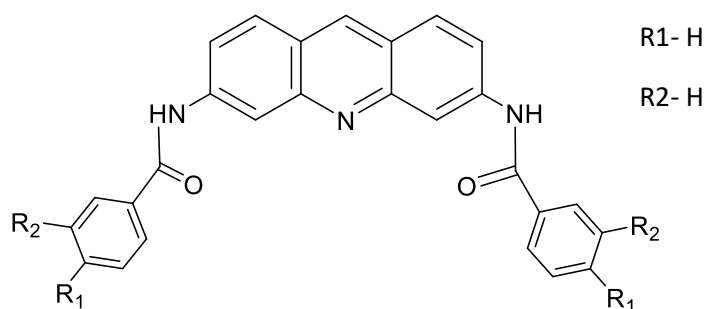
Fonte: MAHAJAN et al. (2018)

Serafim et al. (2018) sintetizaram oito novos compostos contendo o 2-aminocicloalquil-[b]-tiofeno-acridina (ACT01 e ACS01-ACS07). Dos quais os compostos ACS01 e ACS02, **Figura 15**, apresentaram o melhor desempenho leishmanicida quando comparados com os medicamentos de referência (tri e pentavalente antimoniais), com valores de IC₅₀ respectivamente de 9,60 ± 3,19 e 10,95 ± 3,96 µM para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Figura 15: Estrutura química base dos compostos ACS01 e ACS02

Fonte: SERAFIM et al, 2018

Estudos mais antigos, corroboram a atividade leishmanicida dos derivados acridínicos. Di Giorgio et al. (2007), por exemplo, sintetizaram series de dois compostos derivados da acridina, o N- [6- (acetilamino) -3-acridinil] acetamida e N- [6- (benzoilamino) -3-acridinil] benzamida. O Composto 3a (N- [6- (benzoilamino) -3-acridinil] benzamida), contendo grupos benzoilamino, **Figura 16**, nas posições 3 e 6, demonstrou uma forte afinidade por ambas as formas de parasita com média de IC_{50} 1,1 μ M para as formas promastigotas e de 4,3 μ M para as formas amastigotas do parasito *Leishmania infantum*.

Figura 16: Estrutura química do composto 3a

Fonte: DI GIORGIO et al, 2007

Assim, os derivados acridínicos tem se tornando uma fonte explorável para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial leishmanicida, principalmente utilizando as atuais ferramentas de planejamento de fármacos, como os estudos *in silico*.

2.8 PLANEJAMENTO E ESTRATÉGIAS *in silico* PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

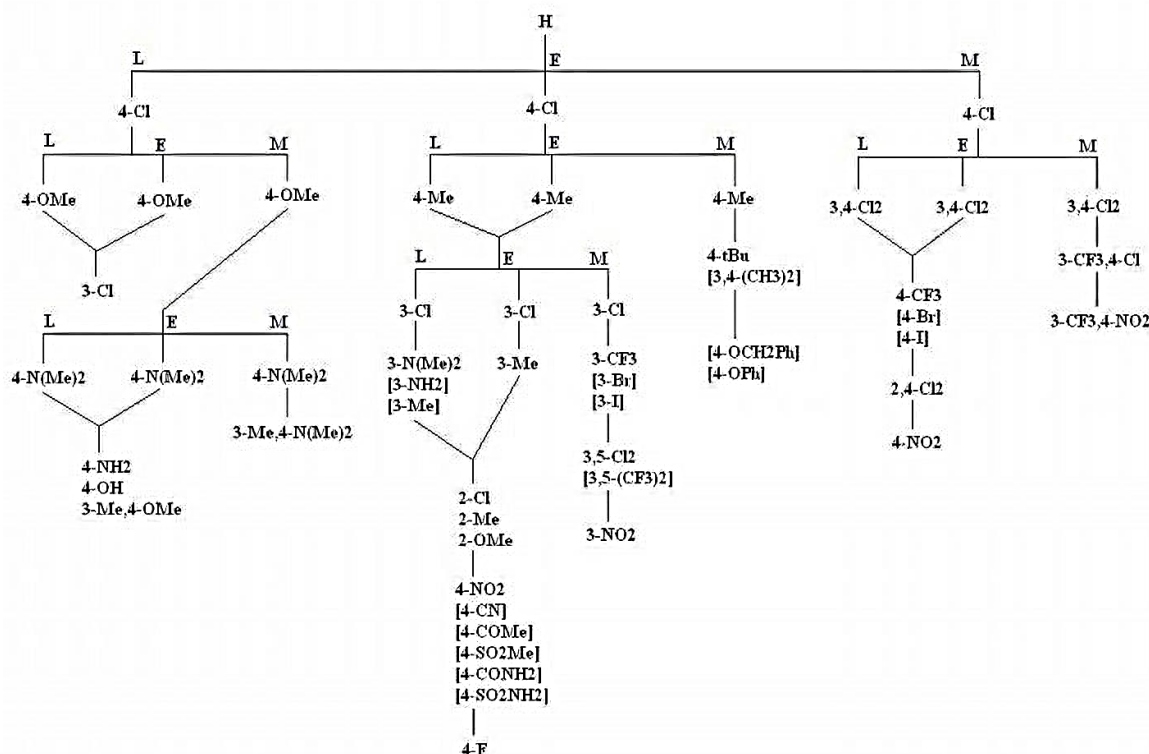
Na última década, a taxa de desgaste dos ensaios clínicos na descoberta de medicamentos atingiu 90% e o número médio de pequenas moléculas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em um período de 5 anos foi de 26,8. Em 2016, a taxa de aprovação de medicamentos de moléculas pequenas foi a mais baixa das últimas cinco décadas, e apenas 12 novos medicamentos de moléculas pequenas foram aprovados pelo FDA, ou seja, as empresas farmacêuticas gastam milhões de dólares para promover um novo medicamento por meio de testes clínicos e, portanto, o fracasso nos estágios posteriores do desenvolvimento do medicamento normalmente resulta em perdas econômicas significativas. Neste cenário as estratégias de planejamento de fármacos utilizando ferramentas computacionais (*in silico*) constituem importante otimização no desenvolvimento de novos fármacos (JIA et al., 2020; DURÁN-ITURBIDE, DÍAZ-EUFRACIO, MEDINA-FRANCO, 2020).

Considerando o expressivo número de alvos biológicos (proteínas alvo) promissores para o planejamento de fármacos, as técnicas de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS - *high throughput screening*) e de triagem virtual (VS - *virtual screening*) têm ocupado papel de destaque entre as estratégias modernas exploradas na identificação de novas substâncias bioativas (GUIDO, ANDRICOPULO e OLIVA, 2010).

A VS é um método *in silico* empregado no estudo de grandes bases de dados de compostos, com o objetivo de identificar moléculas pequenas com elevado potencial de interagirem com proteínas alvo, para posterior avaliação bioquímica *in vitro* e *in vivo*. O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos. Em muitos casos, o uso integrado de estratégias de SBDD e LBDD pode gerar informações úteis no planejamento de novas entidades químicas, por meio da sinergia e complementaridade de conhecimentos entre as estratégias (RODRIGUES et al., 2012; DE SOUZA LUIZ et al., 2019).

Os resultados de um LBDD são computacionalmente muito mais baratos de se obter do que os de um SBDD, podendo ser a base de consultas de banco de dados químicos em um estágio inicial de descoberta de drogas, aumentando a compreensão de como a ação de uma molécula pode ocorrer. Neste sentido, Topliss sugeriu uma árvore de decisão de substituintes, **Figura 17**, que deveria guiar um químico medicinal ao análogo mais potente por meio de uma análise racional da ordem de atividade observada. Este modelo define uma sequência de escolhas para as próximas estruturas a serem sintetizadas, comparando a atividade biológica entre essas moléculas. A primeira comparação é feita entre a atividade do primeiro composto (fenílico não substituído) com a da segunda molécula a ser sintetizada que, de acordo com a Árvore de Decisão de Topliss, deverá ser derivado *p*-cloro da molécula anterior. Se o composto sintetizado for biologicamente mais ativo do que a estrutura inicial, devesse seguir pela direita na primeira linha do esquema. Se for menos ativo, deve-se seguir o caminho da esquerda. E, se for igualmente ativo, a rota a ser seguida é a do meio. Após a escolha do caminho, uma nova molécula deve ser sintetizada utilizando-se o substituinte indicado pelo esquema e, novamente, a comparação deve ser realizada com a estrutura anterior, e um novo caminho deve ser escolhido. A tendência é de que se obtenham compostos biologicamente mais ativos ao final do caminho seguido (SCHÖNING E HAMMANN, 2018; ERTL, 2020).

Figura 17: Esquema de Topliss para a otimização de substituintes aromáticos: M, é mais ativo; E, é igualmente ativo; L, é menos ativo que o composto anterior da chave. Os grupos entre colchetes ([]) representam substituintes alternativos. As linhas descendentes



Fonte: Topliss, 1972

Outra estratégia de planejamento de fármacos que tem sido bastante utilizada é o desenho de fármacos baseados em fragmentos (FBDD- *Fragment-based Drug Design*) que surgiu como uma abordagem para identificar pequenas moléculas que se ligam a uma ampla gama de alvos terapêuticos (DE SOUZA LUIZ et al., 2019).

A maioria dos alvos de FBDD são proteínas, embora haja um número crescente de exemplos em que a FBDD foi utilizada para alvos não proteicos tais como RNA. Um dos princípios básicos que sustenta o FBDD é que a triagem de uma coleção de moléculas pequenas e simples aumenta a probabilidade de encontrar um "acerto" em relação às triagens de moléculas maiores e mais complexas. Neste contexto temos um processo conhecido como ancoragem molecular (*molecular docking*) que possibilita a seleção de uma pequena fração de molécula apresentando um conjunto favorável de interações intermoleculares que pode basear-se na estrutura do receptor (SBVS - *structure-based virtual screening*), em um determinado mecanismo e modo

de ligação (FERREIRA, OLIVA e ADRICOPULO, 2011; DOAK, NORTON e SCANLON, 2016).

A ancoragem molecular tem sido usada para fornecer informações sobre as interações entre as moléculas promissoras a fármacos e os possíveis alvos. O método testa todas as combinações possíveis a partir do uso de algoritmos de busca baseados na estrutura tridimensional do alvo, juntamente com compostos promissores disponíveis, que oferece uma maneira alternativa de reduzir os custos de procedimentos para estimar atividade biológica (MIZDAL et al., 2018).

Aliado a ancoragem molecular temos também os estudos *in silico* que avaliam o perfil farmacocinético e toxicológico (ADME/Tox), que são usados para descrever a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de drogas. O perfil *in silico* ADME / Tox é uma ferramenta útil para prever as propriedades farmacológicas e toxicológicas de candidatos a drogas, especialmente em estágios pré-clínicos. Para melhorar as previsões do ADME /Tox foram implantados modelos *in silico* que tem contribuído especificamente para a otimização de medicamentos e evitar falhas em estágio final, uma vez que tais falhas causam considerável investimento improdutivo de tempo e dinheiro (RANG et al., 2016; DURÁN-ITURBIDE, DÍAZ-EUFRACIO, MEDINA-FRANCO, 2020; DOMÍNGUEZ-VILLA, DURÁN-ITURBIDE e ÁVILA-ZÁRRAGA, 2021).

Uma grande variedade de métodos *in silico* compartilham o objetivo de prever os parâmetros de ADME a partir da estrutura molecular. O trabalho pioneiro de Lipinski et al. (2001) examinou compostos ativos por via oral para definir as características físico-químicas que conferem a estas substâncias a alta probabilidade de ser um medicamento oral (ou seja, a semelhança com a droga), esta foi a chamada regra dos cinco de Lipinski que delineou a correlação entre parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos dos medicamentos drogas, sugerindo que os compostos que se enquadram em uma determinada faixa de alguns parâmetros específicos são semelhantes a drogas (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017; SANTOS et al., 2018).

Duas ferramentas online e gratuitas têm sido bastante utilizadas, o SwissADME e PkCsm que permitem acesso gratuito a um *pool* de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança com drogas e compatibilidade com a química medicinal, entre os parâmetros analisados estão solubilidade, permeabilidade, disponibilidade, regra de lipinski, distribuição,

metabolismo, excreção e toxicidade (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017; JIA et al., 2020).

Com auxílio destas ferramentas *in silico*, após o planejamento estrutural dos compostos, é possível otimizar a escolha dos alvos biológicos através de critérios como grau de importância no metabolismo, possíveis grupos farmacofóricos em comum e seletividade para o parasita, trazendo menor custo e celeridade para a descoberta de novos fármacos.

2.9 POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS DA *Leishmania* sp.

O primeiro passo no processo de descoberta de drogas é selecionar um alvo na via biológica do parasita que realmente esteja ausente no hospedeiro ou seja diferente do homólogo do hospedeiro. Um alvo desejável no parasita deve estar envolvido nas vias metabólicas vitais ou funções celulares, cujo bloqueio leva à inibição do crescimento ou à morte do mesmo. As diferenças nas vias metabólicas entre o agente causador de uma doença e o hospedeiro humano são excelentes alvos terapêuticos para o planejamento de fármacos (EMAMI, TAVANGAR, KEIGHOBADI, 2017; MELO FILHO, BRAGA e ANDRADE, 2019).

Atualmente, o uso de ferramentas computacionais para estudar o possível mecanismo molecular de ação da substância bioativa tornou-se um dispositivo chave no desenho de medicamentos. Vários artigos publicados têm relatado o conceito de múltiplos alvos para as doenças causadas por *Leishmania* sp. e de outros membros da família *tripanosomatídeo*, já que estes compartilham muitas características comuns, incluindo a conservação de genes e alta identidade de aminoácidos entre proteínas, utilizando a ancoragem molecular como estratégia fundamental para identificar novos sucessos (BRAGA, 2019; DE SOUSA LUIS et al., 2019; CAMARGO et al., 2020).

Entre os possíveis alvos terapêuticos para *Leishmania* sp. estão a Tripanotona Redutase (TryR), as topoisomerases de DNA e enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol, como a 14- α -Esterol-Desmetilase (CYP51) (ALMEIDA et al., 2016; VARGAS et al., 2017; SERAFIM et al., 2018; BRAGA, 2019; CAMARGO et al., 2020; HOLANDA et al., 2020).

A TryR é uma enzima encontrada nos protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* que exerce um papel fundamental no metabolismo tiol combatendo ao estresse oxidativo e regenerando o principal antioxidante presente nesses protozoários, a tripanotona. É uma flavoproteína oxido-redutase dependente

de NADPH, que mantém o equilíbrio redox intracelular do parasita, por catalisar a redução do dissulfureto de tripanotionona para tripanotiona ditiol, ativando uma cascata de eventos responsáveis por neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo essencial para a sobrevivência do parasita. (PANDEY et al.; 2016; KUMAR, SAHA e SINGH, 2017; ROMERO e LOPEZ, 2017; CAMARGO et al., 2020).

Apesar da semelhança com a glutathione redutase, TryR está ausente no hospedeiro humano. Além disso, evidências sugerem que o aumento das taxas de TryR em espécies de *Leishmania* podem ser um mecanismo de resistência a antimoniais pentavalentes (HEFNAWY et al., 2017). Todos esses fatores consolidam a TryR como um “alvo” atraente para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicida (CAMARGO et al., 2020).

As topoisomerasas são uma classe de enzimas que relaxam as tensões de torção durante a replicação e transcrição do DNA. Esta família onipresente de proteínas também mantém a estabilidade do genoma durante a replicação do DNA. As topoisomerasas também estão sendo investigadas para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias, tornando-se importantes alvos terapêuticos no desenvolvimento de agentes leishmanicidas (JAIN e JAIN, 2018).

A Topoisomerase I é essencial nos processos metabólicos do DNA nas células, liberando o estresse produzido durante os processos de replicação, transcrição e reparo de DNA, a sua inibição constitui importante pesquisa para novos fármacos, principalmente porque a topoisomerase I de *Leishmania* difere estruturalmente das topoisomerasas I de mamíferos, enquanto as desses parasitos são heterodiméricas as dos mamíferos são monoméricas, o que torna essa enzima um importante alvo para atividade leishmanicida específica (ALONSO et al., 2016; JAIN e JAIN, 2018).

Já a via do esterol também tem sido um dos alvos de drogas mais adequados em *Leishmania* sp., porque o ergosterol e esteróis são cruciais para a viabilidade e crescimento de parasitas e também estão ausentes das células de mamíferos (EMAMI, TAVANGAR, KEIGHOBADI, 2017). Estudos bioquímicos permitiram o entendimento das vias metabólicas e da composição lipídica da *Leishmania* sp. Assim como nos fungos, o ergosterol é um importante esterol de membrana para a *Leishmania* sp., sendo responsável por manter a estrutura e a função da membrana plasmática de forma muito semelhante ao papel desempenhado pelo colesterol nas células animais (MELO FILHO, BRAGA e ANDRADE, 2019).

A biossíntese do ergosterol requer a desmetilação do C-14 do lanosterol, que envolve a enzima pertencente a família do citocromo P-450, denominada 14 α -esterol desmetilase, também conhecida por CYP51. A inativação farmacológica desta enzima provou ser muito eficaz contra infecções fúngicas e é um alvo que está sendo explorado para a nova quimioterapia tripanocida e leishmanicida. Estudos demonstraram os efeitos leishmanicidas de derivados de antifúngicos como o cetoconazol, cuja ação se dá pela inibição da CYP51, levando ao bloqueio da biossíntese de ergosterol, afetado a estabilidade da membrana destes microrganismos (WARFIELD, SETZER e OGUNGBE, 2014; RABELO et al., 2016; MWENECHANYA et al., 2017; BRAGA, 2019).

Na busca de novos compostos que possam apresentar atividade leishmanicida estão as espiro-acridinas, uma classe de derivados da acridina obtidos a partir de reações de espirociclicização, que resultam em um anel espiro ligado ao carbono de acridina. Estes compostos já demonstraram atividade antitumoral possivelmente por ação em topoisomerases (ALMEIDA et al., 2016) que ensejou novas pesquisas sobre sua possível atividade antiparasitária (ALMEIDA et al., 2021) devendo ser melhor investigada em diversas espécies de leishmania como em possíveis “alvos” como a topoisomerase I e outros relatados na literatura que sejam importantes para a sobrevivência do parasita, a exemplo TryR e esterol 14-Alfa Desmetilase (VARGAS et al., 2017; BRAGA, 2019; CAMARGO et al, 2020; HOLANDA et al, 2020).

A investigação das interações entre as espiro-acridinas e os potenciais alvos biológicos podem fornecer informações importantes sobre possíveis grupamentos ou modificações estruturais que confirmam maior ou menor ação em determinados alvos ou em determinadas cepas e formas do parasita de *Leishmania sp.*, auxiliando no entendimento do mecanismo de ação dos compostos e na justificativa de por que alguns fármacos são mais efetivos para determinada espécie e forma do parasita.

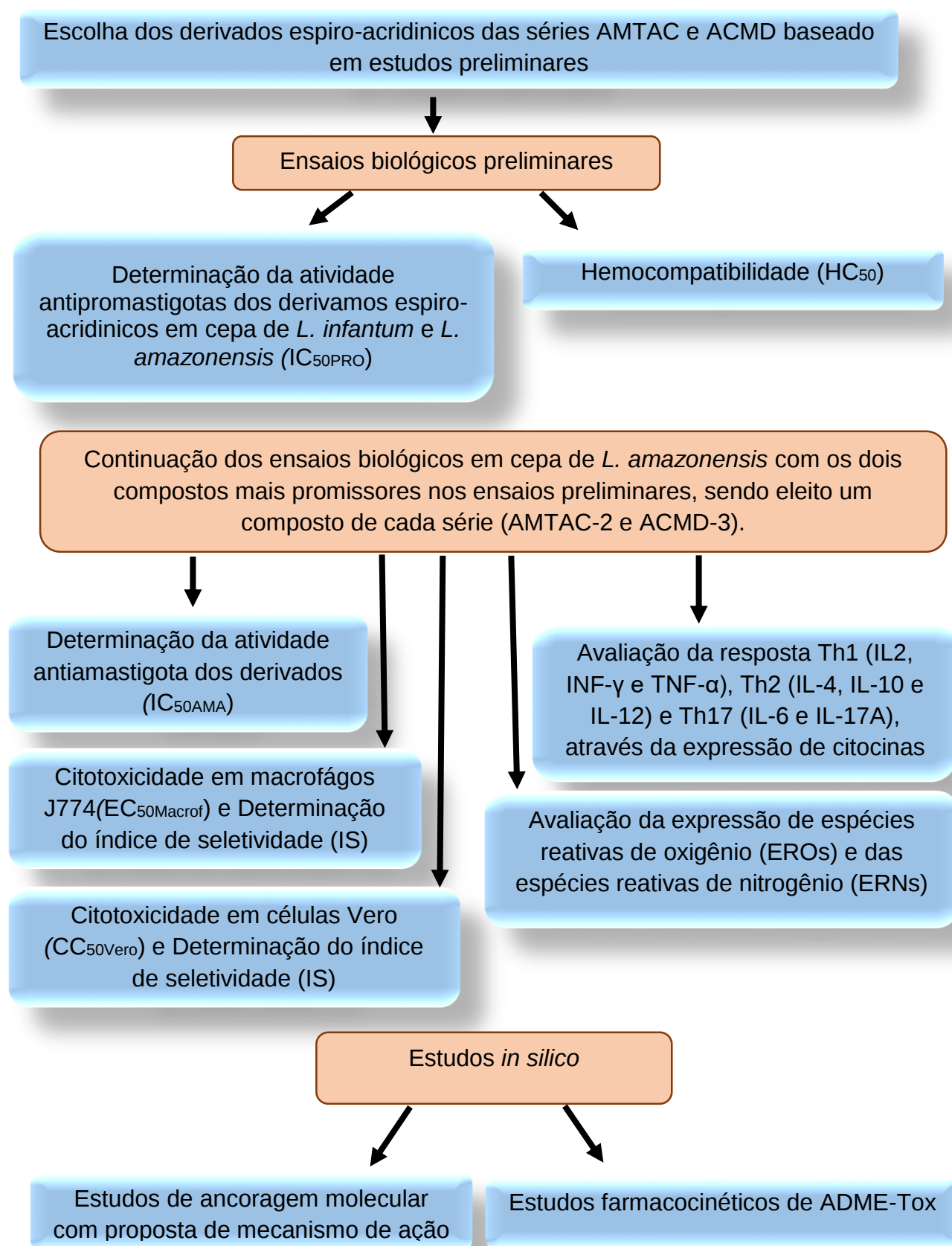
3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os compostos espiro-acridínicos foram planejados partindo-se da estrutura base não substituída chamada de AMTAC-1 (protótipo) para a série AMTAC. A partir desta molécula foi aplicado a técnica de simplificação molecular para a obtenção de uma nova série chamada ACMD, no qual seu protótipo que é não substituído foi chamado de ACMD-1. Tanto o AMTAC-1 como o ACMD-1 apresentam potencial ação antitumoral o que ensejou a obtenção de novos derivados espiro-acridínicos levando-se em consideração métodos empíricos como a árvore de decisão de Topliss e o bioisosterismo. A proposta se baseia na ideia de que moléculas com ação antitumoral possam também atuar como antiparasitários, uma vez que muitos desses compostos atuam através de mecanismos em multi-alvos. Com isso, acreditamos que os derivados espiro-acridínicos também possam apresentar tais características, atuando por mecanismos imunomoduladores ou interação direta com alvos específicos que possam ocasionar a morte celular do parasita a depender das pequenas modificações estruturais que cada composto possua.

Após o planejamento e síntese dos compostos foram iniciadas análises *in vitro* e *in silico* que estão representadas no **Fluxograma 1** para melhor visualização do esquema metodológico deste trabalho. A descrição de cada técnica empregada está dispostas em tópicos posteriores.

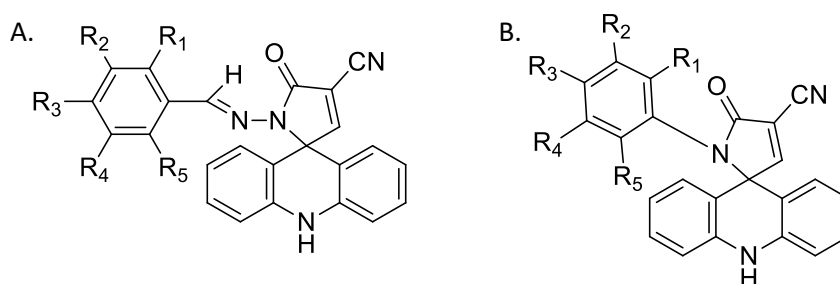
Fluxograma 1: Estruturação sequencial do desenvolvimento das análises, síntese, atividade biológica *in vitro* e estudos *in silico*



3.2 PLANEJAMENTO E ESCOLHA DOS COMPOSTOS

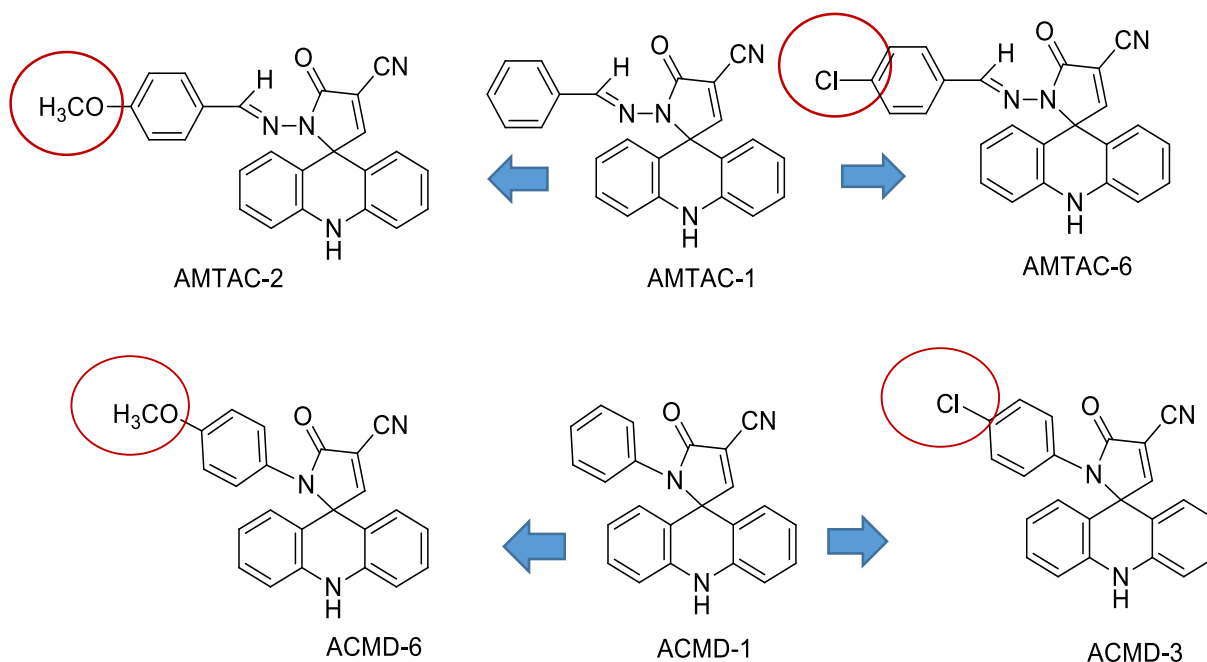
Com base nos dados da literatura que demonstram o anel acridínico com possível atividade antiparasitária, o Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos -LDSF localizado no campus I da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, sob a coordenação do prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura têm sintetizado de forma pioneira uma série de novos compostos espiro-acridínicos e seus derivados partindo das estruturas base não substituída AMTAC-1(1'-(benzilidenoamino)-5'-oxo- 1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila) e ACMD-1 (5'-oxo-1'- fenil-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila) obtido por simplificação molecular, **Figura 18**.

Figura 18: Estrutura química dos AMTAC-1 (A) e ACMD-1 (B)



Fonte: próprio autor (2021)

Quatro derivados foram sintetizados a partir das estruturas base AMTAC-1 e ACMD-1, ambos não substituídos. A síntese dos demais se baseou na árvore de decisão de topless, **Figura 17**, sendo utilizado os substituintes sequenciais do lado esquerdo (-Cl e -OCH₃) conforme esquema de substituição da **Figura 19**.

Figura 19: Modificações estruturais realizadas no AMTAC-1 e ACMD-1

Fonte: próprio autor (2021)

No total foram sintetizadas 3 espiro-acridinas para a série AMTAC, sendo AMTAC-1 não substituído (protótipo), o AMTAC-6 (1' - ((4-clorobenzilideno) amino) - 5'-oxo-1', 5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila) substituído com cloro na posição 4 do fenil e o AMTAC-2 (1' - ((4-metoxibenzilideno) amino) -5'-oxo-1', 5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol] -4'-carbonitrila) substituído com grupo metoxila na posição 4 do fenil. Para a série ACMD, foram sintetizados também 3 compostos, sendo o ACMD-1, composto não substituído (protótipo), o ACMD-3 (1'-(4-chlorophenyl) -5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile) substituído com cloro na posição 4 do fenil e o ACMD-6 (1'-(4-methoxyphenyl) -5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile) substituído com metoxila na posição 4 do fenil.

Todos os compostos fazem parte de lote único que foi sintetizado e caracterizado, previamente, por Almeida et al. (2016), Gouveia (2017), Silva (2018) e Pinheiro-Segundo (2020), participantes do grupo de pesquisa do laboratório LDSF. Toda a caracterização e comprovação estrutural dos compostos estão disponíveis nos trabalhos dos colegas citados.

As modificações estruturais foram realizadas conforme **Quadro 1** e as suas características físico químicas estão descritas na **Tabela 2**.

Quadro 1: Substituições no anel aromático das estruturas químicas base AMTACs e ACMDs

Compostos	R1	R2	R3	R4	R5
AMTAC-1	-H	-H	-H	-H	-H
AMTAC-2	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H
AMTAC-6	-H	-H	-Cl	-H	-H
ACMD-1	-H	-H	-H	-H	-H
ACMD-3	-H	-H	-Cl	-H	-H
ACMD-6	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H

Fonte: Almeida et al. (2016), Gouveia (2017) e Pinheiro-Segundo (2020)

Tabela 2: Especificações dos compostos sintetizados da série AMTAC e ACMD

Compostos	PM	FM
AMTAC-1	376,42	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O
AMTAC-2	406,45	C ₂₅ H ₁₈ N ₄ O ₂
AMTAC-6	410,09	C ₂₄ H ₁₅ ClN ₄ O
ACMD-1	349,39	C ₂₃ H ₁₅ N ₃ O
ACMD-3	383,84	C ₂₃ H ₁₄ ClN ₃ O
ACMD-6	378,42	C ₂₄ H ₁₇ N ₃ O ₂

Fonte: Almeida et al. (2016), Gouveia (2017) e Pinheiro-Segundo (2020)

Legenda: PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular, - As especificações foram obtidas no software ChemDraw Profissional 15.1, utilizado também para desenho das estruturas químicas deste trabalho.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

3.3.1 Ensaios preliminares

Foram realizados ensaios preliminares *in vitro* da atividade antipromastigota nas espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*, além da avaliação da hemocompatibilidade em hemácias (HC₅₀).

A linhagem celular *L. infantum* (Cepa MHOM/BR/70/BH46) foi cedida pelo professor Luiz Carlos Alves do Departamento de Parasitologia do IAM/ FIOCRUZ, Recife, PE, no qual foi realizada a avaliação da atividade antipromastigota para esta cepa.

Alinhagem celular *L. amazonensis* (Cepa MHOM/BR/PH8) foi cedida pelas professoras Tatiana Borges e Selma Kuchellhaus do laboratório de imunologia da Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF, no qual foi realizada a avaliação antipromastigota para esta cepa.

3.3.1.1 Cultivo dos parasitos

As formas promastigotas de *L. infantum* e de *L. amazonensis*, foram mantidas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/ penicilina, cultivadas em estufa incubadora para B.O.D – J. Prolab, modelo JP. 100 (LBCM/CPAM) com temperatura de 26° C. As formas promastigotas foram utilizados em fase exponencial de crescimento em todas as etapas do experimento.

3.3.1.2 Avaliação da atividade antipromastigota (IC_{50Pro}) dos derivados espiro-acridínicos frente a cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis* pelo método de contagem em câmara de Neubauer

Para realização dos testes *in vitro* dos derivados espiro-acridínicos as formas promastigotas das duas cepas de leishmania seguiram a mesma metodologia, com adaptações, descrita por Serafim et al. (2018).

As promastigotas foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 20% de SFB em uma concentração de 1×10^6 células/mL. Em seguida, as células foram incubadas em diferentes concentrações dos compostos (10; 5; 2,5; 1,25; e 0,625 µg/mL). No controle negativo foram incubadas as células,

apenas com o meio Schneider e no controle positivo foram incubadas as células com fármaco comercial anfotericina B.

O crescimento da cultura foi acompanhado após 72 horas, através de contagens das células viáveis utilizando a câmara de Neubauer e sendo calculado pela seguinte equação:

$N^{\circ} \text{ Leishmanias/mL} = n^{\circ} \text{ de células contadas} \times n^{\circ} \text{ de quadrantes da câmara de Neubauer} \times \text{a diluição utilizada} \times 10^4$ (Fator de correção da câmara de Neubauer)

A concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50pro}) foi o parâmetro utilizado para estimar a inibição do crescimento. A IC_{50pro} foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear com o software SPSS 8.0 para Windows.

Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes, com culturas distintas e em triplicata técnica.

3.3.1.3 Avaliação da hemocompatibilidade dos derivados espiro-acridínicos em hemácias (HC_{50})

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada como já descrito anteriormente por Serafim et al. (2018) e realizada no Laboratório de Imunologia de doenças infecciosas (LABDIC), da Universidade Federal da Paraíba -UFPB, campus João pessoa, sob a responsabilidade da prof. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima.

Após a coleta de sangue periférico humano (O+), os eritrócitos foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias em um volume de 80 μ L.

Em seguida, foram adicionadas as soluções-estoque dos derivados e do fármaco de referência, anfotericina B, diluídas em concentrações seriadas num volume de 20 μ L de PBS (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 μ g/mL). Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37°C em estufa B.O.D e a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de PBS. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente.

Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante então foi submetido à espectrofotometria utilizando espectrofotômetro (modelo Biosystems ELx800, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm para quantificar a atividade hemolítica.

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata amostral. Os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (HC₅₀) considerando o controle positivo como 100% de hemólise.

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, com protocolo número 0511/15, CAAE: 49005615.7.0000.5188.

3.3.2 Avaliação da atividade antiamastigota

3.3.2.1 Breve relato do cenário mundial e desenvolvimento da pesquisa

Inicialmente, uma breve explicação sobre o desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil, em especial desta tese.

Devido ao cenário Pandêmico mundial iniciado no fim de 2019, as pesquisas sofreram grandes obstáculos no seu desenvolvimento principalmente por medidas e decretos restritivos das atividades acadêmicas e laboratórios que se mantiveram fechados durante longo período, exceto aquelas que contribuíram para entendimento do vírus Sars-CoV-2, da doença causada por ele e possíveis opções terapêuticas. Mesmo após reabertura dos laboratórios para continuidade das demais áreas de pesquisa a restrição no quantitativo de atividades e alunos nos laboratórios foram fatos determinantes para uma readequação no plano de pesquisa e a decisão em dar continuidade apenas com uma espécie de *Leishmania*.

Em decorrência da viabilidade dos laboratórios foi decidido em conjunto com o orientador Ricardo Olímpio de Moura que a continuação das análises seria com os dois compostos mais promissores dos testes preliminares de atividade antipromastigota e citotoxicidade em hemácias avaliando sua atividade leishmanicida frente uma única espécie de *Leishmania*, a cepa de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) devido a viabilidade das células naquele momento.

Para avaliar a atividade antiamastigota foram utilizadas as formas axênicas, por ser uma técnica que fornecendo grandes quantidades de parasitas puros e viáveis

sem a necessidade de utilizar animais de laboratório experimentais para obter a forma amastigota.

3.3.2.2 Cultivo das amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

As cepas de *L. amazonensis* foram mantidas sob criopreservação no laboratório de Leishmaniose do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade de Brasília. Para o descongelamento uma alíquota foi transferida para meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e mantida a 26 °C até que os parasitos alcancem a fase log de crescimento. Em seguida, a suspensão foi transferida para o meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e 0,2% de sulfato de gentamicina, a 26 °C, de modo que os parasitas voltassem a fase log de crescimento, após essa etapa as formas promastigotas foram transferidas para estufa a 37 °C, realizando-se a curva de crescimento e formação das cepas amastigotas axênicas.

3.3.2.3 Avaliação da atividade anti-amastigota nas formas axênicas de *L. amazonensis* (IC_{50AMA}) pelo método de MTT

O teste de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é baseado na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formando cristais azuis, intracelularmente, que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Dessa forma, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Afim de avaliar o efeito leishmanicida em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* os ensaios ocorreram em placa de 96 poços, de modo que, primeiramente realizou-se as diluições dos compostos analisados em meio Schneider (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) nas concentrações de 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL. Em paralelo distribui-se em cada poço $2,0 \times 10^5$ amastigotas axênicas. Realizou-se a incubação das cepas juntamente com as moléculas testes por 24 horas em temperatura 37 °C. No controle negativo foi incubado apenas as células na ausência das moléculas testes e o controle positivo foi realizado incubando as amastigotas axênicas com fármaco comercial anfotericina B.

Após a etapa anterior, adicionou-se 10 µL de MTT por poço, incubando novamente por um período de quatro horas. Por fim, após o tempo de incubação adicionou-se 50 µL de DMSO em cada poço, aguardando dez minutos e efetuando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices LLC) no comprimento de onda de 570 nm.

3.3.3 Cultivos das células e determinação da citotoxicidade em macrófagos J774 (EC₅₀macrof)

Macrófagos J774A.1 (ATCC TIB-67), caracterizados como macrófagos murinos obtidos de tumor reticular de ascite de camundongos *Mus musculus*, fêmeas adultas, BALB/cN foram mantidos criopreservados no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em tubo Falcon contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de sulfato de gentamicina. O tubo foi centrifugado a 200 rpm, durante 10 minutos, após essa etapa, desprezou-se o sobrenadante, re-suspendendo as células em meio de cultura, transferindo-os para uma garrafa de cultura e mantida em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Afim de avaliar o efeito citotóxico em cultivos de macrófagos J774, os ensaios ocorreram em triplicata, utilizando placa de 96 poços, de modo que, primeiramente realizou-se as diluições dos compostos analisados em meio de cultura nas concentrações de 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL; em modo paralelo distribui-se em cada poço 1,0x10⁵ macrófagos J774 por poço. Realizou-se a incubação das células juntamente com as moléculas testes por duas horas em estufa de CO₂ a 5%, com temperatura de 37 °C. No controle negativo foi incubado apenas as células na ausência das moléculas testes e o controle positivo foi incubado as células com fármaco comercial anfotericina B.

Após a etapa anterior, adicionou-se 10 µL de MTT por poço, incubando novamente por um período de quatro horas. Por fim, após o tempo de incubação adicionou-se 50 µL de DMSO em cada poço, aguardando dez minutos e efetuando a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de placa SpectraMAX GeminiXS® (Molecular Devices LLC) no comprimento de onda de 570 nm.

A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC₅₀) das células

foi determinada por regressão não linear a partir do Log das concentrações testadas e da porcentagem de inibição do número de células através do *software* Graph Pad Prism® (Graph Pad Software, San Diego, CA) versão 5.01.

3.3.4 Determinação do índice de seletividade

Partindo dos dados de atividade anti-amastigotas e do ensaio de citotoxicidade em macrófagos estimou-se, respectivamente, o IC₅₀AMA (concentração capaz de inibir 50% do crescimento das amastigotas) e o EC₅₀macrof (concentração citotóxica efetiva em 50% dos macrófagos J774).

Assim, a partir destas estimativas, determinou-se o índice de seletividade (IS). O IS é um indicativo *in vitro* que informa se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito (*Leishmania sp.*) do que para as células humanas (SERAFIM et al., 2018). Nesse caso, sendo determinado pela razão:

$$\text{IS em macrófagos} = \text{CC}_{50\text{AMA}} / \text{EC}_{50\text{macrof}}$$

3.3.5 Avaliação da toxicidade renal através da citotoxicidade em células vero (CC₅₀vero) e índice de seletividade para estas células

As células Vero, foram cultivadas em garrafa de culturas, contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, conservadas em estufa incubadora de CO₂ – Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket (LBCM/CPqAM) a 5% de CO₂ a 37°C, sendo o meio de cultura trocado duas vezes por semana.

Para avaliação da citotoxicidade, as células Vero foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6x10⁵ células/poço e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para estabilização. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos compostos (10; 5; 2,5; 1,25 e 6,125 µg/mL) por 72 horas. Após este período, o sobrenadante (Meio RPMI contendo os compostos) foi retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol mais 10 µL de MTT, a uma concentração de 5 mg/mL diluído em Tampão fosfato salino (PBS), as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições de cultivo.

Após incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsufóxido) por poço para a solubilização dos cristais derivados da

redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 15 minutos. A leitura da 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, por 15 segundos.

A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC_{50vero}) das células foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows.

Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes, com culturas distintas) e em quaduplicata técnica.

O índice de seletividade em células Vero foi realizado conforme descrito no item 3.3.4, utilizando os resultados da atividade anti-amastigotas (IC_{50AMA}) e do ensaio de citotoxicidade em células Vero (CC_{50vero})

3.3.6 Avaliação da influência dos derivados espiro-acridínicos no perfil de citocinas das respostas imunológicas Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α), Th2 (IL-4, IL-10 e IL-12) e Th17 (IL-6 e IL-17a).

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, INF- γ e TNF- α foi realizada no sobrenadante dos cultivos celulares de macrófagos J774 infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, por meio do ensaio por *beads* para citometria (CBA), conforme instruções do fabricante (BD Bioscience).

O ensaio foi composto por *beads* de captura e pelo reagente de detecção. Os *beads* possuem tamanho e fluorescência conhecidos, e cada uma é conjugada a anticorpos específicos para a captura de citocinas, o que possibilita a detecção e análise.

O reagente de detecção é composto por uma mistura de anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE), que promove a sinalização por fluorescência de acordo com a quantidade de analito na amostra. Quando os *beads* de captura e o reagente de detecção são incubados com uma amostra, forma-se um complexo com *beads* de captura-analito-reagente de detecção e este complexo é quantificado por citometria de fluxo.

Os macrófagos foram aderidas em placa, infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente tratados com os compostos espiro-acridínicos nas concentrações de

2, 4 e 8µg/mL. Foram utilizados como controle negativo o macrófago sem infecção e sem tratamento com os derivados acridínicos, chamado de basal, e controle positivo o macrófago infectado com *L. amazonensis*, mas sem tratamento com os derivados acridínicos, doravante chamado, apenas, de leish.

Após o período de tratamento de 24 horas foi transferido 50 µL do sobrenadante de cada poço para um tubo cônico, seguido do acréscimo de 50 µL da mistura de *beads* de captura e 50 µL do reagente de detecção. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, foi acrescentado 500 µL do tampão de lavagem, em cada tubo, seguido de centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado 300 µL do tampão de lavagem. Foi acrescentado ao experimento uma curva de calibração contendo as seguintes concentrações de cada citocina: 0 pg/mL, 20 pg/mL, 40 pg/mL, 80 pg/mL, 156 pg/mL, 312,5 pg/mL, 625 pg/mL, 1250 pg/mL, 2500 pg/mL e 5000 pg/mL.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience) e os dados de fluorescência foram tratados utilizando o programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como pg/mL.

3.3.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a análise relativa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre as os macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, foi realizada a quantificação por meio da sonda 2-7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DFC-DA), que é permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de EROs, produz a 2-7-diclorofluoresceína (DCF), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Os macrófagos foram aderidas em placa, infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente tratados com os compostos espiro-acridínicos nas concentrações de 2, 4 e 8µg/mL. Foram utilizados como controle negativo o macrófago sem infecção e sem tratamento com os derivados acridínicos, chamado de macrófago basal, e controle positivo o macrófago infectado com *L. amazonensis*, mas sem tratamento com os derivados acridínicos, doravante chamado, apenas, de leish.

Após o período de tratamento de 24 horas, as placas foram centrífugas, o sobrenadante das células foi desprezado e então foram incubadas por 30 minutos com a sonda DCF-DA diluída em soro fisiológico pH 7,2, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com soro fisiológico, pH 7,2, à temperatura ambiente e novamente suspensas com 200 µL de soro fisiológico sob as mesmas condições.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJoTM versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

3.3.8 Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Para a avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) foi realizada a quantificação de ERNs, utilizando a sonda 4-amino-methylamino-2-7-difluorescein diacetato (DAF-FM diacetato), que é permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de ERNs, produz a 4-amino-methylamino-2-7-difluorescein (DAF-FM), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Os macrófagos foram aderidas em placa, infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente tratados com os compostos espiro-acridínicos nas concentrações de 2, 4 e 8 µg/mL. Foram utilizados como controle negativo o macrófago sem infecção e sem tratamento com os derivados acridínicos, chamado de macrófago basal, e controle positivo o macrófago infectado com *L. amazonensis*, mas sem tratamento com os derivados acridínicos, doravante chamado, apenas, de leish.

Após o período de tratamento de 24 horas, as placas foram centrífugas, o sobrenadante das células foi desprezado e, então, foram incubadas por 1 hora com a sonda DAF-FM diacetato diluída em soro fisiológico pH 7,2, em câmara úmida a 37°C com 5 % de CO₂, ao abrigo da luz. Após a etapa anterior, as células foram lavadas duas vezes com soro fisiológico, pH 7,2, à temperatura ambiente e novamente suspensas com 200 µL de soro fisiológico sob as mesmas condições.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD

Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

3.3.9 Análise estatística

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Teste t pareado ou Wilcoxon foram usados para comparar duas amostras normais ou não normais, respectivamente. Para as múltiplas comparações, utilizou-se o teste de ANOVA, para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism® Software Package (GraphPad®, USA, 1997) e diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

3.4 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR

A ancoragem molecular foi realizada com AMTAC-2 e ACMD-3 para avaliar a interação desses compostos com 3 proteínas alvos de *Leishmania* sp. (Tripanotona redutase da *Leishmania infantum*, Esterol 14-alfa desmetilase, Topoisomerase I de *Leishmania donovani*) e uma de humanos (Topoisomerase I de *homo sapiens*), como proposta de um possível mecanismo de ação destes compostos e comprovação de maior seletividade para alvos do parasita.

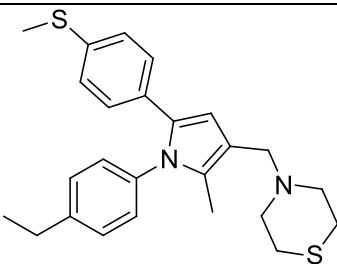
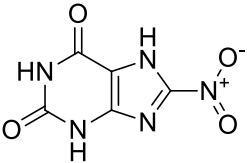
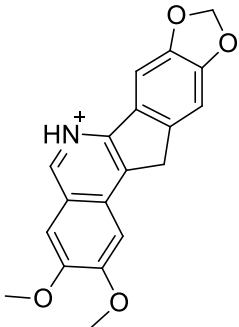
Inicialmente as espiro-acridinas foram tratadas com base na teoria semi-empírica no nível PM6 usando o software Spartan 14. Depois de otimizadas, foram submetidos ao estudo de ancoragem molecular utilizando o programa Gold 5.8.1 e as estruturas cristalográficas utilizadas foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB).

Para escolha dos possíveis alvos biológicos no parasito foi realizada uma triagem inicial para mensurar quais mecanismos descritos na literatura, envolvendo a atividade leishmanicida, se apresentavam como promissores para a classe de compostos estudada. A partir dessa triagem inicial, os alvos que apresentaram os maiores índices de afinidade foram selecionados, sendo utilizado a Tripanotona redutase da *Leishmania infantum* (PDB 4APN), Esterol 14-alfa desmetilase (PDB 3L4D), Topoisomerase I de *Leishmania donovani* (PDB 2B9S) e Topoisomerase I de

homo sapiens (PDB 1TL8), esta última para correlacionar a maior ou menor interação dos compostos espiro-acridínicos com as topoisomerases do parasito e humanas.

Para validar o estudo, a Re-ancoragem dos alvos foi realizado quando os mesmos apresentavam ligante complexado. As enzimas alvo e seu respectivo ligante complexado estão demonstrados no **Quadro 2**.

Quadro 2: Possíveis alvos em *Leishmania sp* disponibilizados no *Protein Data Base* e seus respectivos ligantes complexados.

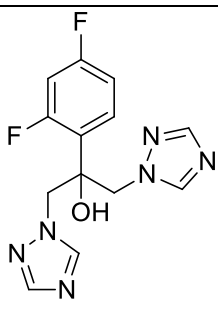
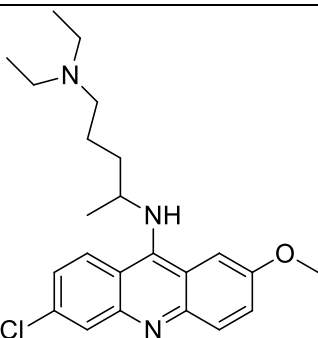
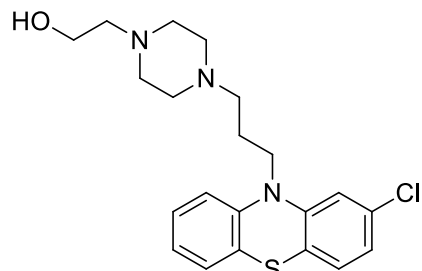
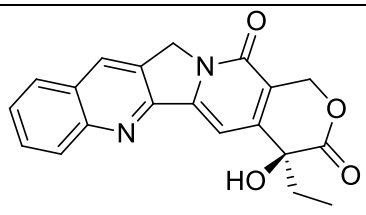
Alvos PDB	Ligante complexado
4APN	 Inibidor à base de diarilpirro: 4 - [[1- (4-etilfenil) -2-metil-5- (4-metilsulfanilfenil) pirrol-3-il] metil] tiomorfolina
3L4D	 8-nitro xantina
2B9S	Não possui ligante complexado
1TL8	 Indenoisoquinolina AI-III-52

Fonte: *Protein Data Base* (2021)

Parâmetros farmacológicos de compostos conhecidos que são inibidores comerciais dos alvos em estudo também foram utilizados como técnica para aumentar a confiabilidade dos resultados, principalmente do alvo 2B9S que não possui ligante

co-cristalizado, sendo utilizado para validação da ancoragem deste alvo o composto comercial Camptotecina (CPT). O Quadro 3 apresenta os potenciais alvos e seus respectivos inibidores comerciais.

Quadro 3: Possíveis Alvos biológicos com potencial leishmanicida e seus respectivos inibidores comerciais

Alvos PDB	Inibidores Comerciais
3L4D	 Fluconazol
4APN	 Mepacrina  Perfenazina
2B9S e 1TL8	 Camptotecina(CPT)

Fonte: Protein Data Base, EBERLE et al., (2010), MAMIDALA et al. (2016) e ALMEIDA et al. (2021).

Os arquivos dos ligantes complexados foram estudados, o receptor foi tratado como uma molécula rígida, enquanto os ligantes foram tratados como flexíveis. Os resultados da ancoragem foram analisados e as interações intermoleculares foram utilizadas como parâmetros para medir uma energia de afinidade com o alvo (pontuação), fornecida pelo programa Gold 5.8.1. Quanto maior a pontuação maior a

interação com o alvo, assim o confôrmero com maior pontuação foi investigado quanto a distância e tipo de interação com o receptor pelo programa Pymol 2.3.2.

3.5 ESTUDOS PREDITIVOS DE ADME-Tox (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE)

Foram analisados os compostos espiro-acridínicos e o fármaco de referência anfotericina B, utilizando sua estrutura química descrita na base de dados PubChem, disponível online, gratuitamente, através do site <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Os estudos preditivos de ADME-Tox são importantes para nortear sobre os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos dos potenciais fármacos. Estes estudos foram realizados utilizando as ferramentas online de acesso gratuito pk-CSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>) e SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>).

Foram selecionados os parâmetros mais importantes de cada ferramenta *online* que avaliassem a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de acordo com a robustez e facilidade de interpretação dos mesmos, conforme metodologia descrita por Domínguez-Villa, Durán-Iturbide e Ávila-Zárraga (2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA (IC₅₀PRO) E HEMOCOMPATIBILIDADE (HC₅₀)

A atividade antipromastigota dos compostos AMTAC-1, AMTAC-2, AMTAC-6, ACMD-1, ACMD-3 e ACMD-6 foi avaliada determinando a concentração inibitória de 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* frente a estes compostos. Estes resultados e dos testes de hemocompatibilidade estão expressos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC₅₀) de promastigotas (*L. infantum* e *L. amazonensis*) e concentração capaz de promover 50% hemólise (HC₅₀).

Compostos	Promastigota <i>L. infantum</i> IC ₅₀ PRO (μ M)	Promastigota <i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ PRO (μ M)	HC ₅₀ (μ M)
AMTAC-1	6,27	1,23	>400
AMTAC-2	2,22	0,73	>400
AMTAC-6	13,8	0,75	>400
ACMD-1	3,90	ND*	>400
ACMD-3	7,82	10,95	>400
ACMD-6	3,50	234,95	>400
ANFO B	0,05	1,53	24,25

Fonte: Prório autor (2021); *ND= não determinado.

Nenhum dos compostos espiro-acridínicos apresentaram toxicidade em hemácias humanas quando testados até a concentração de 400 μ M (HC₅₀> 400 μ M), demonstrando maior segurança das moléculas testadas para as hemácias humanas quando comparado com o fármaco utilizado na terapia leishmanicida, anfotericina B, o qual apresentou HC₅₀ de 24,25 μ M, confirmando os relatos da literatura sobre sua toxicidade hematológica com possibilidade de ocorrência de anemia e leucopenia nos pacientes tratados com este medicamento (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; KHATTAB et al., 2018; CASA et al., 2018).

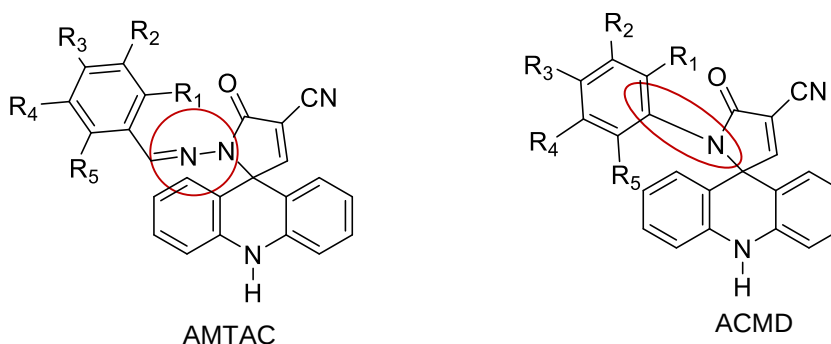
A segurança dos compostos em hemácias humanas, também foi constatada por Serafim et al. (2018) ao avaliarem atividade citotóxica de 16 compostos tiofeno-

acridínicos incluindo seus intermediários e observarem que nenhum dos compostos apresentaram oxidação contra eritrócitos humanos até a concentração mais alta avaliada (1000 μM). Os autores também sugerem que estes compostos não são tóxicos para as células sanguíneas, principalmente comparados a anfotericina B.

Todos os compostos apresentaram atividade antipromastigota, na qual os compostos da série AMTAC foram os de resultados mais promissores frente a cepa de *L. amazonensis*, variando os valores de $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ entre 0,73 e 1,23 μM , enquanto, os compostos da série ACMD apresentam melhor atividade frente a cepa de *L. infantum*, com $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ variando entre 3,50 e 7,82 μM .

A série AMTAC difere da série ACMD pela presença do grupamento imina ($\text{HC}=\text{NR}$) em sua estrutura como pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20: Diferenças estruturais entre a série AMTAC e ACMD



Fonte: Prório autor (2021)

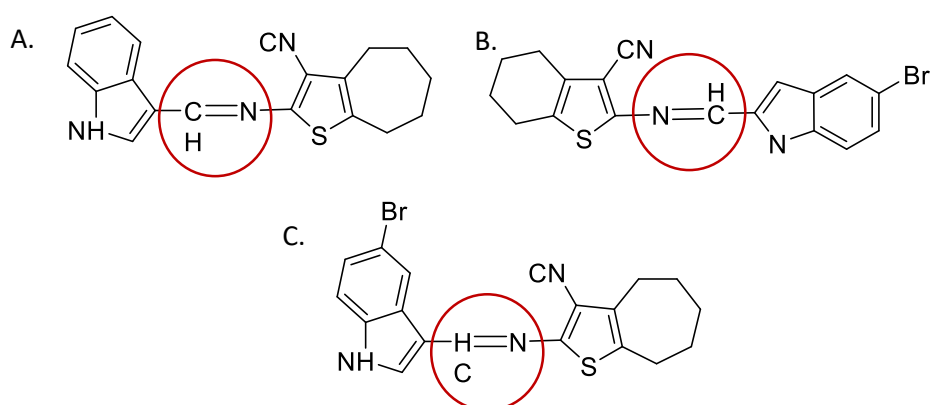
O grupo funcional imina, presente na série AMTAC, possivelmente aumenta a distância entre o núcleo espiro-pirrol e o grupo fenil, podendo atuar como doadores e/ou aceptores de Michael e facilitar as interações com os alvos biológicos. Sendo assim, a presença deste grupamento poderia justificar a melhor atividade antipromastigota do AMTAC-2 nas duas linhagens testadas, com $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ de 2,22 μM para *L. infantum* e $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ de 0,73 μM para *L. amazonensis*.

Por outro lado, ao avaliar as espécies de *Leishmania* separadamente, observamos uma possível seletividade das séries em relação a elas, já que a série AMTAC demonstrou resultados mais promissores para a cepa de *L. amazonensis*, sendo o AMTAC-2 o composto mais promissor com $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ de 0,73 μM , enquanto que a série ACMD apresentou resultados mais promissores para a cepa de *L. infantum*,

sendo o composto ACMD-6 o mais promissor com IC_{50PRO} de $3,50\ \mu M$ para esta espécie.

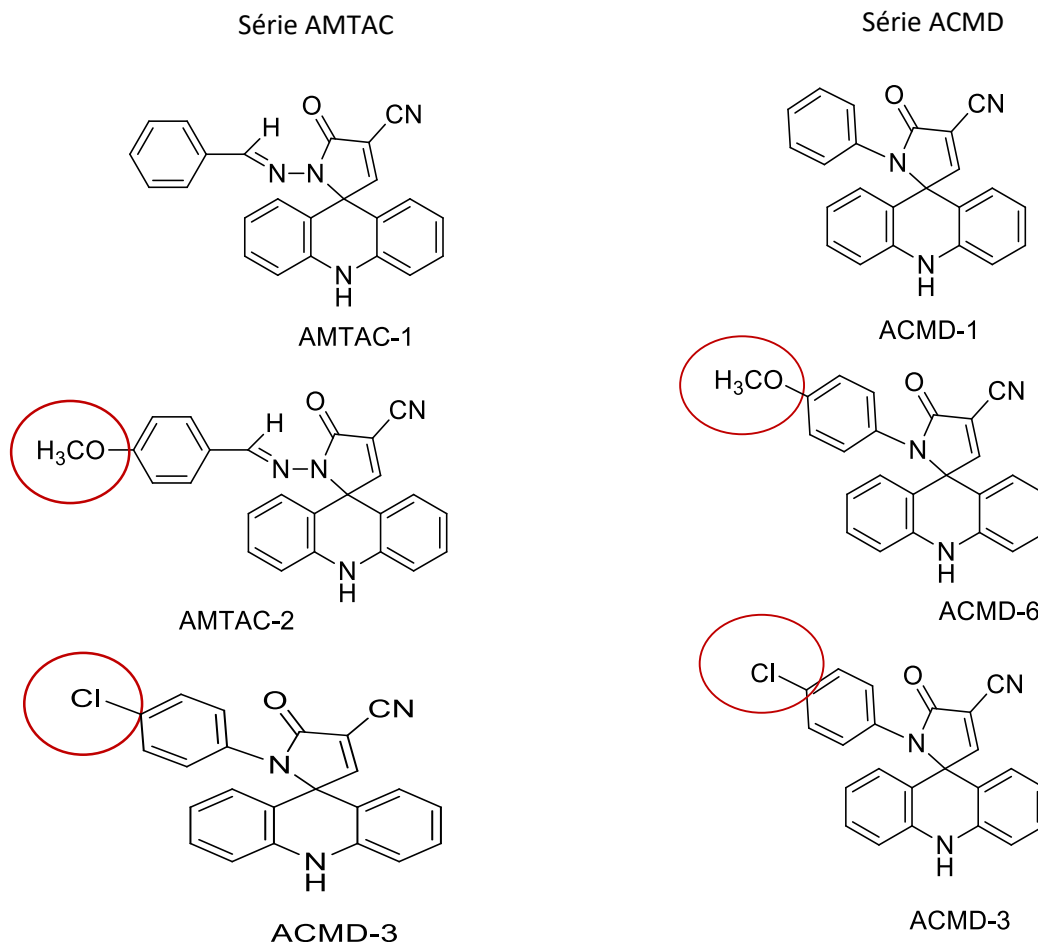
Estas diferenças de atividades entre as séries de acordo com a espécie de *Leishmania* testada pode ter relação com função imina, sugerindo que esta função seja importante para atividade leishmanicida frente à *L. amazonensis*. A importância dessa função para atividade em *L. amazonensis* foi sugerida também por Rodrigues et al. (2015) ao avaliarem 10 derivados de 2-amino-tiofeno e evidenciarem que os compostos SB-200, SB-44 e SB-83, **Figura 21**, que possuíam grupamento imina ($HC=NR$) e um anel indólico lateral em sua estrutura química apresentaram melhor atividade leishmanicida nas formas promastigotas (IC_{50PRO} de $3,65\ \mu M$, $7,37\ \mu M$ e $3,37\ \mu M$, para SB-200, SB-44 e SB-83, respectivamente) que nas formas amastigotas axênicas da *L. amazonensis* (IC_{50AMA} de $20,09\ \mu M$, $15,82\ \mu M$ e $18,5\ \mu M$, para SB-200, SB-44 e SB-83, respectivamente).

Figura 21: Estrutura química dos derivados 2- amino-tiofenicos SB-44 (A.), SB-83 (B.) e SB-200 (C.)



Fonte: Rodrigues et al., 2015.

Para a síntese dos derivados espiro-acridínicos partimos das moléculas não substituídas AMTAC-1 e ACMD-1, nas quais foram realizadas substituições na posição *para* do grupamento fenil utilizando os substituintes metoxila ($-OCH_3$) ou cloro (Cl), **Figura 22**. A escolha dos substituintes foi baseada na árvore de decisão de Topllis (Figura 17) que direciona empiricamente quais substituintes devem ser adicionados, em uma sequência lógica, a um *scaffold* promissor.

Figura 22: Compostos espiro-acridínicos e seus substituintes

Fonte: próprio autor (2021)

O AMTAC-1 é o composto espiro-acridínico não substituído e apresentou satisfatória atividade antipromastigota para as duas espécies de *Leishmania* avaliadas, sendo mais efetiva a ação contra cepa de *L. amazonensis* (IC_{50PRO} 1,23 µM) que para *L. infantum* (IC_{50PRO} 6,27 µM), sugerindo melhor atividade antipromastigota nesta espécie quando comparado ao fármaco de referência anfotericina B (IC_{50PRO} 1,53 µM). Por outro lado, o composto ACMD-1, também não substituído, apresentou satisfatória atividade antipromastigota frente a cepa de *L. infantum* (IC_{50PRO} 3,90 µM), mas os valores para a cepa de *L. amazonensis* não apresentaram níveis determináveis, que atribuímos a questões metodológicas.

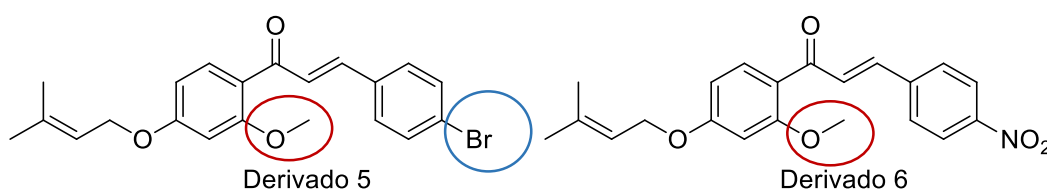
No AMTAC-2 (-OCH₃) foi adicionado um grupo metoxila na posição *para* do fenil conferindo ao composto uma melhora significativa na sua atividade antipromastigota para as duas espécies de leishmania (IC_{50PRO} 2,22 µM - *L. infantum*

e IC_{50PRO} 0,73 μM -*L. amazonensis*) quando comparado com o composto não substituído, tornando-o o mais promissor dentre as moléculas testadas, além de sinalizar que o grupo metoxila tenha importante papel na atividade biológica possivelmente pelo seu efeito doador de elétrons que pode favorecer a interação com o alvo biológico.

A possível importância da metoxila na atividade biológica também foi verificada na série ACMD, na qual o composto ACMD-6 (-OCH₃) foi o que apresentou melhor resultado na atividade antipromastigota para cepa de *L. infantum* (IC_{50PRO} 3,50 μM) em relação aos demais compostos dessa série. Entretanto, a remoção da função imina na série ACMD parece gerar uma seletividade entre as diferentes espécies, por exemplo comparando o AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-6 (-OCH₃), no qual a diferença estrutural está apenas na remoção da função imina, observamos uma redução significativa na atividade biológica do ACMD-6 para a espécie de *L. amazonensis* (IC_{50pro} 234,95 μM)

Ortalli et al. (2018) também sugeriu a importância do grupamento metoxil ao sintetizarem uma série de 31 derivados de chalconas (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) e perceberam que a substituição desse grupamento na posição 2 e a presença de nitrocompostos na posição 4 afetam o comportamento inibitório contra leishmania, conferindo ao derivado 6, **Figura 23**, o melhor valor de IC_{50PRO} (3,0 μM) para as formas promastigotas de *L. donovani*. Da mesma forma, os autores observaram que a substituição por halogênios, como o bromo, na posição 4 realizada no derivado 5, **Figura 23**, reduziu substancialmente a atividade antipromastigota deste composto (IC_{50PRO} 16,0 μM) na espécie de *Leishmania* analisada.

Figura 23: Estrutura química do derivado 5 e 6

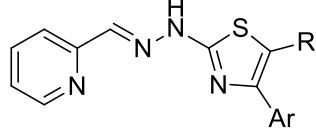


Fonte: ORTALLI et al, 2018; adaptado.

A redução da atividade antipromastigota pela adição de grupamentos halogênios também foi verificada neste trabalho ao analisar os derivados espiro-

acridínicos frente a *L. infantum*, já que os dois compostos substituídos com cloro na posição *para* do fenil, ACMD-3 e AMTAC-6, foram os que apresentaram menor atividade antipromastigota para *L. infantum* com IC_{50PRO} de 7,86 μM e 13,8 μM , respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira et al. (2020) ao analisarem a atividade antipromastigota de 5 derivados tiazopiridínicos (TP) em *L. infantum* e observarem que o único composto com atividade antipromastigota, quando comparado o composto sem modificações TP-01 ($IC_{50PRO} < 2,78 \mu M$) com os derivados substituídos, foi o TP-06 ($IC_{50PRO} < 2,78 \mu M$) possivelmente pela presença de um grupamento metoxil associado ao fenil. Os compostos TP-04 ($IC_{50PRO} 7,01 \pm 3,72 \mu M$), TP-05 ($IC_{50PRO} 22,55 \pm 0,97 \mu M$) e TP-09 ($IC_{50PRO} 5,52 \pm 0,29 \mu M$), substituídos com halogênios (Br, F e Cl, respectivamente) foram menos potentes do que TP-01, **Figura 24**.

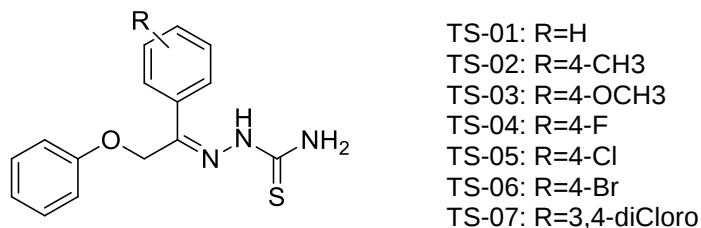
Figura 24: Estrutura química dos derivados Tiazopiridinas (TP) e suas substituições

	Composto	Ar	R
	TP-01	Fenil	H
	TP-04	4-Br-Fenil	H
	TP-05	4-F-Fenil	H
	TP-06	4-metoxil-fenil	H
	TP-09	3,4-Cl-Fenil	CH ₃

Fonte: Oliveira et al. (2020).

Silva et al. (2017) também corrobora com os resultados observados neste trabalho ao relatarem que o composto tiossemicarbazônico com melhor resultado antipromastigota em *L. amazonensis* foi o TS-03 ($IC_{50PRO} 3,5 \pm 0,33 \mu M$), **Figura 25**, possivelmente por causa do substituinte metoxil na posição *para* do fenil associado a função imina. Além disso, eles também observaram redução da atividade antipromastigota com adição de substituintes halogênicos e uma possível ligação com sua eletronegatividade interferindo na atividade destes compostos, já que dentre os substituintes halogênicos utilizados (F, Cl, Br), o composto cujo substituinte era o Flúor (TS-04), **Figura 25**, apresentou menor atividade antipromastigota ($IC_{50PRO} 87,5 \pm 2,14 \mu M$).

Figura 25: Estrutura química dos derivados tiossemicarbazônicos TS-03 e TS-04



Fonte: SILVA et al (2017)

Outro ponto que merece ser retomado é sobre a importância da função imina para atividade antipromastigota em *Leishmania sp.* que foi evidenciada por nós com as espiro-acridinas da série AMTAC, por Oliveira et al. (2020) com os derivados Tiazopiridinas e por Silva et al., (2017) com os compostos tiossemicarbazônicos, o que reforça sua importância no planejamento de novos fármacos com atividade leishmanicida.

No tocante a linhagem de *L. amazonensis*, não podemos indicar que o grupo metoxil seja determinante para atividade antipromastigota dessas moléculas, já que o ACMD-6 (-OCH₃) foi o que apresentou a menor atividade antipromastigota (IC_{50PRO} 234,95 µM), mas podemos insinuar que para atividade antipromastigota de *Leishmania sp.* na ausência de grupamento imina na estrutura química dos compostos, compostos capazes de doar elétrons, como aminas e halogênios, sejam importantes para atividade leishmanicida como por exemplo o ACMD-3 (-Cl) (IC_{50PRO} 10,95µM em *L. Amazonensis*), mas que compostos com átomos fortemente eletronegativos, como por exemplo o flúor, podem diminuir atividade promastigota possivelmente por seu efeito indutivo negativo.

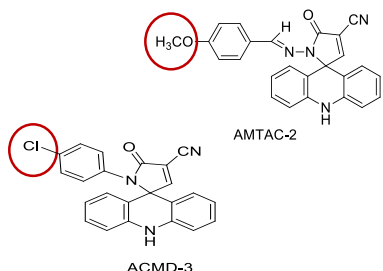
Assim, sugerimosque a presença do grupamento imina foi o responsável pela atividade mais efetiva da série AMTAC, em especial do composto AMTAC-2 (-OCH₃) na cepa de *L. amazonensis* potencializado pela presença do grupamento metoxila, eletrodoador. Ademais, o grupamento imina tem potencial relevância na atividade antipromastigota em cepas de *L. infantum*, todavia, a associação da função imina com substituintes mais eletronegativos, como os halogênios, tendem a reduzir essa atividade (AMTAC-6 (-Cl) IC_{50pro} 13,8 µM)

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA (IC_{50AMA}) E CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774 ($EC_{50Macrof}$)

Os compostos eleitos como mais promissores nos ensaios em promastigotas foram o AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), com IC_{50PRO} de 0,73 μ M e 10,95 μ M, respectivamente, com os quais foram realizadas a atividade anti-amastigota axênica e citotoxicidade em macrófagos J774, conforme **Tabela 4**.

Tabela 4: Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de amastigotas axênicas (*L. amazonensis*), concentração citotóxica em 50% dos macrófagos J774 (CC_{50}) e índice de seletividade (IS).

Compostos	IC_{50AMA} (μ M)	$CC_{50Macrof}$ (μ M)	IS
AMTAC-2	13,50	569,50	39,6
ACMD-3	10,47	27,22	2,6
ANFO B	1,08	3,09	2,8



AMTAC-2

ACMD-3

Fonte: Próprio autor (2021)

É de suma importância verificar o potencial destas moléculas nas formas amastigotas do parasita e sua citotoxicidade em macrófagos já que as formas amastigotas são encontradas dentro dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados como o homem, sendo responsável pela fase mais virulenta da doença.

Observamos que a atividade dos compostos frente as formas amastigotas da *L. amazonensis*, foram menores que os encontrados para as formas promastigotas nos testes preliminares.

Os dois compostos, AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), apresentaram atividade anti-amastigota promissora (IC_{50AMA} 13,50 μ M e 10,47 μ M, respectivamente), sendo o ACMD-3 mais ativo para as formas amastigotas que o AMTAC-2.

Quanto a citotoxicidade em macrófagos, os dois compostos demonstraram ser menos tóxicos com $CC_{50macrof}$ de 569,50 μ M para AMTAC-2 (-OCH₃) e $CC_{50macrof}$ de 27,22 μ M para ACMD-3 (-Cl) quando comparados como o fármaco de referência anfotericina B ($CC_{50macrof}$ 3,09 μ M).

Outro ponto interessante é que o ACMD-3 (-Cl) demonstrou ter melhor atividade anti-amastigota, no entanto, maior toxicidade em macrófagos ($CC_{50macrof}$ de 27,22 μ M) e menor índice de seletividade (IS 2,6) quando comparado ao AMTAC-2 (-OCH₃) ($CC_{50macrof}$ de 569,50 μ M e IS 39,6). Assim, podemos sugerir que esta maior atividade

do ACMD-3 em amastigotas seja ou pela presença do átomo de cloro ou pela ausência da função imina, mas também possivelmente sejam responsáveis por sua maior toxicidade.

Assim, merece destaque o AMTAC-2 (-OCH₃) em decorrência de sua atividade leishmanicida tanto nas formas promastigotas e amastigotas, com menor citotoxicidade em hemácias e macrófagos, além de alta seletividade para células do parasita (IS 39,6) em comparação com anfotericina B (IS 2,8) e ACMD-3 (-Cl) (IS 2,6), fortalecendo a hipótese de que o grupamento imina seja importante para potencializar atividade biológica frente a essa espécie de *Leishmania* e destaca-se o composto AMTAC-2(-OCH₃) como um promissor agente parasitário para *L. amazonensis*.

Silva et al. (2017) também avaliou a atividade promastigota e amastigota dos 5 compostos tiossemicarbazônicos representados anteriormente na **Figura 25**. Os compostos avaliados evidenciaram valores de IC₅₀ mais baixos em promastigotas (IC_{50PRO} 3,5±0,33 para o composto TS-03 (-OCH₃) do que em amastigotas intracelulares, aparentando maior eficácia deste composto contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, reforçando a importância deste grupamento para atividade antipromastigota nesta espécie. Os valores de IC₅₀ para amastigotas intracelulares dos tiossemicarbazônicos variaram de 18,3 a 40,3 µM e o IS das formas amastigotas variou de 2,96 a 4,67, sendo o composto TS-06 (-4-Br) o mais ativo contra amastigotas (IC_{50AMA} 18,3 µM), ratificando possível papel dos compostos eletronegativos na atividade antiamastigota nesta espécie de leishmania.

No presente trabalho, também observamos uma redução do IC₅₀ dos compostos quando comparamos as formas promastigotas e amastigotas, demonstrando uma maior atividade para as formas promastigotas do parasita. Entretanto, nossos compostos apresentaram melhor IC₅₀ em amastigotas, melhor índice de seletividade (em especial o AMTAC-2 (-OCH₃) com IS de 39,6) e menor toxicidade em relação aos compostos tiossemicarbazônicos estudados por Silva et al. (2017), talvez pela estrutura química acridina heterocíclica do AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl).

Ao compararmos as nossas espiro-acridinas com os derivados de acridina estudados por Mahajan et al. (2018), composto 14 (R1-Ph-Cl; R2OCH₃ (IC_{50AMA} de 2,55 µM) e 27 (R1 4-Ph-NO₂; R2 CH₃ IC_{50AMA} 1,50 µM, respectivamente), **Figura 14**, evidenciamos que ambos, por serem derivados acridínicos, apresentaram melhor

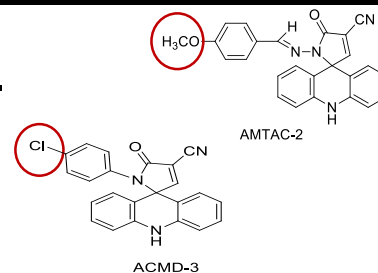
atividade antiasmastigota em *Leishmania* sp. quando comparados aos tiossemicarbazônicos descritos por Silva et al. (2017), **Figura 25**.

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO (CC_{50Vero})

Os compostos AMTAC-2 e ACMD-3 também foram avaliados quanto a sua citotoxicidade e índice de seletividade em células Vero, **Tabela 5**, até a concentração máxima de 10mg/mL. As células Vero constituem importante parâmetro de análise *in vitro* por serem fibroblastos de rim de macaco utilizadas para inferir uma possível nefrotoxicidade desses compostos.

Tabela 5: Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50AMA}) de amastigotas axênicas (*L. amazonensis*), concentração citotóxica em 50% de células Vero (CC_{50Vero}) e índice de seletividade (IS).

Compostos	IC _{50AMA} (μM)	CC _{50Vero} (μM)	IS
AMTAC-2	13,50	2,86	0,21
ACMD-3	10,47	9,80	0,93
ANFO B	1,08	105,7	97,87



Fonte: Próprio autor (2021)

De acordo com os resultados, os compostos apresentaram potencial nefrotóxico. Entretanto, é importante ressaltar que isso não invalida esses compostos como potenciais fármacos para tratamento da leishmaniose. A anfotericina B, por exemplo, tem sua eficácia clínica limitada pela sua toxicidade, principalmente nefrotoxicidade, que surge após semanas de tratamento. Na tentativa de reduzir a toxicidade do AmB, formulações baseadas em nanotecnologia foram introduzidas no mercado e atualmente estão disponíveis duas: a) AmBisome[®], pequenos lipossomas unilamelares, compostos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), colesterol e distearoilfosfatidilcolina (DSPG); e b) Abelcet[®], uma fita com partículas compostas de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) que reduziram a toxicidade da anfotericina B e aumentaram seu índice terapêutico (CASA et al., 2018).

O derivado acridínico 27, descrito por Mahajan et al. (2018), **Figura 14**, também apresentou toxicidade em células Vero (CC_{50Vero} 9,13 μM), apesar disso os autores reforçam que este composto exibiu atividade antiparasitária notável e com valores de

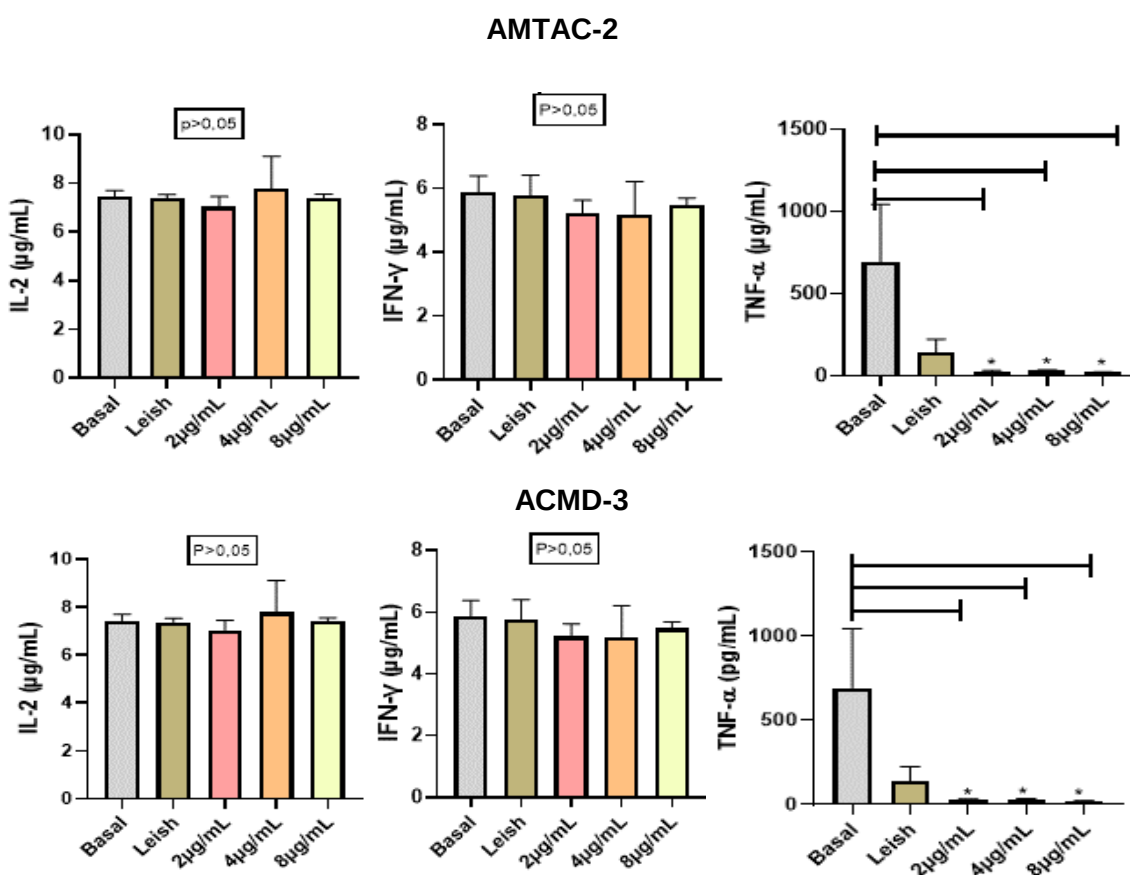
IC₅₀ baixos (IC₅₀PRO 1,95 μ M e IC₅₀AMA de 1,50 μ M em *L. donovani*), permanecendo uma opção viável para futuros fármacos.

Desta forma, sugere-se, como etapas futuras, iniciar testes in vivo para comparação dos resultados, bem como iniciar produção de diferentes formulações, incluindo técnicas de nanotecnologia, que possam minimizar o risco de nefrotoxicidade destes compostos.

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO AMTAC-2 E ACMD3- NO PERFIL DE CITOCINAS DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS Th1, Th2 e Th17

O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) foram avaliados quanto a modulação da resposta Th1 através da expressão das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α representadas na **Figura 26**.

Figura 26: Avaliação da resposta imunológica Th1 através dos níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α para os derivados espiro-acridínicos AMTAC-2 e ACMD-3. Basal- macrófago não infectado; leish- macrófago infectado com *L. amazonensis*; 2, 4 e 8 μ g/mL são as concentrações dos derivados; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

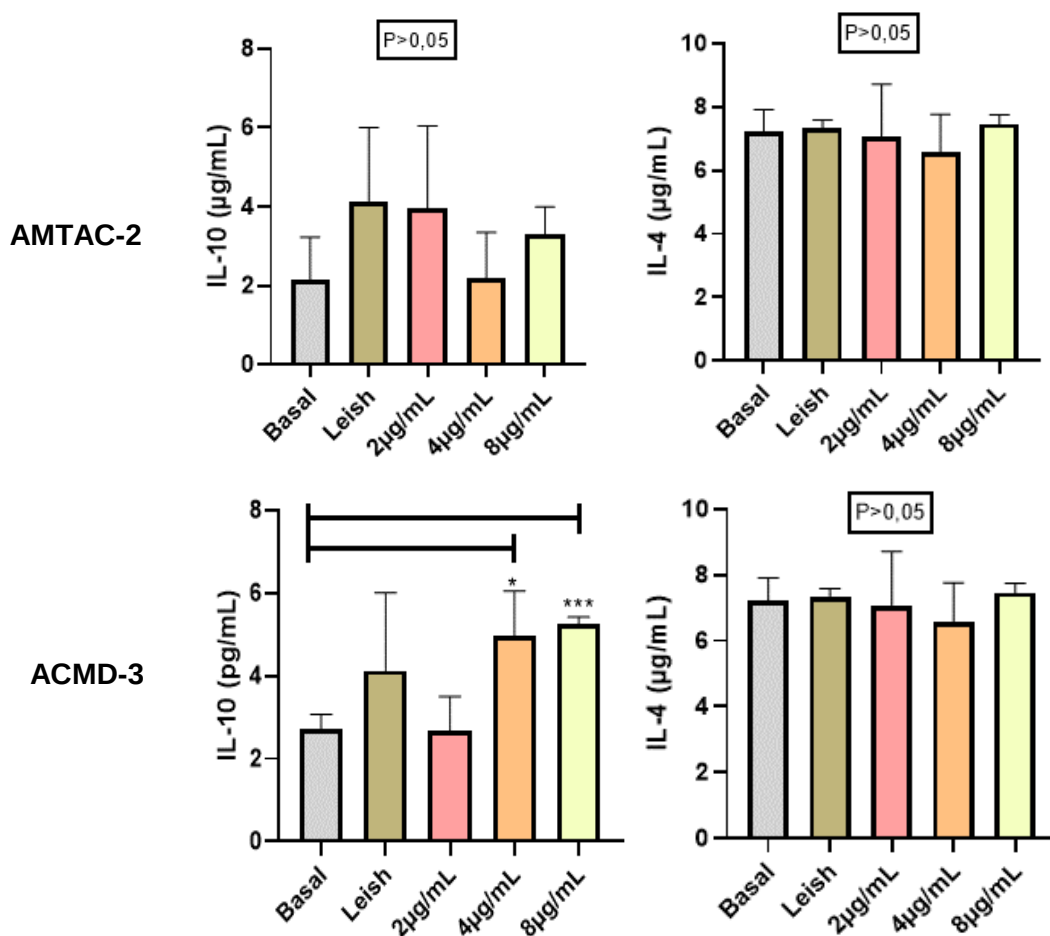


Fonte: Próprio autor (2021)

A resposta Th1 constitui um dos mecanismos de resistência do hospedeiro contra o parasita, já que estas citocinas aumentam a atividade de macrófagos M1 e a diferenciação em células Th1 (GABRIEL et al, 2019; MIRZAEI et al, 2020). As espiroacridinas estudadas, AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), parecem não ter atividade em relação a modulação da resposta Th1, visto que não houve diferenças significativas no perfil de IL-2 e INF- γ ($p>0,05$) expressos pelo macrófago basal ou infectado com *L. amazonensis*, nem nas concentrações dos derivados acridínicos testadas (2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$). Em contrapartida, foi observado redução significativa na expressão de TNF- α nos macrófagos infectados e tratados nas concentrações de 2, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$ para as duas moléculas quando comparamos com o macrófago basal, indicando uma redução na resposta Th1.

Enquanto a resposta Th1 está associada a resistência do hospedeiro ao parasita, a resposta Th2 através da expressão da IL-4 e IL-10 está associada a maior susceptibilidade da infecção. Ao avaliarmos as citocinas, IL-10 e IL-4, **Figura 27**, observa-se que o AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) não influenciaram significativamente na expressão da IL-4 ($p>0,05$), entretanto, o ACMD-3 (-Cl) aumentou significativamente a expressão da IL-10 quando comparado com macrófago basal ($p<0,05$ para concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ e $p<0,001$ para concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$) o que não foi observado com o AMTAC-2 (-OCH₃) nas mesmas concentrações testadas. Desta forma possivelmente o ACMD-3 (-Cl) tenha um efeito pró-leishmania em *L. amazonensis*, ao aumentar a IL-10 que é uma citocina inibitória da função de macrófagos M1 e da resposta Th1.

Figura 27: Avaliação da resposta imunológica Th2 através dos níveis de IL-10 e IL-4 para os derivados espiro-acridínicos AMTAC-2 e ACMD-3. Basal- macrófago não infectado; leish- macrófago infectado com *L. amazonensis*; 2, 4 e 8µg/mL são as concentrações dos derivados; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

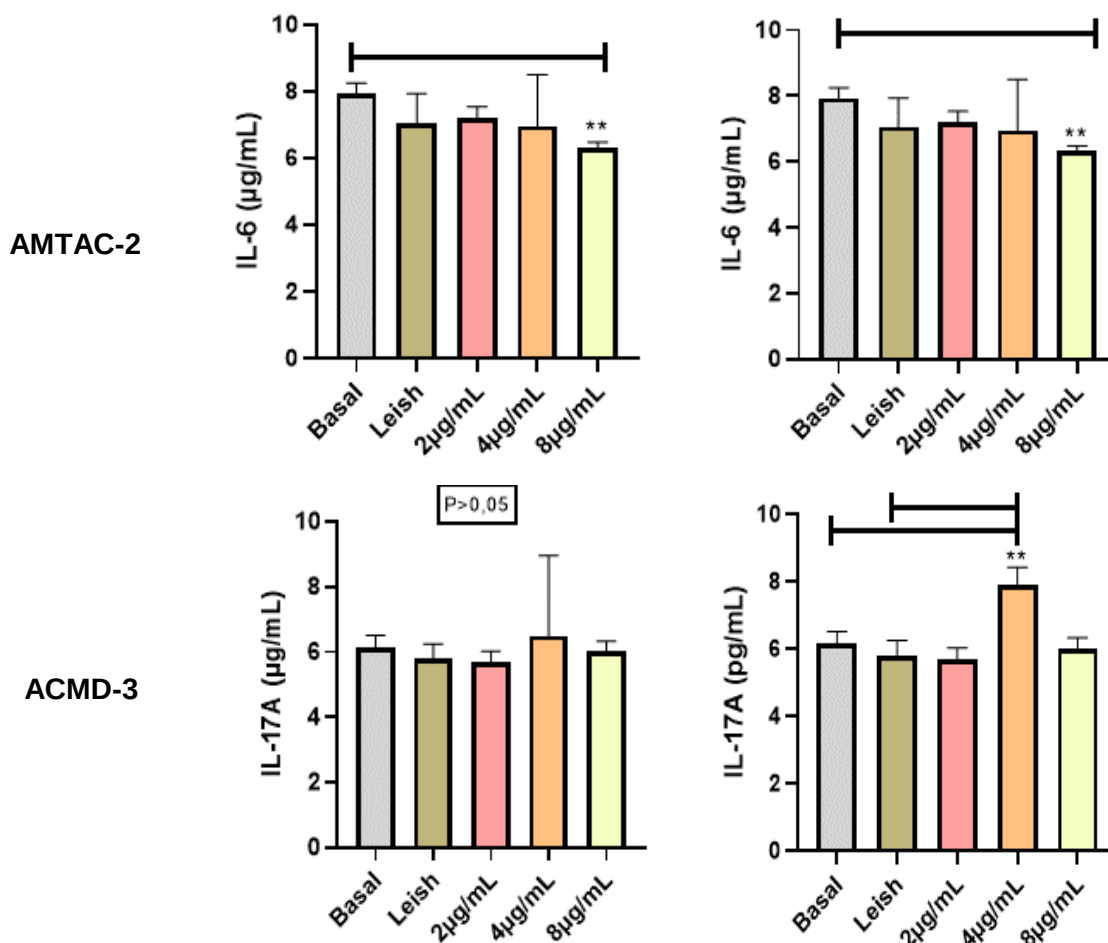


Fonte: Próprio autor (2021)

Rodrigues et al. (2021), afirmam que um dos objetivos das drogas leishmanicidas é a estimulação de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, como o TNF- α e a diminuição dos níveis de citocinas do perfil Th2 como IL-10 e IL-4.

Recentemente, a importância da resposta mediada por linfócitos Th17 nas leishmanioses vem sendo investigada, devido a sua função em eliminar microorganismos através da expressão de IL17A que é fundamental para ativação e recrutamento de neutrófilos mediando as respostas inflamatórias (FLORES et al., 2020). Neste sentido a resposta Th17 por meio da expressão das citocinas IL-17A e IL-6 foi avaliada conforme **Figura 28**.

Figura 28: Avaliação da resposta imunológica Th17 através dos níveis de IL-6 e IL-17A para os derivados espiro-acridínicos AMTAC-2 e ACMD-3. Basal- macrófago não infectado; leish- macrófago infectado com *L. amazonensis*; 2, 4 e 8µg/mL são as concentrações dos derivados; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

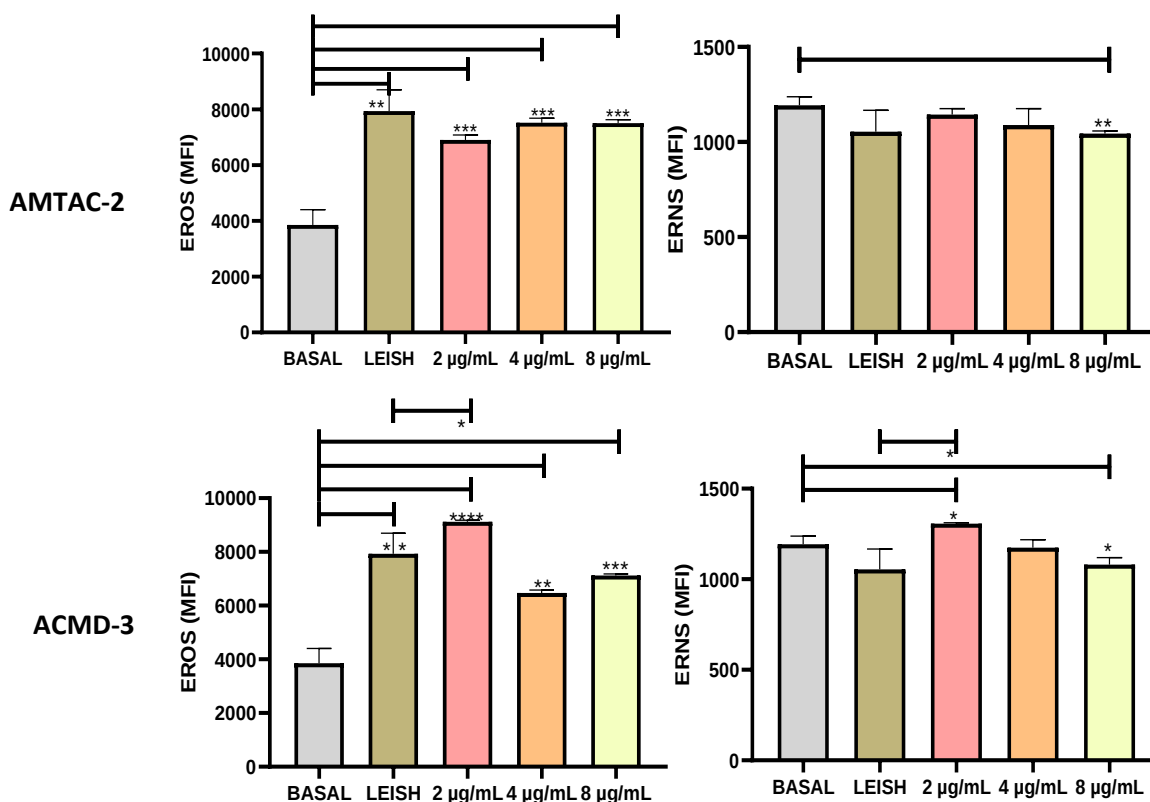


Fonte: Próprio autor (2021)

O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) demonstraram uma leve redução na produção da IL-6 (p<0,01) na concentração de 8µg/mL quando comparados com macrófago basal, mas não houve diferenças significativas na expressão desta interleucina quando comparado com macrófago Leish em nenhuma das concentrações testadas.

Com relação a IL-17A, o AMTAC-2 (-OCH₃) não diferiu significativamente em nenhuma das concentrações (p>0,05). Por outro lado, o ACMD-3 (-Cl) apresentou aumento significativo desta interleucina na concentração de 4µg/mL em relação ao macrófago basal e infectado com parasita (p<0,01), demonstrando um possível efeito modulador desta molécula na resposta Th17.

Figura 29: Avaliação da expressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) dos derivados espiro-acridínicos AMTAC-2 e ACMD-3. Basal- macrófago não infectado; leish-macrófago infectado com *L. amazonensis*; 2, 4 e 8 µg/mL são as concentrações dos derivados; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001



Fonte: Próprio autor (2021)

O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) aumentaram de forma significativa ($p > 0,01$) as espécies reativas de oxigênio em todas as concentrações testadas quando comparadas ao macrófago basal. Destacando-se, novamente, o ACMD-3 (-Cl) que aumentou significativamente ($p < 0,01$) as EROs na concentração de 2 µg/mL em relação ao macrófago infectado (Leish). Quanto as espécies reativas de nitrogênio verificamos que o AMTAC-2 (-OCH₃) reduziu levemente, mas de forma significativa ($p < 0,01$) sua expressão na concentração de 8 µg/mL em comparação com macrófago basal, já o ACMD-3 (-Cl) aumentou na concentração de 2 µg/mL relação ao macrófago basal e macrófago infectado (leish), demonstrando que esta molécula promove expressão significativa tanto de EROs como de ERNs.

Resultados semelhantes foram relatados por Bortoleti et al., (2021) ao avaliarem a atividade leishmanicida (*L. amazonensis*) e efeito imunomodelador da solidagenona (SOL), um dos principais constituintes da *Solidago chilensis*, verificando

que o tratamento com SOL (10-160 μM) inibiu a proliferação de promastigotas com $\text{IC}_{50\text{PRO}}$ 34,5 μM após 24h de tratamento, reduziu a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e aumentou o nível de espécies reativas de oxigênio, além de induzir várias mudanças morfológicas e estruturais nestas células, alterar o ciclo celular e o volume celular, aumentar a exposição à fosfatidilserina na superfície celular induzindo a perda de integridade da membrana plasmática.

Outro estudo relevante foi realizado por Rodrigues et al. (2020) na qual descreveram a cordiaquinona E (CQRE), isolada das raízes de *Cordia polycephala* (Lam.) como inibidora eficaz das formas promastigotas ($\text{IC}_{50\text{PRO}}$ 4,5 $\pm$ 0,3 μM) e amastigotas axênicas ($\text{IC}_{50\text{AMA}}$ 2,89 $\pm$ 0,11 μM) da *Leishmania brasiliensis* através de uma ação indireta associada ao aumento dos níveis de NO e ROS, além de ação direta através da morte celular por apoptose, sendo este o principal mecanismo antiamastigota desta substância.

Estes estudos e as análises realizadas permitem inferir que a produção de EROs pelo AMTAC-2 (-OCH₃) e a produção de EROs e ERNs pelo ACMD-3 (-Cl) podem estar relacionadas ao seu mecanismo leishmanicida, sendo o ACMD-3 (-Cl) a molécula mais promissora para efeitos imunomoduladores.

Para tentar solucionar o possível perfil multi-alvo, principalmente do AMTAC-2 (-OCH₃) que não demonstrou significativo mecanismo de modulação imunológica, buscou-se avaliar mecanismos de interação com potenciais alvos do parasita através dos estudos de ancoragem molecular.

4.6 ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR

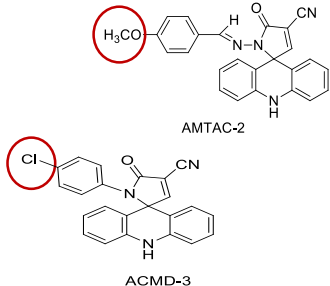
O estudo de ancoragem molecular é aplicado inicialmente para mostrar diferentes conformações do receptor alvo na forma livre do ligante. A possibilidade de comparar as formas de acoplamento, disponíveis em minibibliotecas de moléculas semelhantes a drogas, a um grande conjunto variável de receptores biológicos aumenta a identificação de possíveis novos inibidores. A reprodutibilidade é um recurso importante para estudos *in silico*, assim como, as validações propostas para esta ferramenta, como a Re-ancoragem utilizado, neste estudo, que permite a validação do alvo para a ancoragem molecular, garantindo boa reprodutibilidade quando o desvio quadrático médio da raiz de acoplamento (RMSD em inglês “*Root Mean Square Deviation*”) for menor e/ou igual a 2,0 Å (BELL e ZHANG, 2019).

4.6.1 Ancoragem molecular do alvo tripanotiona redutase (PDB 4APN)

Um importante alvo para atividade leishmanicida é a Tripanotiona Redutase (TryR). Esta enzima é fundamental para remoção de peróxidos tóxicos e manutenção dos níveis de tiol intracelular. Além disso, é uma enzima pertencente exclusivamente a família Tripanossomatidae, da qual a *Leishmania* faz parte. Sua inibição perturba o equilíbrio redox do parasita sendo considerada importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e seletivos (ORTALLI et al., 2018).

Nos estudos de ancoragem foram observados a pontuação (*scores*) que demonstram o nível de inibição dos compostos com o alvo, quanto maior a pontuação maior a inibição quando utilizamos o programa Gold 5.8.1. As pontuações foram avaliadas para os compostos espiro-acridínicos em relação ao alvo, o ligante complexado ao alvo e os inibidores conhecidos mepacrina e perfenazina, **Tabela 6**.

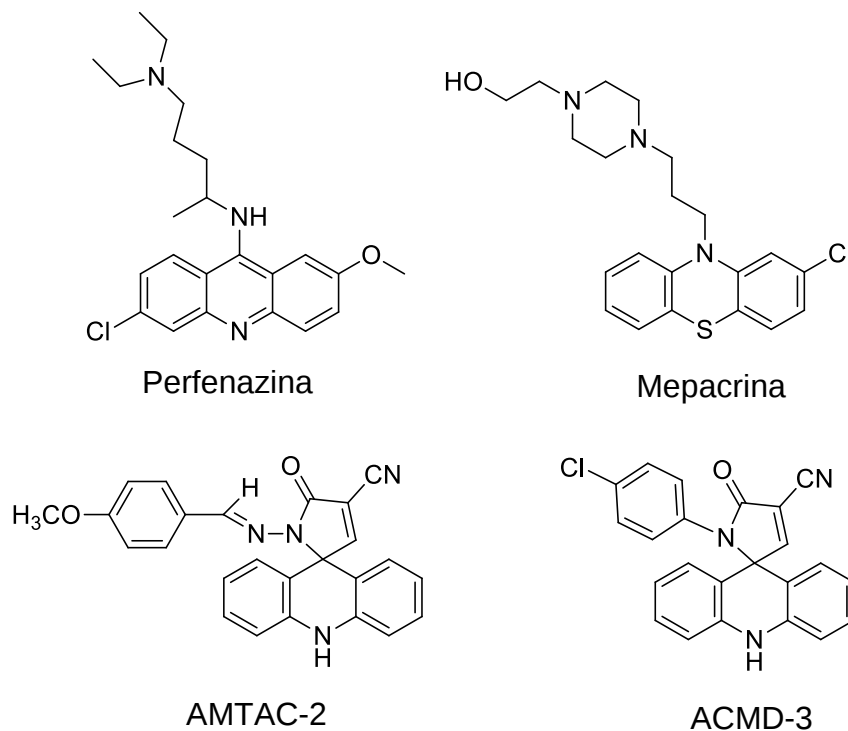
Tabela 6: Pontuação nos estudos de ancoragem molecular no alvo Tripanotiona Redutase (PDB 4APN)

COMPOSTOS	Pontuações na 4APN	
AMTAC-2 (-OCH ₃)	71,42	 AMTAC-2 ACMD-3
ACMD-3 (-Cl)	51,61	
Ligante	88,62	
Mepacrina	77,49	
Perfenazina	79,44	

Fonte: Próprio autor (2021)

O RMSD para este estudo foi de 1,0 Å, demonstrando a confiabilidade na reprodução dos resultados. Inibições seletivas conhecidas para a TryR são relatadas para compostos como a mepacrina (pontuação 4APN = 79,44) e perfenazina (pontuação 4APN = 77,49) (EBERLE et al., 2010; ALMEIDA et al., 2021). Estes foram usados de forma comparativa aos compostos espiro-acridínicos AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), devido à sua semelhança estrutural, **Figura 30**.

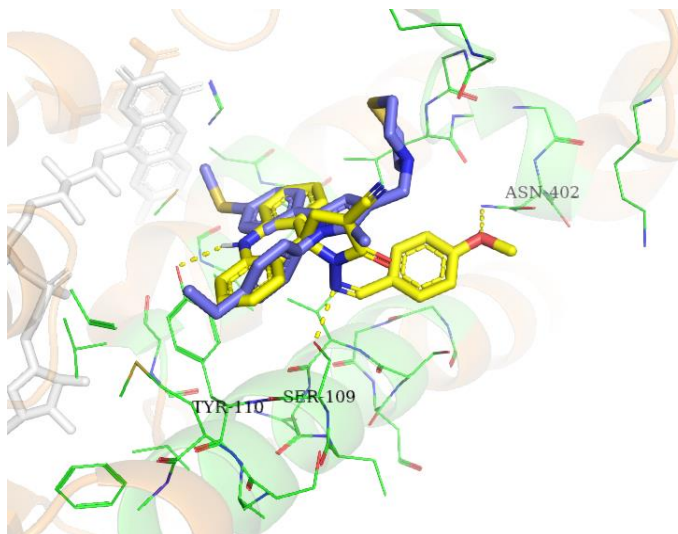
Figura 30: Estrutura química da mepacrina, perfenazina, AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl)



Fonte: Próprio autor (2021); PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

O AMTAC 02 (-OCH₃) foi encaixado em estrutura 3D, **Figura 31**, junto com o ligante à base de diarilpirrol, demonstrando que ambos ocupam lugar semelhante na enzima, mas com conformações diferentes. Isto possivelmente possibilitou que o AMTAC-2 (-OCH₃) (pontuação 4APN = 71,42) apresentasse pontuações de afinidade próximos aos inibidores já relatados (Pontuação 4APN=77,49 para mepacrina e 79,44 para perfenazina), mas um pouco abaixo do ligante disponível no PDB (pontuação 4APN=88,62).

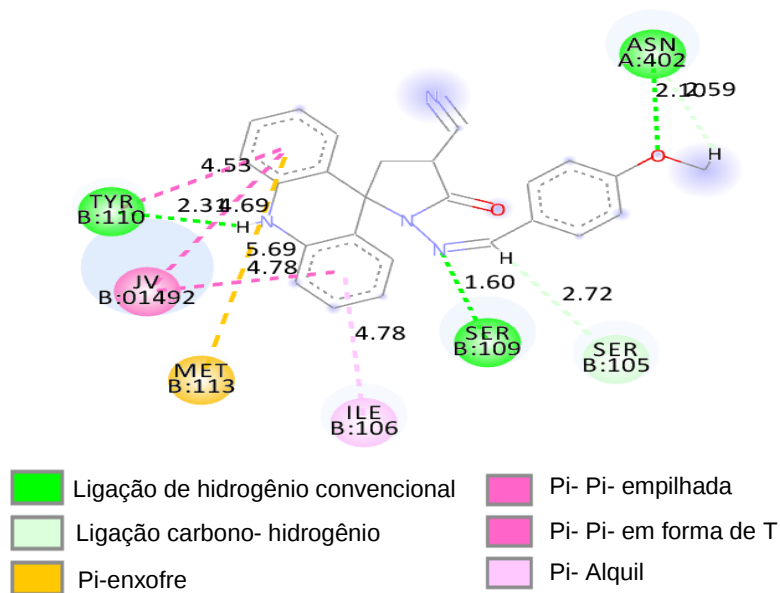
Figura 31: Representação 3D da ancoragem molecular para o AMTAC-2 (-OCH₃) (amarelo) e ligante à base de diarilpirrol (Azul) na TryR (PDB: 4APN).



Fonte: próprio autor (2021)

Por outro lado, ao analisar as interações entre o AMTAC-2 (-OCH₃) e a enzima 4APN na representação 2D, **Figura 32**, observamos que este composto apresentou interações relevantes com os resíduos de TYR B:110, SER B:109 e ASN A:402 com os quais realizou ligações de hidrogênio, sendo estas importantes devido a sua força de impacto na inibição com receptores biológicos já que foram as interações mais fortes com o alvo (SER 1,60Å; ASN 2,10Å e TYR 2,31Å). Essas interações mais fortes foram realizadas com nitrogênio do anel acridínico, a função imina e o grupo metoxila, corroborando a importancia destes grupamentos para atividade biológica do AMTAC-2 (-OCH₃) como discutido anteriormente, uma vez que o ACMD-3 (-Cl) que não possui o grupamento imina ou metoxila demonstrou menor Pontuação de afinidade com este alvo (Pontuação 4APN=51,61).

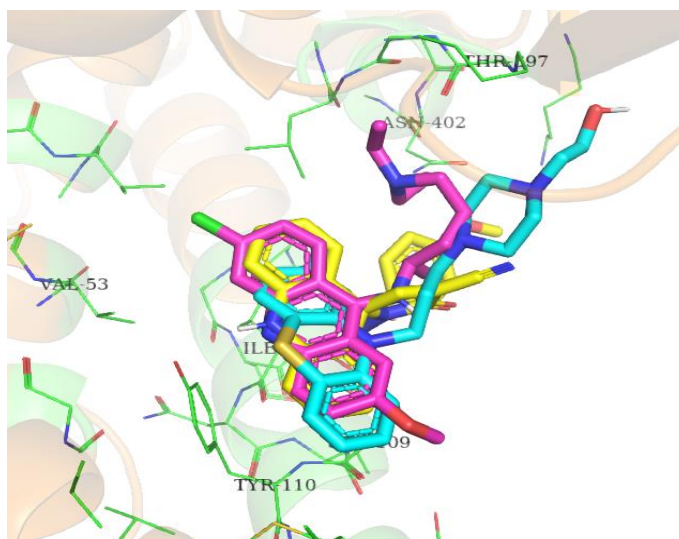
Figura 32: Representação 2D da interação entre AMTAC-2 (-OCH₃) e a TryR (PDB: 4APN).



Fonte: próprio autor (2021)

Corroborando a ideia de um possível mecanismo de ação do AMTAC-2 (-OCH₃) associado à atividade leishmanicida nos estudos em promastigotas e amastigotas e a pontuação de afinidade com o alvo TryR (PDB= 4APN), uma comparação entre os inibidores conhecidos desta enzima, mepacrina em rosa escuro e perfenazina em azul, foi demonstrada na **Figura 33**.

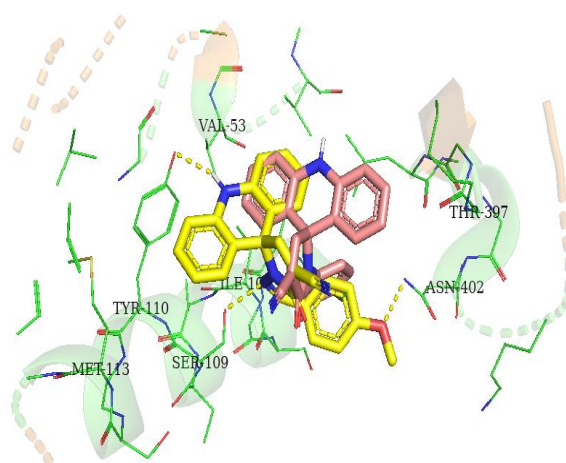
Figura 33: Representação 3D da ancoragem molecular para o AMTAC-2 (-OCH₃), Mepacrina (rosa escuro) e Perfenazina (azul) no alvo PDB 4APN



Fonte: Próprio autor (2021)

Os resultados deste estudo de ancoragem para inibidores de TryR conhecidos retrata poses semelhantes do AMTAC- 2 (-OCH₃) e dos inibidores no sítio ativo da enzima, com interações semelhantes nos resíduos de aminoácidos TYR 110, ASN 402. Em contrapartida, a **Figura 34** aponta a diferença no encaixe entre os compostos ACMD- 3 (-Cl), em rosa claro, conferindo-lhe as menores interações com o receptor da TryR quando comparado com AMTAC-2 (-OCH₃) e os inibidores conhecidos deste alvo, possivelmente pela menor labilidade do ACMD-3 (-Cl) quando comparado ao AMTAC-2 (-OCH₃) atribuído principalmente a ausência do grupo imina na estrutura, como também pela ausência do grupo metoxila, que vem demonstrando ser importante para atividade leishmanicida,

Figura 34: Representação 3D da ancoragem molecular para o AMTAC-2 (-OCH₃) (amarelo) e ACMD-3 (-Cl) (rosa claro no alvo PDB 4APN)



Fonte: Próprio autor (2021)

4.6.2 Ancoragem molecular do alvo estero 14- α desmetilase (PDB 3L4D)

A Estero 14 α -desmetilase (CYP51) está envolvida na biossíntese de numerosos esteróis estruturalmente semelhantes em animais, fungos, plantas e protozoários, tornando-se importante alvo na produção de novos quimioterápicos. Protozoários como *Leishmania infantum* têm sido relatados como amplamente susceptíveis a quimioterápicos com este alvo específico. A descoberta de medicamentos visando o CYP51 continua sendo uma das mais ativas áreas da pesquisa antitripanossomal, identificando quimiotipos por triagem *in silico*.

Neste sentido e levando em consideração que a existe uma diferença genética de aproximadamente 75% entre o CYP51 humana e o do parasita *Leishmania sp.*, reforçamos a importância de estudos com este alvo no desenvolvimento de novos fármacos (ALMEIDA et al., 2021).

A **Tabela 7** mostra os resultados da ancoragem molecular dos compostos estudados com o alvo CYP51, co-cristalizado com Fluconazol (PDB = 3L4D) e um inibidor conhecido desta enzima (8-nitro xantina), **Figura 35**, foi utilizado como parâmetro comparativo. O RMSD para este estudo foi de 1,88 Å, demonstrando a confiabilidade na reprodução dos resultados

Tabela 7: Pontuação nos estudos de ancoragem molecular no alvo Esterol 14- α desmetilase (PDB 3L4D)

COMPOSTOS	Pontuações na 3L4D
AMTAC 02 (-OCH3)	55,38
ACMD 03 (-Cl)	44,18
Ligante (8-nitro xantina)	72,05
Inibidor (Fluconazol)	103,66

Fonte: Próprio autor (2021)

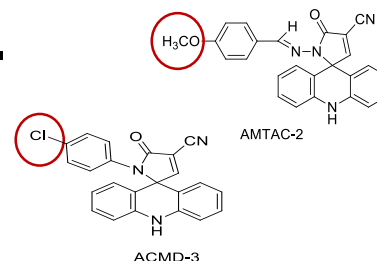
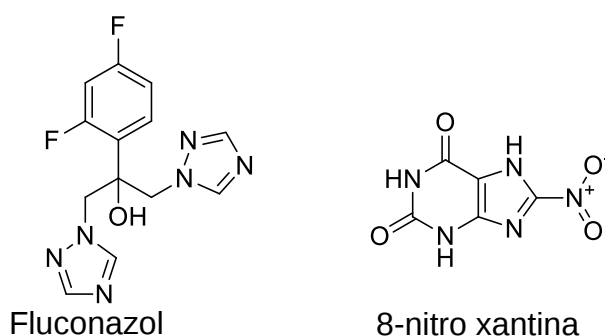


Figura 35: Estrutura química do Fluconazol e Ligante (8-nitro Xantina)

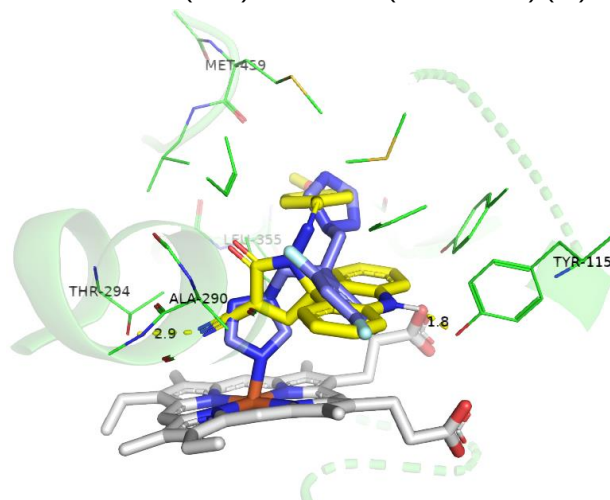


Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Os compostos estudados não apresentaram, considerando as pontuações, boa afinidade com o CYP51. A rigidez do anel espiro-acridínico dificulta uma boa aproximação com o receptor HEME, presente no sítio catalítico da enzima que pode ser visualizada na **Figura 36**. Apesar disso, interações intermoleculares interessantes

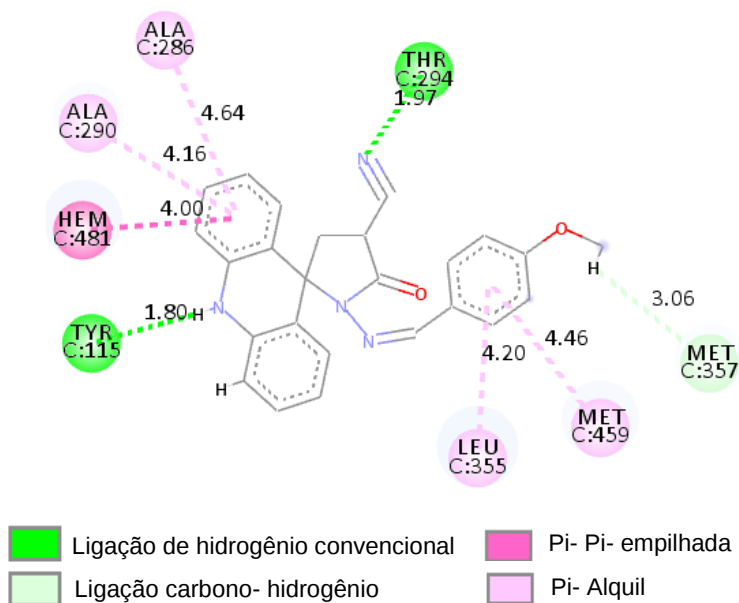
foram encontradas para o AMTAC 02 (-OCH₃) com o receptor, **Figura 37**, com qual realizou duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos TYR 115 (1,80 Å) e THR 294 (1,97Å), não descartando a possibilidade de ação deste composto por essa via mecanística, mas sugerindo que o grupamento imina e metoxila parecem não ser relevantes de forma direta para ação inibitória neste alvo, mas poderiam, indiretamente, favorecer a poses que possam facilitar o encaixe com o alvo, podendo justificar os melhores resultados de *score* do AMTAC-2 (-OCH₃) (Pontuação 55,38) em relação ao ACMD-3 (-Cl) (Pontuação 44,18).

Figura 36: Representação 3D da ancoragem molecular para o AMTAC 02 (-OCH₃) (amarelo) com Fluconazol (azul) na CYP51 (PDB: 3L4D) (B.).



Fonte: Próprio autor (2021)

Figura 37: Representação 2D das interações do AMTAC 02 (-OCH₃) na CYP51 (PDB: 3L4D)



Fonte: Próprio autor (2021)

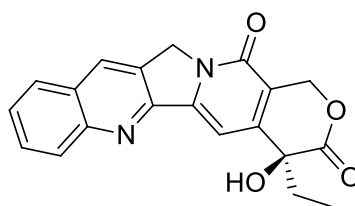
4.6.3 Ancoragem molecular do alvo Topoisomerase I da *Leishmania infantum* (PDB 2B9S) e *Homo sapiens* (PDB 1TL8)

As topoisomerasas foram reconhecidas como potenciais alvos quimioterapêuticos para atividade antitumoral e antiparasitária por desempenhar papéis fundamentais na modulação da topologia de DNA durante a replicação, transcrição, recombinação e reparo. Estudos mostram que as topoisomerasas de parasitas são suficientemente distintas comparado a humanas, de modo a permitir diferenças na segmentação química e, portanto, tornando-se bons alvos celulares (ALMEIDA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2021 *no prelo*)

As topoisomerasas de DNA de *Leishmania* estão sendo estudadas por serem um potencial alvo terapêutico no desenvolvimento de agentes com atividade leishmanicida. Geralmente, as topoisomerasas possuem funções versáteis na natureza dinâmica das estruturas secundárias e de ordem superior do DNA nas células; portanto, sua inibição tem efeito prejudicial sobre o crescimento do organismo (TAHGHIGHI et al 2016).

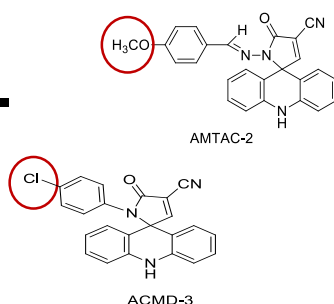
Foram realizados docking molecular dos compostos AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) nas topoisomerasas I de *Leishmania* (PDB 2B9S) e humana (PDB 1TL8), no intuito de comparar a interação e possível seletividade entre elas. O alvo 2B9S não possui ligante co-cristalizado e assim não foi possível calcular o RMSD, sendo validado através da comparação com o inibidor conhecido da topoisomerase I, camptotecina (CPT) Pontuação 2B9S = 53,29), **Figura 38**, que tem sido utilizado como padrão em estudos de ancoragem (MAMIDALA et al., 2016), já o alvo 1TL8 apresentou RMSD de 0,24 Å, validando as análises. Os dados da ancoragem molecular para estes alvos podem ser observados na **Tabela 8**.

Figura 38: Estrutura química do inibidor Camptotecina



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabela 8: Pontuação nos estudos de ancoragem molecular nos alvos Topoisomerase I de *Leishmania* (PDB 2B9S) e Topoisomerase I humana (PDB 1TL8)

Compostos	Pontuações no 2B9S	Pontuações no 1TL8	
AMTAC-2 (-OCH ₃)	58,37	62,24	
ACMD-3 (-Cl)	40,70	56,40	
Ligante	-	80,35	
Inibidor (Camptotecina)	54,67	88,49	

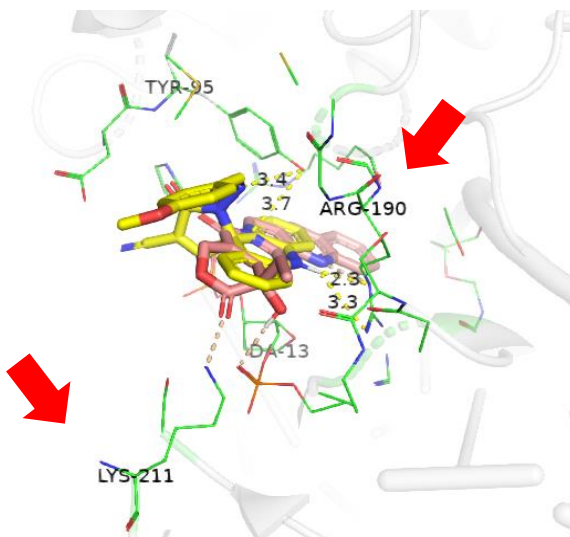
Fonte: Próprio autor (2021)

O AMTAC -2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) demonstram inibição em ambas as topoisomerasas que justificam uma possível ação antiparasitária e antitumoral corroborando com a nossa linha de raciocínio.

O AMTAC-2 (-OCH₃) apresentou pontuação maior (PDB 2B9S=58,37) para a topoisomerase I de *Leishmania donovani* e menor para topoisomerase humana (pontuação PDB 1TL8=62,24) quando comparamos com inibidor camptotecina neste alvo (pontuação PDB 1TL8= 88,49), indicando uma ação mais efetiva para o parasita. Entretanto, o ACMD-3 apresentou pontuações menores para os dois alvos quando comparados com inibidor e com ligante do 1TL8, demonstrando uma maior inibição do AMTAC-2 (-OCH₃) neste alvo.

A modelagem farmacóforica investigada por cristalografia de raios-X do composto camptotecina e seus estudos de ancoragem molecular indicam um sítio ativo muito polar, com ênfase nas interações dos resíduos de aminoácidos Lys-211 e Arg-190 através de ligações de hidrogênio, como mostrado na **Figura 39**.

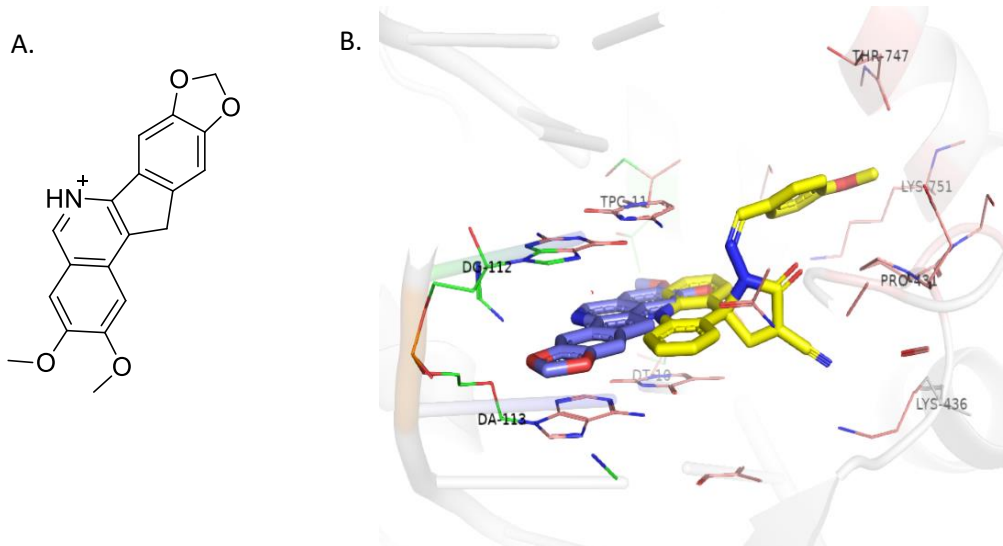
Figura 39: Representação 3D da interação entre o AMTAC-2 (-OCH₃) (amarelo) e a camptotecina (rosa claro) com a topoisomerase I de *leishmania* (PDB 2B9S)



Fonte: Próprio autor (2021)

No caso da forma humana (PDB: 1TL8), utilizada neste trabalho, ela está complexada com inibidor derivado da quinolona indenoisoquinolina AI-III-52, **Figura 40**, que atua com um maior perfil intercalador nas bases do DNA.

Figura 40: Estrutura química do ligante Indenoisoquinolina AI-III-52 da 1TL8 (A.) e representação 3D da interação do ligante (azul) e do AMTAC-2 (-OCH₃) (amarelo) com o alvo (PDB 1TL8) (B.)



Fonte: PubChem
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) apresentaram pontuações de afinidade menores que o ligante Indenoisoquinolina AI-III-52 para a topoisomerase humana

(1TL8), *score* 62,24, 56,40 e 80,35, respectivamente, sendo um bom preditivo de menor interações com células humanas.

Assim, com bases nos estudos de imunomodulação e ancoragem molecular, podemos sugerir que apesar do AMTAC-2 (-OCH₃) não ter demonstrado mecanismo de imunomodulação satisfatórios nas respostas Th1, Th2 e Th17, este composto apresentou aumento da expressão de EROs, assim como possível inibição significativa da Trypanotona Redutase PDB 4APN (Pontuação 71,42) e da Topoisomerase I do parasita PDB 2B9S (Pontuação 58,37) nos estudos de ancoragem, sugerindo um perfil multi-alvo desta molécula. Já para o ACMD-3 (-Cl), observamos que as modificações de simplificação estrutural realizadas e as substituições no *scaffold*, modificaram o mecanismo leishmanicida desta molécula, conferindo ao ACMD-3 (-Cl) um maior perfil imunomodulador.

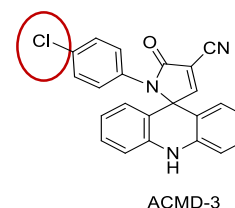
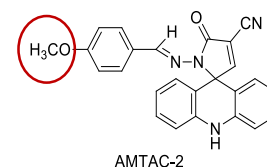
4.7 ESTUDOS PREDITIVOS ADME-TOX

Na busca de novos compostos contra a leishmaniose a semelhança com drogas e propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox) destas com os candidatos a futuros fármacos devem ser considerados. Estudos de ADME-Tox é um método útil e de baixo custo para previsão precisa de parâmetros farmacocinéticos e suas possíveis interações com células, enzimas e membranas biológicas (HOLANDA et al., 2020). Nesse sentido, plataformas ADME-Tox online (SwissADME e PkCSM) foram utilizadas para caracterizar o perfil farmacocinético *in silico* dos derivados espiro-acridínicos AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) em comparação com o medicamento de referência anfotericina B. Os resultados foram interpretados com auxílio de informações disponibilizadas nessas mesmas plataformas.

A absorção de um fármaco depende de diversos fatores entre eles a solubilidade em água, a lipofilicidade e absorção intestinal, avaliados através da ferramenta pK-CSM. Os resultados preditivos para os parâmetros de absorção dos compostos estudados estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Parâmetro farmacocinético, *in silico*, de absorção

ABSORÇÃO			
COMPOSTOS	Log S(ali)	Log P _{o/w} (wLOGP)	Absorção humana intestinal (%)
AMTAC-2	-5,50 (moderada)	3,45	95,51
ACMD-3	-5,65 (moderada)	4,27	96,01
Anfotericina B	-6,26 (baixa)	0,71	0



Fonte: Próprio autor (2021)

Legenda: LogS(ali)- solubilidade aquosa; P_{o/w} (wLOGP)- coeficiente de partição entre n-octanol e água

Ter uma molécula solúvel facilita muito as atividades de desenvolvimento de drogas, principalmente pela facilidade de manuseio para formulação. Além disso, para projetos de descoberta visando a administração oral, a solubilidade é uma propriedade importante que influencia diretamente a absorção e distribuição dos futuros fármacos (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017).

Os derivados acridínicos analisados, AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), apresentaram nos estudos *in silico* boa solubilidade em água conforme parâmetro LogS (ali), sendo classificada como moderada em comparação com o fármaco anfotericina B que apresenta baixa solubilidade.

A lipofilicidade foi avaliada usando o logaritmo do coeficiente de partição n-octanol / água (LogP_{o/w}) que está intimamente relacionado aos processos de transporte, incluindo a permeabilidade da membrana e distribuição para diferentes tecidos e órgãos. Segundo Domínguez-Villa, Durán-Iturbide e Ávila-Zárraga (2021) para uma boa biodisponibilidade oral (boa permeabilidade e solubilidade) é preciso ter um logP_{o/w} moderado (0 < log P < 3). Para nossos compostos, os valores previstos de logP_{o/w} foram de 3,45 para o AMTAC-2 (-OCH₃) e 4,27 para o ACMD-3 (-Cl) estando próximos da faixa ideal para uma boa permeabilidade oral.

Diante destes parâmetros, observamos que a moderada solubilidade em água e a satisfatória lipofilicidade corroboram com a boa porcentagem de absorção intestinal que os derivados espiro-acridínicos apresentaram (AMTAC-2 (-OCH₃) de

95,51% e ACMD-3 (-Cl) de 96,01%), demonstrando o potencial destes compostos para futuras formulações orais no tratamento das leishmanioses, ao contrário do que observamos com a anfotericina B que além da baixa solubilidade aquosa não apresenta absorção intestinal significativa, sendo um dos parâmetros que justifica não termos no mercado formulações orais desta substância, já que drogas lipossolúveis tendem a ter dificuldade de absorção em meio enteral.

Outro ponto que corrobora a possibilidade da administração oral dos compostos testados é o cumprimento a regra de Lipinski e de Veber, avaliados com auxílio da ferramenta SwissADME, que fornece informações sobre um possível perfil *Drug Likeness* desses compostos, ou seja, o quão "semelhante a uma droga" é uma substância. (LIPINSKI et al. 2001; VEBER et al. 2020).

A regra de Lipinski foi desenvolvida em estudo realizado com mais de 2000 fármacos, no qual foi observado que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral. A regra dos 5 de Lipinski, como também é chamada, propõe que a má absorção ou permeação é mais provável quando a molécula possui mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons e log P calculado (Clog P) maior do que 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco (LIPINSKI et al. 2001; SANTOS et al., 2018). No entanto, Lipinski considera compostos que agem como substratos de transportadores biológicos como exceções à regra. Tais compostos são vitaminas, antibióticos, antifúngicos e glicosídeos cardíacos (LIPINSKI et al., 2001). Outra regra importante para biodisponibilidade oral é a de Veber, que atesta que o composto deve apresentar ligações rotacionais menor ou igual a 10 e a área de superfície polar deve ser menor ou igual a 140 Å (VEBER et al., 2002).

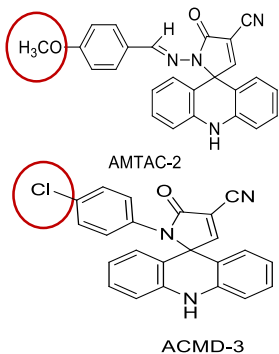
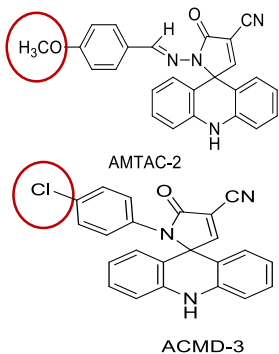
Estes parâmetros foram avaliados para os compostos testados através do SwissADME, no qual AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) obedeceram aos parâmetros da regra de Lipinski e de Veber, diferente da anfoterina B que violou 3 parâmetros da regra de Lipinski, pois apresentou peso molecular maior que 500 daltons, mais de 5 doadores e 10 aceptores de ligação de hidrogênio e uma violação a regra de Veber, pois apresenta área de superfície polar maior que 140 Å.

Holanda et al. (2020) ao realizar estudos ADME *in silico* do composto 2- [2- (4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il) etil] -1H-isoindol-1,3 (2H) -diona (PT4), através da

plataforma SwissADME, verificou que o composto PTH4 T4 cumpre todos os requisitos da regra de cinco de Lipinsk como um candidato para o desenvolvimento de formulação oral contra a leishmaniose cutânea, em comparação com anfotericina B que apresentou as mesmas três violações descritas neste estudo e antimoniato de meglumina que apresenta uma violação a regra de Lipinski, pois tem mais de 5 doadores de ligação hidrogênio.

A distribuição dos medicamentos em diferentes compartimentos no corpo foi avaliada, com auxílio da ferramenta pK-CSM, através da glicoproteína P (P-gp), da permeabilidade na barreira hematoencefálica (LogBBB) e permeabilidade no sistema nervoso central LogPS, conforme **Tabela 10**.

Tabela 10: Parâmetro farmacocinético, *in silico*, de distribuição

DISTRIBUIÇÃO				
COMPOSTOS	P-gp: substrato e inibição, respectivamente	LogBB	LogPS	
AMTAC-2	SIM;SIM	-0,261	-1,732	
ACMD-3	SIM;SIM	-0,126	-1,382	
Anfotericina B	SIM; NÃO	-2,703	-5,803	

Fonte: Próprio autor (2021); **Legenda:** P-gp -Glicoproteína P; LogBB- Permeabilidade barreira hematoencefálica (BBB); LogPS -Permeabilidade SNC

A P-gp atua como uma bomba de secreção das drogas e está presente em diversos tecidos como fígado, pâncreas, rins, cólon, entre outros, sendo importante marcador para distribuição nestes tecidos e foi analisada quanto aos compostos serem substratos no sentido de poderem ser secretados por essa proteína ou de serem inibidores dela. O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) são substratos e inibidores da P-gp podendo ter resultados benéficos de distribuição ou secreção em determinados tecidos, como também diminuição de reações adversas ou efeitos em determinados órgãos por inibir esta proteína. Para determinar exatamente quais as futuras consequências são necessários estudos mais aprofundados em cada tecido alvo e tipos de P-gp presentes. A anfotericina B é apenas substrato da P-gp o que pode reduzir sua distribuição.

A barreira hematoencefálica (BBB) protege o sistema nervoso central (SNC), separando os tecidos cerebrais da corrente sanguínea. É formada principalmente por endotélio cerebral, que pode prevenir a entrada de moléculas maiores (100%) e pequenas (98%) no SNC, mas também permite a passagem de moléculas pequenas solúveis e através de transportadores específicos (DURÁN-ITURBIDE, DÍAZ-EUFRACIO, MEDINA-FRANCO, 2020). O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) tem moderada capacidade de permear a barreira hematoencefálica por apresentarem valores de LogBB próximos de 0 (-0,261 para AMTAC-2 (-OCH₃) e -0,126 para ACMD-3 (-Cl) o que permite uma possível ação no sistema nervoso central, principalmente para doenças com manifestações neurológicas, como na leishmaniose atípica presente em cães (GRANO et al., 2019). Por outro lado, a anfotericina B (LogBB -2,70) é considerada mal distribuída para o cérebro por apresentar LogBB <-1, sugerindo menor efeito no sistema nervoso central. Cruzam prontamente a barreira hematoencefálica aqueles compostos com LogBB >0,3.

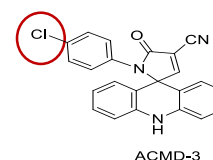
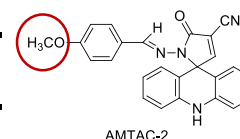
A permeabilidade ao sistema nervoso central também pode ser avaliada através do parâmetro LogPS que avalia a permeabilidade advinda da relação sangue-cérebro. São considerados penetrantes no sistema nervoso central compostos com logPS >-2, enquanto aqueles que apresentam LogPS <-3 são considerados incapazes de penetrar. Os dados de LogPS associados aos de LogBB dos compostos AMTAC-2 (-OCH₃) (LogPS -1,732) e ACMD-3 (-Cl) (LogPS -1,383) confirmam que eles podem ter distribuição para o sistema nervoso central, enquanto a anfotericina B seria incapaz de penetrar (LogPS -5,803).

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos fármacos, no entanto, todos os tecidos do corpo são capazes de metaboliza-los em certo grau. Os locais particularmente ativos incluem a pele, os pulmões, o trato gastrointestinal e os rins. As reações de metabolismo dos fármacos envolvem um sistema de enzimas microssômicas hepáticas P450, dentre estas, cinco (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4) que são responsáveis por aproximadamente 95% do metabolismo oxidativo dos fármacos (GOLAN, TASHJIAN JUNIOR, ARMSTRONG e ARMSTRONG, 2014).

Neste sentido, avaliamos o metabolismo do AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl), **Tabela 11**, utilizando a ferramenta pK-CSM, através das enzimas do citocromo p450, para auxiliar sobre possíveis risco de interações medicamentosas destes compostos.

Tabela 11: Parâmetro farmacocinético, *in silico*, do metabolismo: inibição das enzimas do citocromo P450(CYP)

METABOLISMO					
COMPOSTOS	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
AMTAC-2	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
ACMD-3	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM
Anfotericina B	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Cetoconazol	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM



Fonte: Próprio autor (2021)

A anfotericina B não inibe nenhuma das 5 enzimas estudadas, apresentando baixo potencial para interações medicamentosas, ao contrário dos compostos AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) que inibem 4 das enzimas, com exceção da CYP2D6, demonstrando importante potencial para interações medicamentosas.

A inibição de uma ou mais enzimas do citocromo P450 pode prejudicar a biotransformação ou depuração de todos os medicamentos usados clinicamente que compartilhem essa via de metabolização, resultando em níveis plasmáticos mais elevados de drogas que influenciam o resultado terapêutico. Por outro lado, se a droga é uma pró-droga, o efeito é diminuído. Assim, a inibição de CYPs pode levar à toxicidade ou falha na eficácia de uma droga. A CYP2C19 metaboliza vários medicamentos como benzodiazepínicos, inibidores da bomba de prótons e está envolvido na desintoxicação de potenciais carcinógenos ou bioativação de alguns procarcinógenos ambientais; a CYP2C9 é a principal enzima que metaboliza medicamentos com um índice terapêutico estreito, como alguns antidepressivos; a CYP2D6 é altamente polimórfico e seu metabolismo é variável acarretando risco de redução da eficácia dos medicamentos ou de efeitos adversos em pessoas que tenham reduzida ou nenhuma atividade desta enzima; as CYP 1A2 e 3A4 responsável pelo metabolismo de cerca de 60% dos xenobióticos, incluindo drogas cancerígenas, esteróides e eicosanóides (DURÁN-ITURBIDE, DÍAZ-EUFRACIO, MEDINA-FRANCO, 2020; DOMÍNGUEZ-VILLA, DURÁN-ITURBIDE e ÁVILA-ZÁRRAGA (2021).

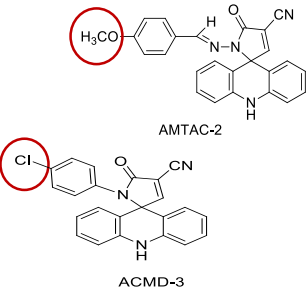
O perfil de interação com as enzimas do citocromo p450, nos fornece dados preciosos de possível perfil para interações medicamentosa, mas não invalida estes

compostos como potenciais fármacos, visto que temos no mercado atual diversas substâncias com perfil de interações medicamentosas através da inibição ou indução das CYPs como por exemplo o cetoconazol (**Figura 11**).

O cetoconazol é um antifúngico azólico, amplamente utilizado na prática clínica para tratamento de diversas infecções tópicas e sistemas, podendo ser utilizado para o tratamento da leishmaniose, através de uma abordagem de reposicionamento de fármacos como abordado anteriormente (BRAGA et al.; 2019; XAVIER et al., 2020). Este medicamento, assim como os compostos AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) inibe 4 das enzimas do citocromo P450, com exceção da CYP2D6 (**Tabela 11**), demonstrando importante potencial para interações medicamentosas, mas que não invalida sua importância e utilização na prática clínica.

A excreção ocorre principalmente como uma combinação da depuração hepática e renal, está relacionado à biodisponibilidade e é importante para determinar taxas de dosagem para atingir concentrações em estado estacionário. A excreção foi prevista pela interação como substrato do transportador orgânico de Cátions 2 renal (OCT2 renal) e pela depuração total, conforme **Tabela 12**, utilizando a ferramenta online pK-CSM. Nenhum dos compostos foram substrato para o OCT2 renal e a depuração total dos compostos variou de -0,357 a 0,332 ml/min/Kg. Este parâmetro se faz importante para estudos futuros de determinação de dose efetiva e dose tóxica dos compostos.

Tabela 12: Parâmetro farmacocinético, *in silico*, da excreção

EXCREÇÃO			
COMPOSTOS	Substrato OCT2 Renal	Depuração total (log ml/min/kg)	
AMTAC-2	NÃO	0.332	
ACMD-3	NÃO	-0.357	
Anfotericina B	NÃO	-1.616	

Fonte: Próprio autor (2021)

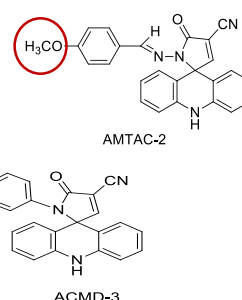
Legenda: OCT2- transportador orgânico de cátions 2 (do inglês “organic cation transporter 2”)

A Determinação da toxicidade dos compostos promissores à fármacos são necessários para identificar seus efeitos prejudiciais em humanos, animais, plantas ou meio ambiente. Testes *in vivo* são limitados pelo tempo e quantidade de animais,

envolvendo questões éticas importantes, além de ser de alto custo. Os métodos *in silico* estão cada vez mais sendo utilizados para auxiliar na determinação e predição da toxicidade dos compostos, minimizando falhas e reduzindo custos. Neste sentido comparamos a toxicidade do AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) com a da anfotericina B, através dos parâmetros de toxicidade hepática e sensibilização da pele disponíveis na ferramenta pK-CSM, descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13: Parâmetro farmacocinético, *in silico*, de toxicidade

TOXICIDADE		
COMPOSTOS	Hepatotoxicidade	Sensibilização da pele
AMTAC-2	SIM	NÃO
ACMD-3	SIM	NÃO
Anfotericina B	NÃO	NÃO
Cetoconazol	SIM	NÃO



Fonte: Próprio autor (2021)

O AMTAC-2 (-OCH₃) e ACMD-3 (-Cl) apresentam potencial para causar hepatotoxicidade. No entanto, não invalida estes compostos como promissores para futuros fármacos, já que existe no mercado medicamentos como o cetoconazol que apesar de demonstrarem toxicidade hepática em estudos *in silico* têm formulações orais e dérmicas aprovadas pelos órgãos competentes e comercializados atualmente. Assim, reforça-se a necessidade de análises complementares como estudos *in vivo* e ainda com diferentes formulações farmacêuticas que possam minimizar os dados de toxicidade destes compostos. Contudo, estes não apresentaram sensibilização na pele, podendo ser alternativas seguras para formulações dérmicas no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*.

Neste sentido, ressalta-se que apesar dos parâmetros iniciais do perfil farmacocinético *in silico*, demonstrarem limitações dos compostos para o desenvolvimento de futuros fármacos com ação sistêmica é importante salientar que a tecnologia farmacêutica tem atuado como uma ferramenta preciosa no desenvolvimento de formulações mais seguras, seletivas e eficazes mesmo para moléculas consideradas inadequadas em estudos farmacocinéticos preliminares. Outro ponto que merece destaque é a possibilidade de desenvolvimento de

formulações tópicas para o tratamento da leishmaniose tegumentar cujo principal agente causador é a *L. amazonensis*, na qual os compostos apresentaram relevante atividade leishmanicida, com baixa toxicidade em macrófagos e nos estudos *in sílico* na pele, encorajando o avanço dos estudos com estes compostos para esta atividade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados apresentados, o AMTAC-2 destacou-se como o composto com maior potencial leishmanicida, apresentando alta atividade nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, possivelmente devido ao efeito multi-alvo demonstrado nos estudos de ancoragem molecular e imunomodulador na expressão de espécies reativas de oxigênio que podem ter sido favorecidos pela presença da função imina e grupamento metoxila neste molécula. O ACMD-3 mostrou importante mecanismo imunomodulador ao favorecer a resposta Th17 e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio sugerindo serem estes alguns dos mecanismos leishmanicidas desta molécula. As espiro-acridinas, AMTAC-2 e ACMD-3, expressam nos estudos *in silico* potencialidade para desenvolvimento de formulações orais e tópicas para o tratamento das Leishmanioses.

5.1 PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar novas análises de possíveis mecanismos de ação antileishmanias como avaliação de mecanismos de morte celular por citometria de fluxo, microscopia de varredura e/ou transmissão;
- ✓ Ampliar estudos de ancoragem molecular, avaliando novos alvos leishmanicida como potenciais mecanismos de ação desses compostos;
- ✓ Realizar todos estes estudos em diferentes espécies de leishmanias de importância no Brasil;
- ✓ Realizar estudos de toxicidade *in vitro* com queratinócitos imortalizados;
- ✓ Realizar estudos de toxicidade *in vivo* para confronta com os dados *in vitro* e *in silico*;
- ✓ Iniciar desenvolvimento de formulações farmacêuticas que adequem estes compostos para administração oral e/ou dérmica.

REFERENCIAS

- ABID, H.; HARIGUA-SOUIAI, E.; MEJRI, T.; BARHOUMI, M.; GUIZANI, I. *Leishmania infantum* 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase presents relevant structural divergence to constitute a potential drug target. **BMC Structural Biology**, v.17, n.9, 2017;
- ALMEIDA, F. S. **Estudo *in silico* com possíveis alvos terapêuticos e *in vitro* anti-leishmania de derivados espiro-acridínicos**. [Dissertação]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2018;
- ALMEIDA, F. S.; SOUSA, G. L. S.; ROCHA, J. C.; RIBEIRO, F. F.; OLIVEIRA, M. R.; GRISI, T. C. S. L.; ARAÚJO, D. A. M.; NOBRE, M. S. C.; CASTRO, R. N.; AMARAL, I. P. G.; KEESSEN, T. S. L.; MOURA, R. O. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.49, número do artigo 28289, aceito em 22 de julho de 2021;
- ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; SERAFIM, V. L.; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; JUNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 92. 467–475. 2016.
- ALONSO, C., FUERTES, M., GONZÁLEZ, M., RUBIALES, G., TESAURO, C., KNUDSEN, B. R., & PALACIOS, F. Synthesis and biological evaluation of indeno[1,5]naphthyridines as topoisomerase I (TopI) inhibitors with antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 179–190, 2016;
- BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016;
- BELL, E. W; ZHANG, Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2019;
- BEZERRA, I. P. S.; OLIVEIRA-SILVA, G.; BRAGA, D. S. F. S.; MELLO, M. F.; PRATTI, J. E. S.; PEREIRA, J. C.; FONSECA-MARTINS, A. M.; FIRMINO-CRUZ, L.; MACIEL-OLIVEIRA, D.; RAMOS, T. D.; VALE, A. M.; GOMES, D. C. O.; ROSSI-BERGMANN, B.; GUEDES, H. L. M. Dietary Vitamin D3 Deficiency Increases Resistance to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection in Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n.88, p. 1-10, 2019.
- BONI, M. Leishmaniose: estudo de combinação de Fase III. **DNDi América Latina**. 2019, Disponível em: <https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/leishmaniose-estudo-de-combinacao-de-fase-iii/> acesso em 08 de junho de 2021;

BORTOLETI, B. T. S.; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; CONTATO, V. M.; SILVA, T. F.; MATOS, R. L. N.; DETONI, M. B.; RODRIGUES, A. C. J.; CARLOTO, A. C.; LAZARIN, D. B.; ARAKAWA, N. S.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; WOWK, P. F.; PAVANELLI, W. R. Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. **Phytomedicine**, v. 85, n. 153536, p. 1-11, 2021;

BRAGA, S. S. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.183, n. 1, p.1-9, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Boletim epidemiológico: Doenças tropicais negligenciadas**. Brasília-DF, número especial, p.60-73, 2021;

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017;

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014;

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, **Leishmaniose Visceral**. 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016;

BUCHMÜLLER, Y; MAUEL, J. Studies on the mechanisms of macrophage activation. II. Parasite destruction in macrophages activated by supernates from concanavalin A stimulated lymphocytes, **Journal Experimental of Medicinal**, v.150, n. 2, p. 359-370, 1979;

CAMARGO, P. G.; BORTOLETI, B. T. S.; FABRIS, M.; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; LIMA, C. H. S.; PAVANELLI, W. R.; BISPO, M. R. F.; MACEDO JR, F. Thiohydantoin as anti-leishmanial agents: *in vitro* biological evaluation and multi-target investigation by molecular docking studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2020;

CASA, D. M.; SCARIOT, D. B.; KHALIL, N. M.; NAKAMURA, C. V.; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 12-18, 2018;

CAVALCANTI, E. B. V. S. **Estudos quimiotaxonômicos e triagem virtual de flavonoides isolados da família asteraceae com potencial atividade leishmanicida** [Tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2018;

CHTITA, S.; GHAMALI, M.; HMAMOUCHE, R.; ELIDRISSI, B.; BOURASS, M.; LARIF, M.; BOUACHRINE, M.; LAKHLIFI, T. Investigation of Antileishmanial

Activities of Acridines Derivatives against Promastigotes and Amastigotes Form of Parasites Using Quantitative Structure Activity Relationship Analysis. **Advances in Physical Chemistry**, v. 1, p. 1-16, 2016;

COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. **Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review**, v. 28, n.5, p.426–437, 2015.

DA SILVA, E. R.; BROGI, S.; GRILLO, A.; CAMPIANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C.; MAQUIAVELI, C. C. Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 2, p. 139–146, 2019;

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 42717, p. 1-13, 2017;

DE SOUSA LUIS, J. A.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; ALVES, F. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LIMA, T. K. S.; ROCHA, J. C.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Combined structure- and ligand-based virtual screening aiding discovery of selenoglycolicamides as potential multitarget agents against *Leishmania* species. **Journal of Molecular Structure**, v.1198, n 126872, p. 1-12, 2019;

DE SOUSA LUIS, J. A.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; ALVES, F. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LIMA, T. K. S.; ROCHA, J. C.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Combined structure- and ligand-based virtual screening aiding discovery of selenoglycolicamides as potential multitarget agentes against *Leishmania* species. **Journal of Molecular Structure**, v. 1198, n. 126872, p. 1-12, 2019;

DI GIORGIO, C.; SHIMI, K.; BOYER, G.; DELMAS, F.; GALY, J.-P. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277–1284, 2007;

DOAK, B. C.; NORTON, R. S.; SCANLON, M. J. The ways and means of fragment-based drug design. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 167, p. 28–37, 2016;

Domínguez-Villa, F. X; Durán-Iturbide, N. A.; Ávila-Zárraga, J.G. Synthesis, molecular docking, and in silico ADME/Tox profiling studies of new 1-aryl-5-(3-azidopropyl)indol-4-ones: Potential inhibitors of SARS CoV-2 main protease, **Bioorganic Chemistry**, v. 106, 104497, 2021;

DUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi). **Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas**. Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses. DNDi América Latina. Disponível em https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf acesso em 08 de junho de 2021;

DURÁN-ITURBIDE, N. A.; DÍAZ-EUFRACIO, B. I.; MEDINA-FRANCO, J. L. In Silico ADME/Tox Profiling of Natural Products: A Focus on BIOFACQUIM. **ACS Omega**, v. 5, n. 1, p. 16076–16084, 2020;

EBERLE, C.; LAUBER, B. S.; FANKHAUSER, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DIEDERICH, F. Improved Inhibitors of Trypanothione Reductase by Combination of Motifs: Synthesis, Inhibitory Potency, Binding Mode, and Antiprotozoal Activities. **ChemMedChem**, v.6, n. 2, p. 292–301, 2010;

EMAMI, S., TAVANGAR, P., & KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 241–259, 2017;

ERTL, P. Craig plot 2.0: uma navegação interativa no espaço bioisosteric substituinte. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 8, p.1-6, 2020;

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011;

FIGUEIREDO, K. A.; FIGUEIREDO, J. F. S.; COSTA, R. K. M.; ALVES, M. M. M.; MAGALHÃES, J. L.; CARVALHO, A. L. M.; LIMA, F. C. A. Prospecção de Alvos Bioquímicos para Estudo *in silico* na Quimioterapia Antileishmania. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1485-1501, 2018;

FLORES, G. A.; SANDOVAL PACHECO, C.; SOSA OCHOA, W.; GOMES, C.; ZÚNIGA, C.; CORBETT, C.; LAURENTI, M. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 11, 2020.

FONTE, M.; TASSI, N.; GOMES, P.; TEIXEIRA, C. Acridine-Based Antimalarials From the Very First Synthetic Antimalarial to Recent Developments. **Molecules**, v.26, n. 3: 600, p. 1-18, 2021;

FRANÇA-COSTA J, VAN WEYENBERGH J, BOAVENTURA VS, LUZ NF, MALTA-SANTOS H, OLIVEIRA MC, SANTOS DE CAMPOS DC, SALDANHA AC, DOS-SANTOS WL, BOZZA PT, BARRAL-NETTO M, BARRAL A, COSTA JM, BORGES VM. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n.3, p. 426–435, 2015;

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012;

FRÉZARD, F. J. G. **A caminho da cura da leishmaniose visceral canina**. In: Lipossomas como sistemas carreadores de fármacos para o tratamento da Leishmaniose visceral canina. Brasília, DF: IBICT, Canal Ciência, 2015. Disponível em:

http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmanios_e_visceral_canina.html acesso em 27 de junho 2021.

GABRIEL, A.; VALÉRIO-BOLAS, A.; PALMA-MARQUES, J.; MOURATA-GONÇALVES, P.; RUAS, P.; DIAS-GUERREIRO, T.; SANTOS-GOMES, G. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, n. 1 p. 1-26, 2019;

GERVAZONI, L. F. O.; GONÇALVES-OZÓRIO, D.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. 2'-Hydroxyflavanone activity in vitro and in vivo against wild-type and antimony-resistant *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1-18, 2018;

GONÇALVES, M. D.; BORTOLETI, B. T. S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; ASSOLINI, J. P.; , A. C. M.; CARVALHO, P.G.C.; TUDISCO, E. T.; URBANO, A.; AMBRÓSIO, S. R.; HIROOKA, E. Y.; SIMÃO, A. N. C.; COSTA, I. N.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; ARAKAWA, N. S. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii* exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression. in amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 224–232, 2018;

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; GOES, T. C.; MORAIS, R. C. S.; OLIVEIRA, C. N. C.; LORENA, V. M. B.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1437, p. 1-11, 2017;

GOUVEIA, R. G. Síntese, caracterização estrutural e avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos derivados espiro-acridínicos. 2017. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba. Paraíba, 2017.

GRANO, F. G.; SILVA, J. E. DOS S.; MELO, G. D. DE; MACHADO, G. F. *Leishmania* hide-and-seek: Parasite amastigotes in the choroid plexus of a dog with neurological signs in an endemic municipality in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, n. 100291, p. 1-4, 2019.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010;

GUIMARÃES-E-SILVA, A. S.; SILVA, S.O.; DA SILVA, R. C. R.; PINHEIRO, V. C. S.; REBÊLO, J. M. M.; MELO, M. N. *Leishmania* infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 12, n 8, p.1-19, 2017;

HARGROVE, T. Y.; WAWRZAK, Z.; LIU, J.; NES, W. D.; WATERMAN, M. R.; LEPESHEVA, G. I. Substrate Preferences and Catalytic Parameters Determined by

Structural Characteristics of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. **The journal of biological chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26838–26848, 2011.

HEFNAWY, A.; BERG, M.; DUJARDIN, J. C.; DE MUYLDER, G. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 162-174, 2017.

HOLANDA, V. N.; DA SILVA, W. V.; NASCIMENTO, P. H.; SILVA, S. R. B.; CABRAL FILHO, P. E.; ASSIS, S. P. O.; SILVA, C. A.; OLIVEIRA, R. N.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; LIMA, V. L. M. Antileishmanial effects of 4-phenyl-1-[2-(phthalimido-2-yl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole (PT4) derivative on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*: In silico ADMET, in vitro activity, docking and molecular dynamic simulations. **Bioorganic Chemistry**, v. 1, n. 104437, p. 1-48, 2020;

ISAZA-JAIMES, A.; RODRÍGUEZ, J.E.; CHACÓN, G.; BRAVO, A.; SARABIA, C.S. Una Virsi3n acerca de la Leishmaniasis americanan y de su comportamiento epidemiol3gico. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 37, n. 3, 2018.

JAFARZADEH, A., JAFARZADEH, S., SHARIFI, I., AMINIZADEH, N., NOZARI, P., & NEMATİ, M. The importance of T cell-derived cytokines in post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Cytokine**, 2020;

JAFARZADEH, A.; NEMATİ, M.; SHARIFI, I.; NAIR, A.; SHUKLA, D.; CHAUHAN, P.; KHORRAMDELAZAD, H.; SARKAR, A.; SAHA, B. Leishmania species-dependent functional duality of toll-like receptor. **IUBMB LIFE WILEY**, v. 71 n. 11, 2019;

JAIN, V.; JAIN, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today** v. 23, n. 1, 2018;

JIA, C. Y.; LI, J. Y.; HAO, G. F.; YANG, G. F. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 1, p. 248-258, 2020;

KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, n.1, p.339-367, 2018.

KELLY, P.H.; BAHR, S. M.; SERAFIM, T. D.; AJAMI, N. J.; PETROSINO, J. F.; MENESES, C. KIRBY, J. R.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; WILSONA, M. E. The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. **mBio-American Society for microbiology**, v. 8, n. 1, 2017.

KHATTAB, S. N.; KHALIL, H. H.; BEKHIT, A. A.; ELRAHMAN, M. M. A.; LA TORRE, B. G.; EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. 1,3,5-Triazino Peptide Derivatives: Synthesis, Characterization, and Preliminary Antileishmanial Activity. **ChemMedChem**, v. 13, p.725 – 735, 2018.

KUMAR, A.; SAHA, B.; SINGH, S. Dataset generated for Dissection of mechanisms of Trypanothione Reductase and Tryparedoxin Peroxidase through dynamic network analysis and simulations in leishmaniasis. **Data in Brief**, v. 15, p. 757–769, 2017.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n.1, p. 3–26, 2001;

LISBOA, T.; SILVA, D.; DUARTE, S.; FERREIRA, R.; ANDRADE, C.; LOPES, A.L.; RIBEIRO, J.; FARIAS, D.; MOURA, R.; REIS, M.; MEDEIROS, K.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, v.25, n. 1:64, p. 1-12, 2020;

MAHAJAN, S.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; SINGH, I. P. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 7-arylbenzo[c]acridine-5,6-diones as Potential Anti-Leishmanial and Anti-trypanosomal Agents. **Medicinal Chemistry**, v.14, n.1, p. 563-572, 2018;

MAMIDALA, R.; MAJUMDAR, P.; JHA, K. K.; BATHULA, C.; AGARWAL, R.; CHARY, M. T.; MAJUMDER, H. K.; MUNSHI, P.; SEN, S. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016;

MARTINS, G. A. S.; LIMA, M. D. Leishmaniose: do diagnostico ao tratamento. enciclopédia biosfera, **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.9, N.16; p.2556-2569, 2013;

MELO FILHO, C.C.; BRAGA, R. C.; ANDRADE, C. H. **Estudos de modelagem comparativa da enzima 14 α -esterol desmetilase de *Leishmania major* na busca por novos agentes leishmanicidas**. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/266420286_Estudos_de_modelagem_comparativa_da_enzima_14_a-esterol_desmetilase_de_Leishmania_major_na_busca_por_novos_agentes_leishmanicidas acesso em 26 de junho de 2021;

MINISTÉRIO AS SAÚDE [Internet]. **Leishmaniose visceral: Tratamento** [Atualizado em 2016]. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11335-tratamento> acesso em 08 de junho de 2021;

MIRZAEI, A.; MALEKIC, M.; MASOUMI, E.; MASPI, N. A. historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 45, n. 155297, p. 1-10, 2021;

MIZDAL, C. R., STEFANELLO, S. T., NOGARA, P. A., ANTUNES SOARES, F. A., DE LOURENÇO MARQUES, L., & DE CAMPOS, M. M. A. Molecular docking, and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides on *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 393-400, 2018;

MOREIRA, D. S.; PESCHER, P.; LAURENT, C.; LENORMAND, P.; SPATH, G. F.; MURTA, S. M. F. Phosphoproteomic analysis of wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* lines by 2D-DIGE technology. **Proteomics**, v. 15, p.2999–3019, 2015;

MWENECHANYA, R.; KOVÁŘOVÁ, J.; DICKENS, N. J.; MUDALIAR, M.; HERZYK, P.; VINCENT, I. M.; WEIDT, S. K.; BURGESS, K. E.; BURCHMORE, R. J. S.; POUNTAIN, A. W.; SMITH, T. K.; CREEK, D. J.; KIM, D.H.; LEPESHEVA, G. I.; BARRETT, M. P. Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p.1-21, 2017;

NOWAK, K. Chemical structures and biological activities of bis- and tetrakis-acridine derivatives: A review. **Journal of Molecular Structure**, v. 1146, p. 562–570, 2017;

OLIVEIRA, V. V. G.; SOUZA, M. A. A.; CAVALCANTI, R. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; LEITE, A. C. L.; SILVA JUNIOR, V. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, n.1, p. 414-421, 2020;

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**, v. 1, n. 6, p. 1-7, 2018;

ORTALLI, M., ILARI, A., COLOTTI, G., DE IONNA, I., BATTISTA, T., BISI, A., GOBBI, S.; RAMPA, A.; DI MARTINO, R.M.C.; GENTILOMI, G.A.; VARANI, S.; BELLUTI, F. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 152, p. 527–541, 2018;

PAIXÃO, V. G.; PITA, S. S. R. Triagem Virtual Aplicada na Busca de Inibidores da Tripanotona Redutase de *Trypanosoma cruzi* Utilizando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (NatProDB). **Revista. Virtual Quimica**, v. 8, n.5, p.1289-1310, 2016;

PANDEY, R. K.; SHARMA, D.; BHATT, T. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Developing imidazole analogues as potential inhibitor for *Leishmania donovani* trypanothione reductase: virtual screening, molecular docking, dynamics and ADMET approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, V. 33, n. 12, p.2541–2553, 2015;

PASSALACQUA, T. G. **Efeito de compostos ciclopaldados em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*** [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2018;

PATINO, L. H.; MUSKUS, C.; RAMÍREZ, J. D. Transcriptional responses of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the presence of trivalent sodium stibogluconate. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 348, p. 1-15, 2019;

PETRI E SILVA, S. C. S., PALACE-BERL, F., TAVARES, L. C., SOARES, S. R. C., & LINDOSO, J. A. L. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, v.163, p.68–75, 2016;

PINHEIRO-SEGUNDO, M. A. S. Desenvolvimento, avaliação preliminar da atividade antiproliferativa e incremento de solubilidade de novos derivados espiro-acridínicos. **Tese** (Doutorado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 180f. 2020.

RABELO, V. W.; SANTOS, T. F.; TERRA, L.; SANTANA, M.V.; CASTRO, H.C.; RODRIGUES, C.R.; ABREU, P.A. Targeting CYP51 for drug design by the contributions of molecular modeling. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, v. 31, n.1, p.37-53, 2016;

RANG, RANG.; RITTER, J.M.; ROD J. FLOWER.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. 8ed. Elsevier Brasil, 2016;

RODRIGUES, K. A.; DIAS, C. N.; NÉRIS, P. L.; ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A.; KEESSEN, T. S.; OLIVEIRA, T. B.; LIMA, M. C.; BALLIANO, T. L.; AQUINO, T. M.; MOURA, R. O.; MENDONÇA JUNIOR, F. J.; OLIVEIRA, M. R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1–14, 2015;

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012;

RODRIGUES, R. R. L.; NUNES, T. A. L.; ARAÚJO, A. R.; MARINHO FILHO, J. D. B.; SILVA, M. V.; CARVALHO, F. A. A.; PESSOA, O. D. L.; FREITAS, H. P. S.; RODRIGUES, K. A. F.; ARAÚJO, A. J. Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **International Immunopharmacology**, v. 90, n. 107124, p. 1-9, 2021;

ROMERO, A. H; LOPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalaziny-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2017;

ROSTAMI MN, KHAMESIPOUR A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**, v. 210, n. 2-3, p. 81-100, 2021.

SANTANA, F. R.; DALBONI, L. C.; NASCIMENTO, K.F.; KONNO, F.T.; ALVARES-SARAIVA, A. M.; CORREIA, M. S. F.; BOMFIM, M. D. C.; CASARIN, R. C. V.; PEREZ, E. C.; LALLO, M. A. PERES, G. B.; LAURENTI, M. D.; BENITES, N. R.; BUCHI, D. F.; BONAMIN, L. V. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage – *Leishmania (L.) amazonensis* interaction in vitro. **Cytokine**, v. 92, n. 1, p. 33–47, 2017;

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Um a revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. 1-11, 2021;

SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 110-115, 2018;

SANTOS-PEREIRA, S.; CARDOSO, F. O.; CALABRESE, K. S.; ZAVERUCHA DO VALLE, T. *Leishmania amazonensis* resistance in murine macrophages: Analysis of possible mechanisms. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. 1-16, 2019;

SCHÖNING, V.; HAMMANN, F. How far have decision tree models come for data mining in drug discovery? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p.1067-1069, 2018;

SCOTTI, L.; ISHIKI, H.; MENDONÇA JÚNIOR, F.J.; DA SILVA, M.S.; SCOTTI, M.T. In-silico analyses of natural products on *Leishmania* enzyme targets. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.15, p. 253–269, 2015;

SERAFIM V.L.; FÉLIX, M.B.; SILVA, D.K.F.; RODRIGUES, K.A.F.; ANDRADE, P.N.; ALMEIDA, S.M.V.; SANTOS, S.A.; OLIVEIRA, J.F.; LIMA, M.C.A.; MENDONÇA-JÚNIOR, F.J.B.; SCOTTI, M.T.; OLIVEIRA, M.R.; MOURA, R.O. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 6, p. 1141-1155, 2018;

SILVA, A. C.; SANTOS, T.A.R.; SILVA, I.V.B.; OLIVEIRA, M.V.G.; MOREIRA, D.R.M.; LEITE, A.C.L.; PEREIRA, V.R.A. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Experimental Parasitology**, 2017;

SILVA, J. M. da. Planejamento e desenvolvimento de novos derivados acridínicos, quinolínicos, indólicos e piridínicos com potencial atividade antitumoral. 2018. 211f. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018;

SINGH, S.; KUMARI, E.; BHARDWAJ, R.; KUMAR, R.; DUBEY, V. K. Molecular events leading to death of *Leishmania donovani* under spermidine starvation after hypericin treatment. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 962-971, 2017;

TAHGHIGHI, A.; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; ASADPOUR ZEYNALI, K.; FOROUMADI, A.; DASTMALCHI, S. QSAR e estudos de ancoragem dos análogos (5-nitro-heteroaril-1,3,4-tiadiazole-2-il) piperazinil com atividade antileishmanial. **Journal of Chemometrics**, v. 30, p. 284-293, 2016.

TEJERÍA, A.; PEREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M.; BALÁNA-FOUCE, R.; ALONSO, C.; FUERTES, M.; GONZALEZ, M.; RUBIALES, G.; PALACIOS, F.

Antileishmanial effect of new indeno-1,5-naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infantum* type IB DNA topoisomerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, n.1, p. 740-749, 2016;

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; BORTOLETI, B. T. S.; ASSOLINI, J. P.; GONÇALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; CONCHON-COSTA, I.; BORDIGNON, J.; PAVANELLI, W. R. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons, **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2529, p. 1-12, 2018;

TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drugdesign. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 1006-1011, 1972;

TRISTÃO, F. S. M.; ROCHA, F. A.; CARLOS, D.; KETELUT-CARNEIRO, N.; SOUZA, C. O. S.; MILANEZI, C. M.; SILVA, J. S. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma Formation during experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in immunology**, v.8, n. 949, p.1-13, 2017;

VARGAS, J. A. R.; LOPEZ, A. G.; FROEYEN, M.; PIÑOL, M. C. Molecular docking study on the interaction between 2-substituted- 4,5-difuryl Imidazoles with different Protein Target for antileishmanial activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n.X, p. 1-10, 2017;

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002;

WARFIELD, J.; SETZER, W. N.; OGUNGBE, I. V. Interactions of antiparasitic sterols with sterol 14 α -demethylase (CYP51) of human pathogens. **SpringerPlus**, V. 3, n.1, p. 1-12, 2014;

XAVIER, K. M. O.; PUSTER, R. A.; BATISTA, H. M. T.; RODRIGUES, J. L. N. Treatment of american tegumentary leishmaniosis with fluconazole: case report. **Amadeus International Multidisciplinary Journal**, v. 5, n. 9, p. 294–301, 2020;

ZAHEERA, Z.; KHANA, F. A.K.; SANGSHETTIA, J.N.; PATILB, R.H. Efficient one-pot synthesis, molecular docking and in silico ADME prediction of bis-(4-hydroxycoumarin-3- yl) methane derivatives as antileishmanial agents. **Excli Journal**, v.14, p. 935-947, 2015.