



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**VANESSA NUNES DOS SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA, CITOTOXICIDADE E  
CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVAS PIRIDINAS TIAZÓIS**

**RECIFE**

**2021**

**VANESSA NUNES DOS SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA, CITOTOXICIDADE E  
CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVAS PIRIDINAS TIAZÓIS**

**Dissertação apresentada ao programa de  
pós-graduação em Inovação Terapêutica  
da Universidade Federal de Pernambuco,  
para obtenção do título de mestre em  
Inovação Terapêutica.**

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

**Coorientadoras:** Dra. Aline Caroline da Silva Santos

Dra. Valéria Pereira Hernandez

**RECIFE**

**2021**

Catálogo na Fonte:  
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Silva, Vanessa Nunes dos Santos

Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida, citotoxicidade e capacidade imunomoduladora de novas piridinas tiazóis / Vanessa Nunes dos Santos Silva – 2021.

112 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Carolina Aciolly Brelaz de Castro

Coorientadoras: Aline Caroline da Silva Santos e Valéria Pereira  
Hernandes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica,  
Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Leishmaniose 2. Tiazóis 3. Testes de toxicidade I. Castro, Maria Carolina Aciolly Brelaz de (orient.) II. Santos, Aline Caroline da Silva (coorient.) III. Hernandez, Valéria Pereira (coorient.) IV. Título

616.9364

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-310

**VANESSA NUNES DOS SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA, CITOTOXICIDADE E  
CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVAS PIRIDINAS TIAZÓIS**

**BANCA EXAMINADORA**

Aprovada em: 18 / 08 / 21

---

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pinto  
Membro Titular (Examinadora Interna)

---

Dra. Elis Dionísio da Silva  
Membro Titular (Examinadora Externa)

---

Prof. Dr. Rafael de Freitas e Silva  
Membro Titular (Examinador Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de chegar até aqui, tudo na vida tem um propósito, este com certeza é mais um deles a qual ele me permitiu viver. Obrigada meu Deus!

Agradeço a minha família, em especial minha mãe que é a meu ponto de apoio, minha grande amiga que sempre me deu todo incentivo para seguir meu caminho por onde eu escolhesse ir.

Ao meu amado esposo, Micael. Obrigada por todo cuidado e amor comigo, ainda mais agora nesta reta final com nossa filha amada no forninho! Com certeza esse processo teria sido muito mais difícil se não fosse sua dedicação e companheirismo, você mais do que ninguém faz parte disso tudo.

A minha orientadora, Maria Carolina, agradeço a Deus pela sua vida! Meu muito obrigado de coração por me dar esta oportunidade, por todo conhecimento passado a mim e por contribuir para meu desenvolvimento profissional e como pessoa também. A senhora com certeza é uma inspiração para mim!

A minha coorientadora, Valéria Pereira, por ser esta pessoa paciente e acolhedora, pela oportunidade em participar de seu grupo de pesquisa e por toda contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha segunda coorientadora, Aline Caroline, pela oportunidade em estar aprendendo todo dia com você, por me ajudar todas as vezes que precisei com todos os experimentos e protocolos no dia a dia do laboratório.

As minhas amigas, parceiras de graduação Gerlane, Glória, Gleyce, Karina e Wanuza por sempre estarem comigo pelo incentivo desde os tempos da faculdade para chegar até aqui. Ufaa! Consegui meninas! Vocês também fazem parte disto.

Aos amigos que fiz nessa jornada no laboratório do Aggeu, Ana Catarina, Allana, Elis, Marton, Mayara e Lucas. Obrigada a todos vocês, pelas ajudas no dia a dia, todos sempre dispostos a me ensinar quando precisei, obrigada pelas inúmeras conversas, risadas, lanchinhos... Vocês contribuíram para que os dias fossem mais leves e com certeza levarei cada um de vocês comigo.

Agradeço em especial a uma amiga que fiz neste caminho, Allana Maria, tem pessoas que acredito que Deus sabe que os caminhos têm que se cruzar, acho que foi assim com a gente! Obrigada pela amizade construída nesse tempo, por todo apoio e as quase sessões de terapia via áudios do WhatsApp. Haha!

Em especial também agradeço aos meus amigos Marton e Ana Catarina, pela amizade e por todo acolhimento desde meu primeiro dia no laboratório me ensinando tudo sempre que possível e pelas ajudas com os experimentos.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda infraestrutura e equipamentos utilizados para execução deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - (Facepe), pela concessão da bolsa que contribuiu para desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que porventura não citei aqui, mas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

“Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas.

A ele seja a glória para sempre! Amém.”

Romanos 11:36

## RESUMO

SILVA, V. N. S. **AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA, CITOTOXICIDADE E CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DE NOVAS PIRIDINAS TIAZÓIS** DISSERTAÇÃO (MESTRADO). UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, PERNAMBUCO, BRASIL, 2021.

As leishmanioses são doenças negligenciadas causada por diversas espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Afetam milhões de pessoas em todo mundo, sendo consideradas um grave problema de saúde pública. O tratamento existente apresenta alta toxicidade, diversos efeitos colaterais e casos de resistência, tornando evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida, a citotoxicidade e a capacidade imunomoduladora de novas piridinas tiazóis. Testes *in vitro* foram realizados com nove compostos, para investigar a atividade leishmanicida sobre diferentes formas evolutivas promastigotas e amastigotas selvagens e transgênicas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. A atividade citotóxica foi avaliada sobre esplenócitos murinos, células HepG2 e RAW264.7. O potencial imunomodulador foi avaliado mediante a dosagem da produção de Óxido nítrico (ON) em macrófagos J774 e a dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de esplenócitos murinos por meio do kit CBA. Sobre a atividade leishmanicida para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, os compostos que apresentaram melhores valores de IC<sub>50</sub> para as duas espécies, considerando as cepas selvagens e transgênicas foram, respectivamente: 3a (7.38 µM, 1.01 µM) (8.59 µM), 3g (3.74 µM, 4.54 µM) (7.40 µM, 6.71 µM) e 4e (3.28 µM / 1.67µM) (6.25 µM, 6.80 µM), quando comparado a miltefosina (15,80 µM, 8,42 µM) e (26,44 µM, 38,20 µM). Os compostos não apresentaram inibição de crescimento quando as formas amastigotas foram avaliadas. Foi possível observar que os compostos mostraram ser menos tóxicos frente as células HepG2 em relação a miltefosina, droga de referência. Para as células esplênicas apenas compostos 4h e 4m se destacaram em relação a miltefosina, enquanto para os macrófagos RAW 264.7 apenas o 3a mostrou-se ser menos tóxico. Não foi observada a produção de ON induzido pelos compostos. Quanto a produção de citocinas observou-se a indução de citocinas relacionadas ao perfil Th1 (TNF, IFN-γ e IL-6) que desempenham papel importante para resolução da doença. De acordo com os resultados obtidos os compostos 3a, 3g e 4e se destacaram entre os demais como potenciais candidatos a novos fármacos, apresentando atividades leishmanicidas relevantes frente as promastigotas, bons índices de seletividade e pouca toxicidade. Além disso, eles induziram citocinas importantes que compõem um perfil de resposta imunológica Th1, associado ao combate da infecção. Dessa maneira os compostos 3a, 3g e 4e apresentam-se como promissores nos estudos de novas drogas para o tratamento das leishmanioses.

**Palavras-chave:** Leishmanioses; Compostos sintéticos; Tiazóis Piridina; Imunomodulação.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected diseases caused by several species of flagellate protozoa of the genus *Leishmania*. They affect millions of people worldwide and are considered a serious public health problem. The existing treatment presents high toxicity, several side effects, and cases of resistance, making evident the need for new therapeutic approaches. Thus, the objective of this study was to evaluate the leishmanicidal activity, cytotoxicity, and immunomodulatory capacity of new thiazole pyridines. *In vitro* tests were performed with nine compounds to investigate the leishmanicidal activity on different wild and transgenic promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*. The cytotoxic activity was evaluated on murine splenocytes, HepG2 cells and RAW264.7 cells. The immunomodulatory potential was evaluated by dosage of Nitric Oxide (NO) production in J774 macrophages and dosage of cytokines in culture supernatants of murine splenocyte cultures using the CBA kit. Regarding the leishmanicidal activity for promastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum*, the compounds that showed the best IC50 values for both species, considering the wild and transgenic strains were, respectively: 3a (7.38  $\mu$ M, 1.01  $\mu$ M) (8.59  $\mu$ M), 3g (3.74  $\mu$ M, 4.54  $\mu$ M) (7.40  $\mu$ M, 6.71  $\mu$ M) and 4e (3.28  $\mu$ M / 1.67 $\mu$ M) (6.25  $\mu$ M, 6.80  $\mu$ M), when compared to miltefosine (15.80  $\mu$ M, 8.42  $\mu$ M) and (26.44  $\mu$ M, 38.20  $\mu$ M). The compounds did not inhibit amastigote growth. It was possible to observe that the compounds proved to be less toxic against HepG2 cells compared to miltefosine, the reference drug. For splenic cells only compounds 4h and 4m stood out in relation to miltefosine, while for RAW 264.7 macrophages only 3a proved to be less toxic. No NO production induced by the compounds was observed. Furthermore, we observed the induction of cytokines related to the Th1 profile (TNF, IFN- $\gamma$  and IL-6), which play an important role in the resolution of the disease. According to the results obtained, compounds 3a, 3g and 4e stood out among the others as potential candidates for new drugs, presenting relevant leishmanicidal activities against promastigotes, good levels of selectivity and low toxicity. Also, they induced important cytokines that compose a Th1 immune response that helps fight infection. Therefore, compounds 3a, 3g and 4e present themselves as promising in studies of new drugs for the treatment of Leishmaniasis.

**Keywords:** Leishmaniasis; Synthetic compounds; Pyridine thiazoles; Immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Distribuição mundial de casos reportados da Leishmaniose tegumentar .....	<b>19</b>
<b>Figura 2 -</b>	Distribuição mundial de casos reportados da Leishmaniose Visceral .....	<b>20</b>
<b>Figura 3 -</b>	Espécies do gênero <i>Leishmania</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 4 -</b>	Formas evolutivas das espécies de <i>Leishmania</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 5 -</b>	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. ....	<b>24</b>
<b>Figura 6 -</b>	Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar .....	<b>26</b>
<b>Figura 7 -</b>	Formas Clínicas da Leishmaniose Visceral .....	<b>27</b>
<b>Figura 8 -</b>	Esquema representativo da ativação de células da resposta imune inata e adaptativa que influenciam na eliminação ou sobrevivência do patógeno .....	<b>32</b>
<b>Figura 9 -</b>	Representação da estrutura química do Tiazol .....	<b>39</b>
<b>Figura 10 -</b>	Representação da estrutura química da Piridina .....	<b>39</b>
<b>Figura 11 -</b>	Rota sintética para obtenção da piridil-1,3-tiazóis e seus substituintes .....	<b>43</b>
<b>Figura 12 -</b>	Estruturas químicas e pesos moleculares da nova classe de compost piridil-1,3-tiazóis .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Perfil do Produto- alvo para o desenvolvimento de novas drogas no combate das Leishmanioses .....	<b>37</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Atividade leishmanicida – IC50 em $\mu\text{M}$ de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas selvagens de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	<b>51</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Atividade leishmanicida – IC50 em $\mu\text{g/ml}$ e $\mu\text{M}$ de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas e amastigotas transgênicas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	<b>53</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Atividade citotóxica – CC50 em $\mu\text{M}$ de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis série frente a células esplênicas, RAW 264.7 e HepG2 .....	<b>54</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota selvagens de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis .....	<b>55</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota transgênica de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis .....	<b>55</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Índice de Seletividade (IS) para a forma amastigota transgênica de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis .....	<b>56</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Indução da produção da citocina TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$ pelos compostos nos tempos de 24h, 48h, 72h e 6 dias .....	<b>58</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
CBA	Cytometric Bead Array
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para 50% das células
ConA	Concanavalina A
CPRG	Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranósido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (Do inglês <i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i> )
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Do inglês Enzyme-linked Immunosorbent assay)
IC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IS	Índice de seletividade
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano glicolípídico
LPQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
M1	Macrófagos classicamente ativado do tipo M1
M2	Macrófagos classicamente ativado do tipo M2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTT	brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bifenil tetrazolium)
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NOX2	Intermediários reativos do oxigênio NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	Reação em cadeia de polimerase
PRR's	Receptores de reconhecimento de padrão (Do inglês <i>Pattern Recognition Receivers's</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sb <sup>+3</sup>	Antimonial trivalente
Sb <sup>+5</sup>	Antimonial pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
TGF - $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
Th	Linfócito T auxiliar (Do inglês <i>T helper</i> )
TNF	Fator de Necrose Tumoral ( <i>Tumor necrosis fator</i> )
TPP	Perfil do Produto Alvo (Do inglês <i>Target Product Profile</i> )
$\beta$ -gal	Enzima $\beta$ -galactosidase
$\mu$ M	Micro Molar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais e epidemiológicos da Leishmania e das Leishmanioses</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Formas clínicas da Leishmaniose tegumentar e visceral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose tegumentar e visceral</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Aspectos imunológicos</b> .....	<b>29</b>
2.4.1	Imunidade inata .....	29
2.4.2	Imunidade adaptativa .....	30
<b>2.5</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Desafio no estudo de novos compostos</b> .....	<b>36</b>
<b>2.7</b>	<b>Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas</b> .....	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
4.1	Geral .....	42
4.2	Específicos .....	42
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Compostos Sintético</b> .....	<b>43</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da atividade leishmanicida</b> .....	<b>46</b>
5.2.1	Promastigotas .....	46
5.2.2	Amastigotas .....	47
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da atividade citotóxica</b> .....	<b>48</b>
5.3.1	Obtenção de esplenócitos murinos .....	48
5.3.2	Avaliação da citotoxicidade sobre células esplênicas, macrófagos RAW 264.7 e células hepáticas HepG2 .....	48
<b>5.4</b>	<b>Obtenção de sobrenadante de cultura para quantificação da produção de citocinas</b> .....	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Dosagem de citocinas por citometria de fluxo</b> .....	<b>49</b>
<b>5.6</b>	<b>Dosagem de Óxido Nítrico (ON)</b> .....	<b>49</b>
<b>5.7</b>	<b>Considerações Éticas</b> .....	<b>50</b>
<b>5.8</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>50</b>

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação da atividade leishmanicida</b> .....	<b>51</b>
6.1.1	Avaliação dos compostos sobre as formas selvagens de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	<b>51</b>
6.1.2	Avaliação dos compostos sobre cepas transgênica de promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> ....	<b>52</b>
<b>6.2</b>	<b>Avaliação da atividade citotóxica</b> .....	<b>53</b>
6.2.1	Células Esplênicas .....	<b>53</b>
6.2.2	Células de linhagem Hepática (HepG2) .....	<b>53</b>
6.2.3	Células de linhagem macrófaga (RAW 264.7) .....	<b>54</b>
<b>6.3</b>	<b>Índice de Seletividade (IS)</b> .....	<b>54</b>
<b>6.4</b>	<b>Produção de óxido nítrico (ON)</b> .....	<b>56</b>
<b>6.5</b>	<b>Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura por citometria de fluxo</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
	<b>APÊNDICE A – Artigo de opinião SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL OF TROPICAL PATHOLOGY E COMPROVANTE DE SUBMISSÃO</b> .....	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE B – Artigo em Preparação</b> .....	<b>90</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética</b> .....	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças presentes em cerca de 102 países. É uma doença com 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes registradas a cada ano (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Além disso, o número de pessoas residindo em áreas endêmicas, consideradas de risco eminente de transmissão, é de cerca de 1,0 bilhão de indivíduos, o que torna a doença ainda mais preocupante (WHO, 2020). Esses dados alertam ainda que pode haver muitos casos subnotificados. Quando consideramos o Brasil, esse tem uma incidência de aproximadamente 28 mil casos por ano (SANTOS, 2017) acometendo principalmente as populações com perfis de baixas condições sociais (BRASIL, 2017a; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

A doença é causada por diversas espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* transmitida ao homem através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas, podendo desenvolver-se nas formas clínicas cutânea e visceral, que varia de acordo com a espécie do parasita e em dependência da resposta imune do hospedeiro. De acordo com sua evolução, a doença pode trazer sérios riscos à saúde do indivíduo (GURUNG; KANNEGANTI, 2015; SANTOS, 2017; SANTOS et al., 2020).

Medidas de controle são necessárias para que haja uma diminuição no números de casos, dentre elas as principais são: controle de insetos vetores e reservatórios, diagnóstico precoce e tratamento para os casos humanos (DA SILVA et al., 2017a). Em geral, o tratamento para as leishmanioses é através do uso de antimoniais pentavalentes, usados há cerca de 70 anos. Essas drogas atuam em vias bioenergéticas da forma intracelular infectiva do parasita (GONTIJO, 2003). Esse tratamento, no entanto, apresenta alto custo, alta toxicidade e requer diversas doses para atingir a concentração terapêutica efetiva (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). Isso pode acarretar a desistência do tratamento por parte do paciente e o surgimento de cepas resistentes (MEHEUS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Um dos grandes desafios no tratamento dessas enfermidades é o estudo e descoberta de fármacos mais seletivos ao parasita e menos tóxicos ao indivíduo infectado. As falhas encontradas no tratamento atual trazem a necessidade de busca por novas estratégias medicamentosa que visem eficácia no controle da doença. Uma das formas de melhoramento pode ser na mudança de seus constituintes químicos

utilizados na síntese dos fármacos, e no desenvolvimento das terapias associadas na modulação sistema imune do hospedeiro, já que ele tem papel importante no desenvolvimento da doença (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A resposta imunológica executa um importante papel na progressão de cura e no percurso de desenvolvimento da doença. Estudos relatam o papel das respostas imunes mediadas por células T nesta doença, com citocinas associadas a um perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12) levando a ativação de macrófagos e morte do parasita, e funcionando como uma imunidade protetora, e a produção de citocinas Th2 (IL-4, IL 5 e IL-10) ocasionando a evolução da doença com a replicação e persistência do parasito(DAYAKAR et al., 2019; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Sendo assim, é importante considerar essa resposta no desenvolvimento de novos fármacos.

Derivados tiazóis heterocíclicos são considerados uma estrutura privilegiada na química medicinal. Apresentam potencial interação com diferentes alvos biológicos e atividade como: anticâncer, antibacteriana (BONDOCK; KHALIFA; FADDA, 2007; DE SANTANA et al., 2018) e antiparasitária, demonstrada *in vitro* (DE MORAES GOMES et al., 2016) especialmente contra o *Trypanosoma cruzi*. Da mesma forma, os derivativos de piridina mostraram ser agentes potentes anti-*T. cruzi* (DIAS et al., 2007; LESSA et al., 2011). As leishmanias fazem parte da mesma família (*Trypanosomatidae*) do *T. cruzi*.

Estudos têm obtido êxito no processo inicial de identificação de diferentes novos compostos líderes derivados de piridina e tiazóis (CARDOSO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017b). Sendo assim, este estudo avaliou a atividade leishmanicida e o potencial citotóxico e imunomodulador *in vitro*, de nove novos derivados piridina tiazóis, na busca por novos protótipos competentes a fármacos leishmanicidas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

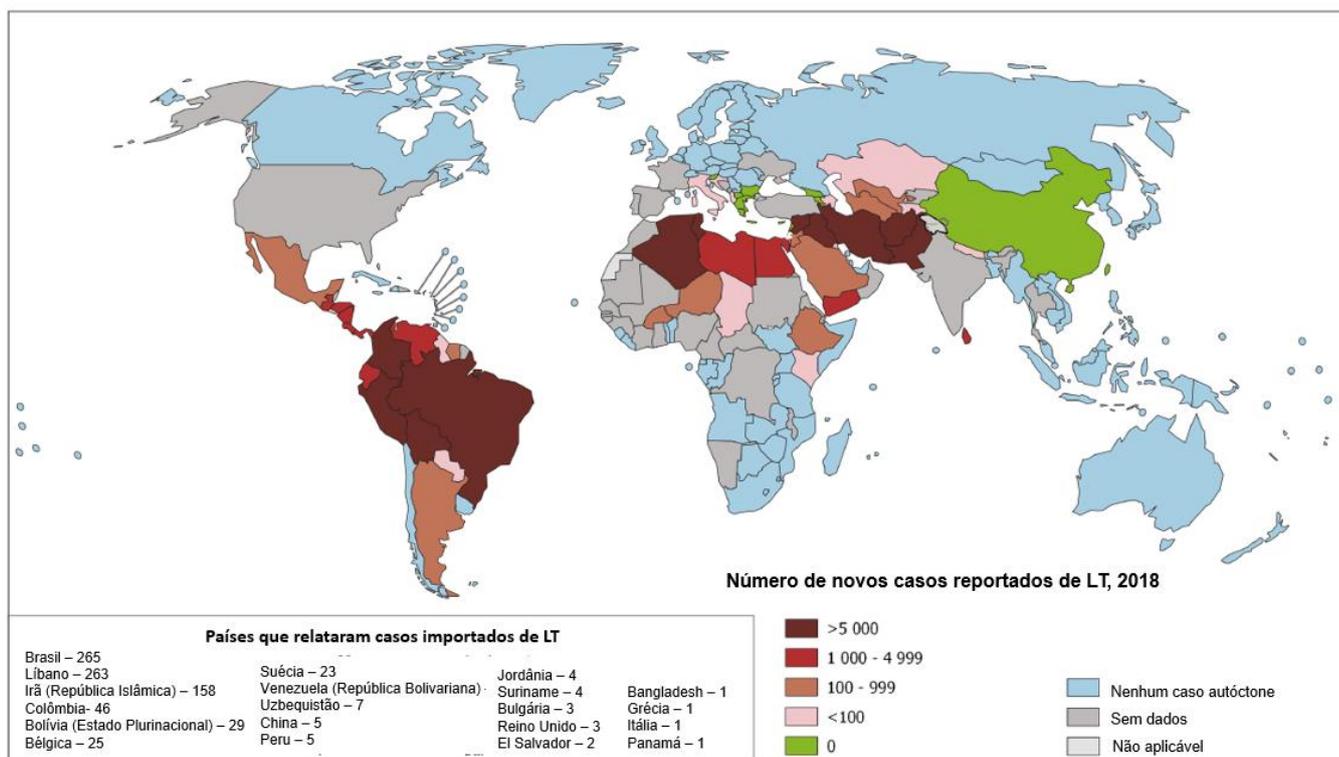
### 2.1 Aspectos gerais e epidemiológicos da *Leishmania* e das Leishmanioses

A leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, causadas por um grupo de espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. São parasitos que se desenvolvem nas células do sistema fagocítico mononuclear do indivíduo infectado. As formas clínicas da parasitose se desenvolvem a partir da relação entre as espécies do parasito e a resposta imune do hospedeiro, podendo ser classificada em leishmaniose tegumentar (LT), que se subdivide em um espectro de formas clínicas e a forma visceral (LV), esta última considerada a forma mais grave da doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Atualmente estas encontram-se amplamente distribuída em todo mundo, concentrando-se principalmente em quatro continentes: Américas, Europa, África e Ásia. É uma doença que está presente em cerca de 102 países, com 350 milhões de pessoas com risco de contrair a infecção. Anualmente há uma média entre 20.000 e 30.000 mortes ocorrendo, afetando principalmente as populações de vulneráveis condições sociais. Dessa maneira, caracteriza-se como um grave problema de saúde pública (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019; WHO, 2020).

Em relação a LT, os dados epidemiológicos mostram que os casos estão mundialmente distribuídos (figura 1), com uma estimativa de 0,7 a 1,2 milhões de casos. Dentre estes casos, destaca-se o continente Americano, grande representante destes números, possuindo registros desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e do Uruguai (BRASIL, 2017A).

**Figura 1- Distribuição mundial de casos reportados da leishmaniose tegumentar**



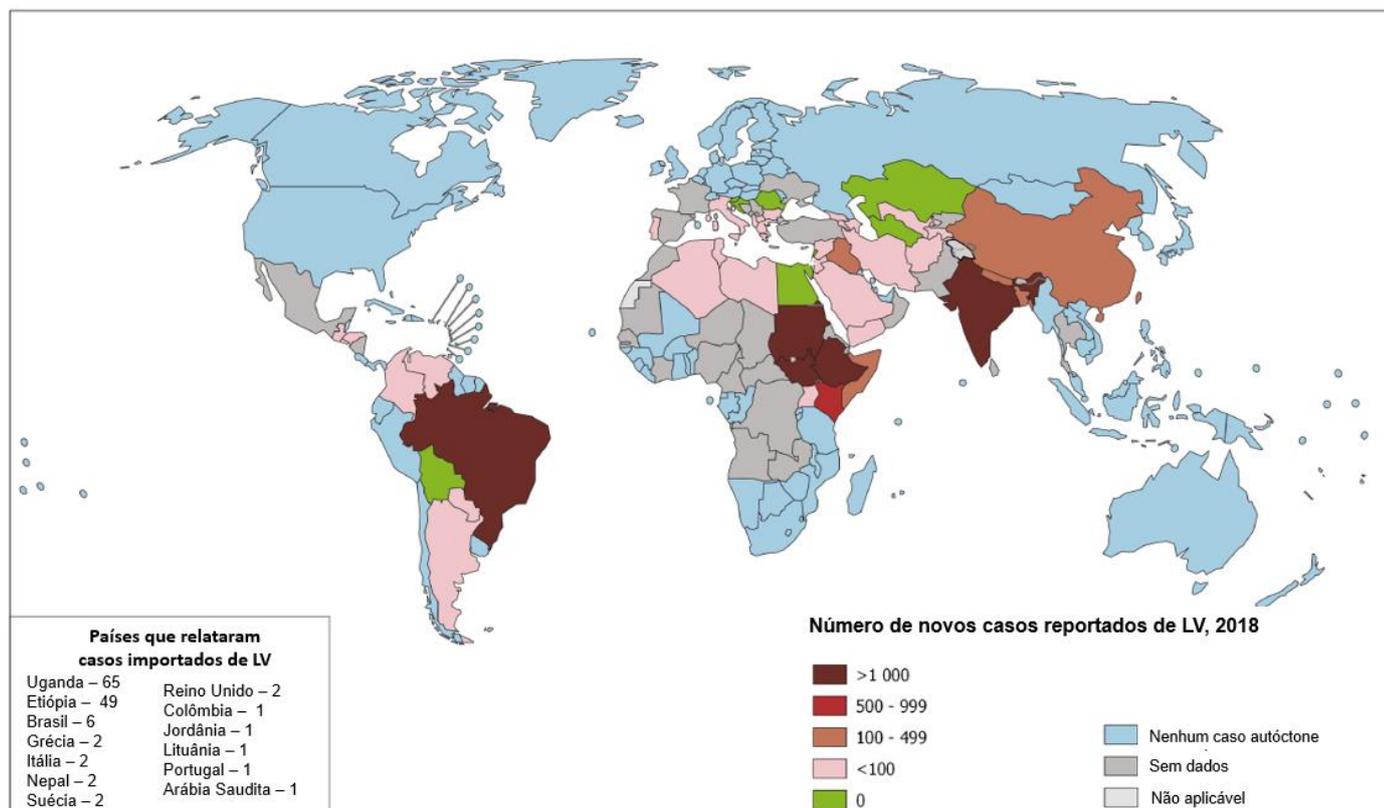
Fonte: WHO (2018)

No Brasil, existem casos de LTA em todas as regiões do país e, segundo o Ministério da Saúde, entre 2003 e 2018 foram registrados mais de 300.000 casos, com uma média de 21.158 casos por ano. Isso evidencia ainda mais o grande problema de saúde pública que esta parasitose representa. Destaca-se neste cenário as regiões Norte e Nordeste, com grande prevalência nestes números. Isto pode estar associado ao fato dessas regiões possuírem extensas áreas de mata atlântica, locais estes que apresenta uma grande diversidade de vetores e reservatórios com diferentes padrões de transmissão (JÚNIOR et al., 2019; BRITO et al., 2015).

Com relação a LV, também é observado uma elevada distribuição do número de casos por todo mundo (figura 2) e surtos recorrentes vem acontecendo pela África oriental ocasionando alta morbidade e mortalidade nestas regiões. Isso destaca esta forma clínica da doença, tendo em vista à alta letalidade que é observada em indivíduos imunocomprometidos e os casos de coinfeção com HIV. O dados epidemiológicos sugerem que há uma incidência de cerca 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV no mundo, mas grande maioria dos casos ocorrem em áreas rurais e suburbanas de seis países principalmente, são eles: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia,

Sudão e Sudão do Sul (JÚNIOR et al., 2019; OKWOR; UZONNA, 2016; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

**Figura 2 - Distribuição mundial de casos reportados da Leishmaniose Visceral**



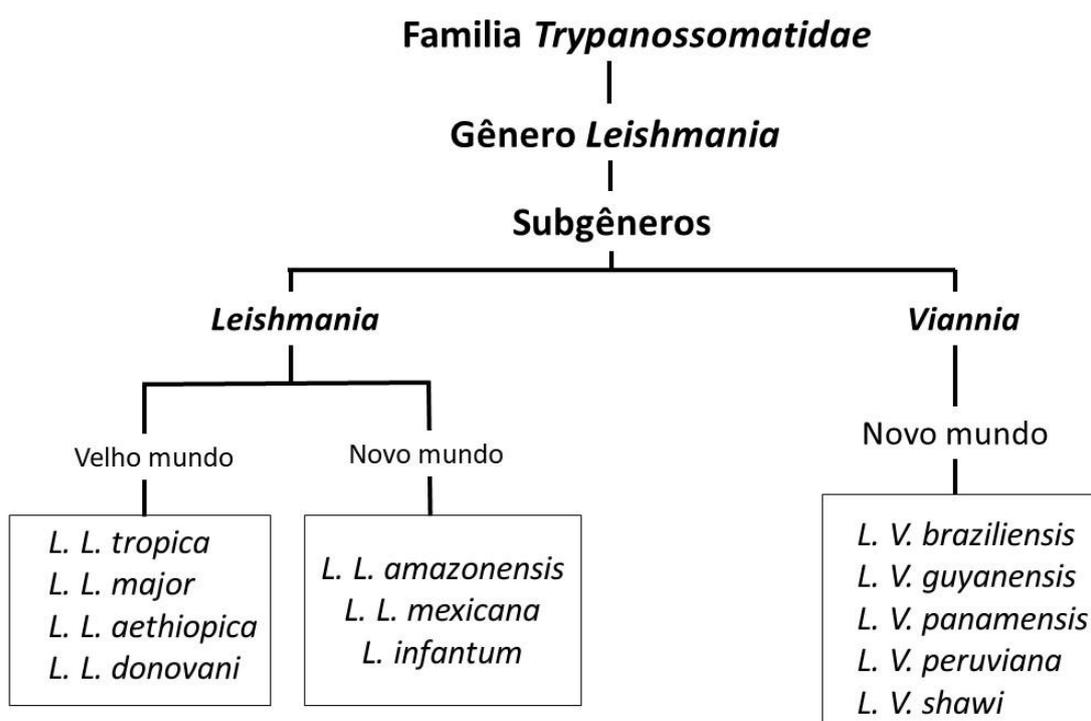
Fonte: WHO (2018)

No Brasil, os registros no número de casos de LV está restrito principalmente as áreas rurais com poucas regiões urbanas, porém ao longo dos últimos anos a doença vem se expandindo também para os grandes centros. Atualmente, todas as regiões do país confirmam casos anualmente, principalmente as regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-oeste. Os últimos dados mostram que esta ascendência no número de casos se deu principalmente pela periurbanização e urbanização da doença, cenário que está fortemente relacionado ao fluxo migratório de pessoas entre essas regiões e as mudanças ambientais que modificam o ecossistema (AGUIAR, 2017; BRASIL, 2017; SILVA et al. 2019).

O agente etiológico causador das leishmanioses é representado por diversas espécies pertencentes a família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*, sendo ainda subdivididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Figura 3). O agrupamento destas espécies a estes subgêneros é de acordo com a localização de

seu desenvolvimento no inseto vetor, sendo as espécies do subgênero *Leishmania*, aquelas que se desenvolvem na secção peripilária, ou seja, no intestino posterior, e as espécies do subgênero *Viannia* são aquelas que se desenvolvem na secção suprapilária, sendo esta a região anterior do intestino do hospedeiro invertebrado. A localização geográfica destes vetores e as espécies de *Leishmania* os classificam também em espécies do velho e novo mundo, conforme observado na figura 3 (LAINSON, 2010; PISCOPO; AZZOPARDI, 2007).

Figura 3 - Espécies do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de BATES, 2007.

Há uma diversidade de espécies que este gênero apresenta, mas apenas cerca de 22 são capazes infectar os seres humanos e outros animais. No Brasil, três espécies são consideradas principais para o desenvolvimento da forma tegumentar: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Já a *L. (L.) infantum* é a causadora da forma visceral (BRASIL, 2017a; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

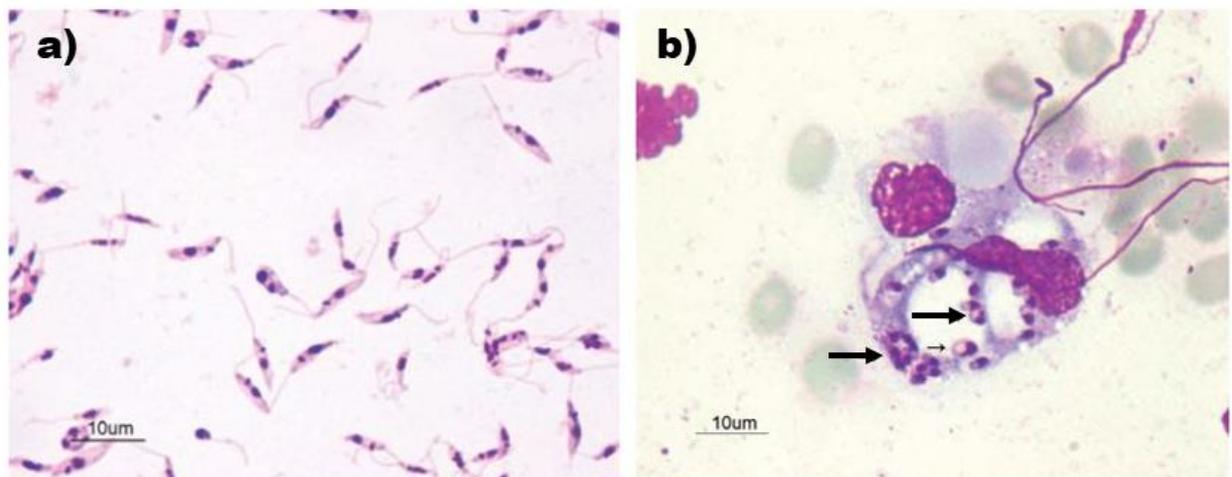
A transmissão do parasito ao homem ocorre principalmente através da picada de insetos flebotomíneos, dípteros hematófagos, especificamente as fêmeas pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, que também assim como o gênero *Leishmania*,

apresenta uma grande diversidade de espécies envolvidas neste processo de transmissão. Nas Américas são comprovadas cerca de 30 espécies de flebotomíneos com capacidade de transmissão (SANTOS, 2017).

No Brasil, as principais espécies relacionadas com a transmissão de parasitos causadores da LTA são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. Migonei* e as principais para a transmissão de espécies causadoras da LV são *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*, sendo a primeira considerada a principal para transmissão da *L. infantum* em todo país (BRASIL, 2014, 2017a).

No desenvolvimento de seu ciclo biológico as espécies de *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas: a forma promastigotas, visualizada no intestino do inseto vetor, e a amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos (figura 4). A promastigota é uma forma extracelular, alongada, que mede cerca de 14 a 20  $\mu\text{m}$  com flagelo livre emergindo do corpo do parasito. A forma amastigota é de caráter intracelular, e possui uma morfologia mais arredondada ou ovalada, medindo cerca de 2,1 a 3,2  $\mu\text{m}$  sem flagelo livre. Apesar de possuírem características morfológicas diferentes, ambas possuem em comum uma mitocôndria modificada com cinetoplasto, que é uma região mitocondrial que concentra kDNA (BRASIL, 2017a; BRELAZ-DE-CASTRO, 2013).

**Figura 4 - Formas evolutivas das espécies de Leishmania**

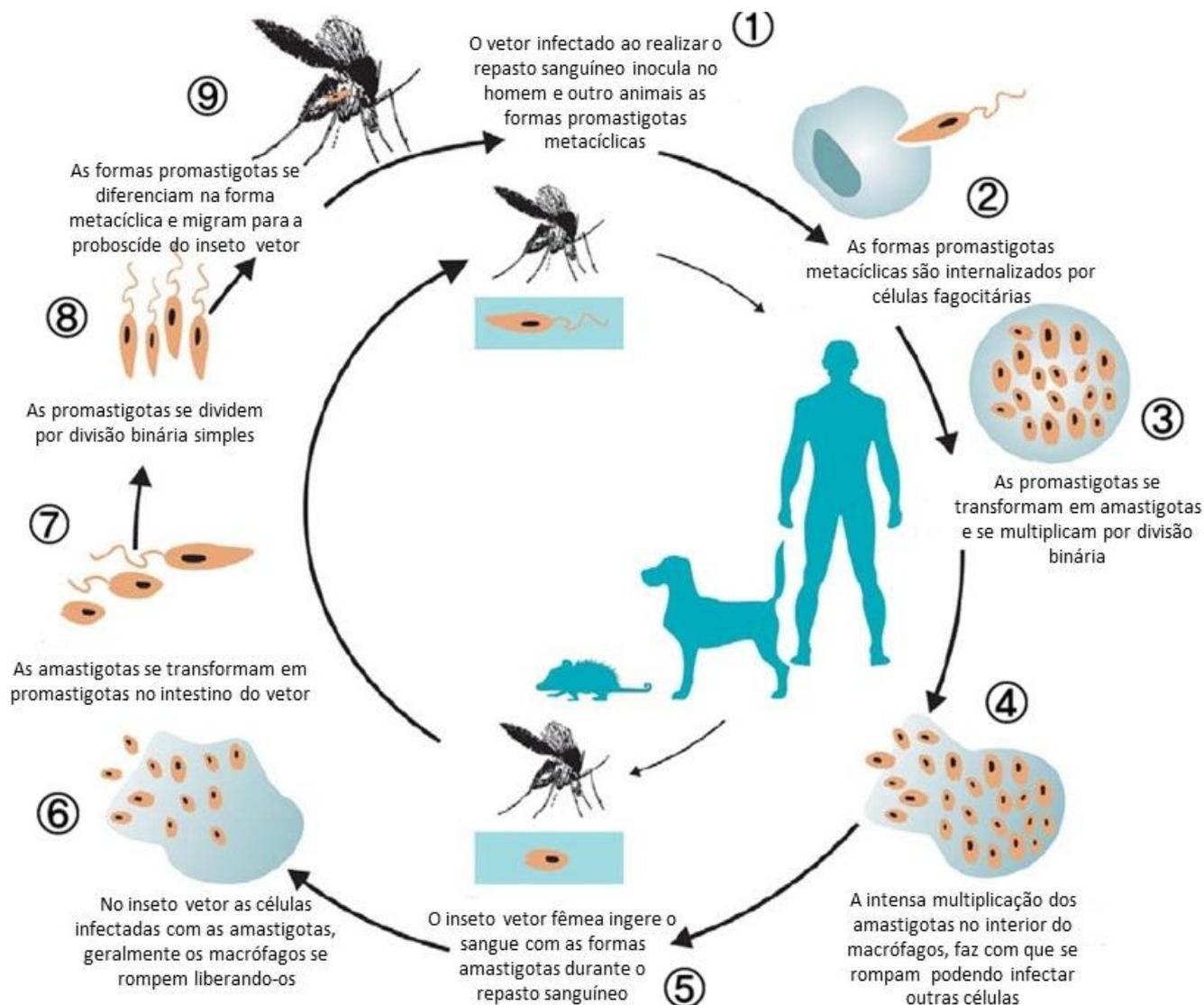


Legenda: a) Promastigotas de *Leishmania spp.* b) amastigotas de *Leishmania spp.* na ponta da seta preta

Fonte: Adaptado de Organización Panamericana de la Salud, 2019.

As leishmanias apresentam um ciclo de vida digenético, alternando entre dois hospedeiros, um hospedeiro mamífero, o homem e outros animais, e um invertebrado, os insetos flebotomíneos (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). A transmissão ao homem ocorre quando as fêmeas infectadas, ao realizarem o repasto sanguíneo, inoculam as formas promastigotas metacíclicas que penetram através da derme, sendo assim fagocitadas usualmente pelas células do sistema fagocítico mononuclear, em geral os macrófagos, transformando-se a partir daí na forma intracelular amastigota. Estas, por sua vez, multiplicam-se dentro dos macrófagos por divisão binária simples. Esta intensa replicação faz com que casualmente haja o rompimento das células do hospedeiro, conseqüentemente liberando as formas amastigotas que podem ser internalizadas novamente por outras células fagocitárias. Ainda no desenvolvimento do ciclo de vida, os flebotomíneos fêmeas ingerem o sangue do indivíduo infectado e com ele os macrófagos parasitados por amastigotas. Ao chegarem no intestino do inseto, estas formas se diferenciam em promastigotas, onde se multiplicam por divisão simples, se diferenciando novamente agora em promastigotas metacíclicas que migram para a proboscíde do inseto, em um processo que dura cerca de 8 a 20 dias. Aí elas podem ser então inoculadas novamente em hospedeiro vertebrado, continuando o ciclo (Figura 5) (BRELAZ-DE-CASTRO, 2013; REITHINGER et al., 2007).

**Figura 5 - Ciclo biológico de Leishmania spp.**



Fonte: Adaptado de Organización Panamericana de la Salud, 2019.

## 2.2 Formas clínicas da Leishmaniose tegumentar e visceral

As formas clínicas observadas nas leishmanioses podem se desenvolver em detrimento de alguns fatores, como a distribuição geográfica do parasito e dos insetos vetores, e também aqueles ligados diretamente com indivíduo, como a relação entre as espécies do parasito e a resposta imune do hospedeiro, idade, estado nutricional, coinfeções com outras doenças como o HIV e fatores genéticos (AIRES, 2017; GONTIJO, 2003). A depender dos fatores supracitados, estas formas clínicas podem ser classificadas em leishmaniose cutânea e mucocutânea, que ocorre quando as espécies do parasito apresentam tropismo tecidual para os macrófagos da pele e de

tecidos mucocutâneo, e a forma visceral, quando apresentam tropismo por tecidos do sistema reticuloendotelial em órgãos viscerais (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; KULKARNI et al., 2014).

A forma clínica do tipo cutânea característica da LTA pode ser assintomática em alguns casos ou apresentar lesões que se subdividem em formas cutânea localizada, disseminada, difusa e a mucocutânea, esta última em geral apresenta um maior grau de comprometimento da saúde do indivíduo (Figura 6) (BRASIL, 2017a; SANTOS, 2017). As lesões cutâneas do tipo localizadas, são as primeiras a surgirem de modo geral, logo após um período de incubação que varia de duas semanas a dois meses, onde pode ser observadas lesões em áreas expostas da pele, como braços e pernas (Figura 6A) (BRASIL, 2017). Apresentam-se com um formato arredondado, base eritematosa com bordas delimitadas e elevadas com fundo avermelhado, granulações e infiltrado de consistência firme, podendo chegar a medir de milímetros a centímetros de tamanho. Em muitos casos este quadro de lesão infecciosa pode regredir e entrar em uma fase de cura espontânea, ou passar por uma fase de latência evoluindo posteriormente para outras lesões mais agravadas em outros locais como o tecido cutâneo mucoso (BRASIL, 2017a; GONTIJO, 2003).

Posteriormente ao aparecimento destas lesões primárias, podem ocorrer a disseminação dos parasitos por via linfática ou hemática desenvolvendo lesões espalhadas pelo corpo, variando entre de 10 a 300 principalmente entre face e tronco com uma aparência acneiforme e papular (Figura 6B). Ainda podem ser observadas as formas clínicas difusa, que é considerada rara e grave, sendo a forma anérgica da doença, com lesões nodulares que não ulceram que também se espalham pelo corpo (Figura 6C). Temos ainda a forma mucocutânea que causa lesões destrutivas nas mucosas da região oro nasal e faríngea, evoluindo na maioria dos casos para lesões desfigurantes (Figura 6D)(BRASIL, 2017a; GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007).

**Figura 6 - Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar**



Legenda: A – Forma cutânea localizada; B – Forma disseminada; C- Forma cutânea difusa; D- forma mucocutânea

Fonte: Figuras B e C: MOKNI, 2019; Figuras A e D: BRASIL, 2017.

Na forma visceral a doença apresenta manifestações clínicas que comprometem de forma severa a saúde do indivíduo infectado, com alto risco de mortalidade para os casos sem tratamento. Caracteriza-se por febre persistente, esplenomegalia, perda de peso, pancitopenia, hepatomegalia e

hipergamaglobulinemia (Figura 7)(BRASIL, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; GUEDES FARIAS et al., 2019).

Segundo o Ministério da Saúde (2014) para uma melhor compreensão da evolução da LV ela é dividida em três etapas, de acordo com sintomatologia apresentada: período inicial (fase aguda), período de estado e período final. A fase aguda caracteriza-se pela apresentação de um quadro febril com duração de cerca de quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia e alterações de tamanho do baço, esses sintomas podem variar entre um indivíduo e outro. Quando há um quadro clínico estabelecido em mais de dois meses, define-se o período de estado, onde se observa contínua apresentação de febre irregular, em geral associada ao emagrecimento progressivo e o aumento da hepatoesplenomegalia. Quando não existe a possibilidade de realizar o diagnóstico e tratamento, a doença progride para o período final, com sintomas mais graves como a persistência da febre, desnutrição, edema dos membros inferiores, ascite e manifestações hemorrágicas podendo levar a morte (BRASIL, 2014).

**Figura 7 - Formas Clínicas da Leishmaniose Visceral**



Legenda: A – Forma visceral aguda com hepatoesplenomegalia em fase inicial;  
 B – Forma visceral período de estado com palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia;  
 C- Forma visceral período final com comprometimento do estado geral, hepatoesplenomegalia avançada e características de desnutrição.  
 Fonte: BRASIL, 2014.

### **2.3 Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose tegumentar e visceral**

O diagnóstico laboratorial da doença está ligado a métodos de exames parasitológicos, imunológicos e moleculares, onde as diferenças encontradas entres

eles estão relacionados principalmente quanto à sua especificidade e sensibilidade (AKHOUNDI et al., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

No exame parasitológico é possível visualizar as formas amastigotas do parasito. Para isso são utilizadas técnicas de pesquisa direta por parasitos, que pode ser feita a partir da coleta do material, por escarificação de borda de lesão, exames histopatológicos, punção aspirativa da lesão e aposição em lâmina (*imprint*) corado por Giemsa (AIRES, 2017; PORFIRIO-PASSOS ET AL., 2012). Com relação aos casos suspeitos de LV a punção aspirativa é realizada no baço, fígado, medula óssea e linfonodos (AIRES, 2017; GONTIJO, 2003).

Os testes imunológicos baseiam-se na pesquisa de anticorpos em soro de pacientes. Para este fim, os métodos mais utilizados tanto para a LTA quanto para LV, são a imunofluorescência indireta (IFI), o Ensaio Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e Western-blot, cuja sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com a técnica utilizada, mas em geral alcançam até 90% de sensibilidade para os teste de ELISA e IFI (PIETRZAKI CERUTTI et al., 2017; SAVOIA, 2015). Dentre as opções de métodos imunológicos usadas para diagnósticos das leishmanioses temos ainda a Citometria de fluxo, considerada tecnologia de ponta, e que vem sendo utilizada para este fim. A técnica realiza a análise simultânea de diferentes partículas, permitindo a análise quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* (PINHEIRO, 2019; BRELAZ-DE-CASTRO, 2013). Outro tipo de teste que se inclui entre os teste imunológicos utilizados é a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), que apesar de atualmente não estar sendo mais utilizado, devido à falta de produção do antígeno necessário para realização do mesmo, avalia a imunidade mediada por células para os casos de LTA. Para os casos de LV este tipo de teste pode tornar-se positivo para os casos de pacientes tratados com sucesso que progrediram para cura (JERONIMO; DE QUEIROZ SOUSA; PEARSON, 2011; JOSÉ et al., 2001). Ainda podem ser utilizados como estratégia para diagnóstico, os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA de espécies de *Leishmania spp.* (QUEIROZ, 2019).

Atualmente não existe um teste padrão-ouro para o diagnóstico das leishmanioses, sendo necessário muitas vezes uma combinação de mais de um teste para um resultado mais preciso (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). É importante

ressaltar também que estes métodos de diagnósticos utilizados, em geral estão associados a critérios clínicos e epidemiológicos (AIRES, 2017; GOTO; LINDOSO, 2010). Os critérios epidemiológicos analisam o vínculo entre o indivíduo e a localização endêmica na qual possa residir ou ter tido passagem, sendo considerado de suma importância para a conclusão do diagnóstico. No diagnóstico clínico, são observadas características intrínsecas de cada paciente, como aspectos nutricionais, imunológicos e o espectro de gravidade dos sintomas da doença que estão sendo apresentados (BRASIL, 2017a).

## **2.4 Aspectos imunológicos**

### **2.4.1 Imunidade Inata**

A ação do sistema imune começa desde a inoculação das formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado. Neste momento, uma grande variedade de células irá interagir diretamente com o parasito, atuando como primeira linha de defesa do hospedeiro, como os neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK). Os componentes da imunidade inata, contam ainda com os receptores de reconhecimento de padrão (PRR's) e alguns produtos solúveis como citocinas, onde as interleucinas (IL), IL -1 $\alpha$ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF) são importantes neste primeiro momento. Toda esta ação inicial é continuada com a atuação em conjunto com o sistema imune adaptativo (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; MEIRA; GEDAMU, 2019).

Dentre as células da imunidade inata envolvidas neste mecanismo de defesa, alguns estudos mostram que os neutrófilos e os macrófagos são importantes no curso da infecção (MEIRA; GEDAMU, 2019; ROSSI; FASEL, 2018). Os neutrófilos mesmo sendo células imunes de vida curta, podem ter sua vida útil expandida durante a inflamação. Foi visto que na infecção por *Leishmania* estas são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, podendo desempenhar tanto um papel protetor quanto patogênico (HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). São considerados protetoras quando são capazes de eliminar o parasito, através da produção de componentes citotóxicos e espécies reativas oxigênio (ROS) após a fagocitose. São consideradas patogênicas quando transferem silenciosamente amastigotas para macrófagos, quando o mesmo fagocita estes neutrófilos infectados, e ao secretarem

citocinas anti-inflamatórias. Contudo a influência destas células no curso da infecção pode variar de acordo com a espécie do parasito (BRELAZ-DE-CASTRO, 2013; MEIRA; GEDAMU, 2019; ROSSI; FASEL, 2018). Os macrófagos também apresentam uma potente ação frente o parasito, conseguindo eliminá-los por meio da produção de citocinas específicas e intermediários reativos do oxigênio como NADPH oxidase (NOX2) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) em um processo ativado pela fagocitose (PANDAY et al., 2015; ROSSI; FASEL, 2018). No entanto, a ação destas células frente ao parasito pode ficar comprometida, pois as *Leishmanias* desenvolveram mecanismos que conseguem desviar-se desta resposta. Um desses mecanismos é a inibição da formação complexo NOX2 através de moléculas lipofosfoglicano glicolípídico (LPG) presentes na superfície do parasito, interferindo na ação efetoras destas células fagocitárias, culminando assim em seu crescimento e sobrevivência (BRELAZ-DE-CASTRO, 2013; KIMA, 2007)

Ainda dentro dos mecanismos da imunidade inata encontra-se as células dendríticas, que são importantes na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. Estas são células responsáveis por reconhecer a infecção parasitária e subsequentemente apresentar estes organismos ou seus antígenos. Elas também são importantes na produção de IL-12, citocina envolvida na atividade leishmanicida (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Estas células ainda contribuem no mecanismo de ativação das células Natural Killer (NK) outro componente da imunidade inata muito importante no combate da infecção. As NKs por sua vez desenvolvem sua ação mediante a produção de citocinas ou através da ação citotóxicas pela liberação de seus grânulos (CAMPOS et al., 2020).

#### **2. 4. 2 Imunidade Adaptativa**

A infecção causada pelas espécies de *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado envolve uma resposta imunológica com mecanismos e componentes da imunidade inata e adaptativa (DE FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013). Esta resposta tem importante papel para a cura clínica da doença, mas por outro lado está envolvida também na sua progressão (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; REIS et al., 2007).

Em geral o combate das *Leishmanias* pelo sistema imune adaptativo envolve uma expansão celular mediada por ativação e diferenciação de células T. Muitos estudos para compreensão mais detalhada da resposta imune adaptativa são

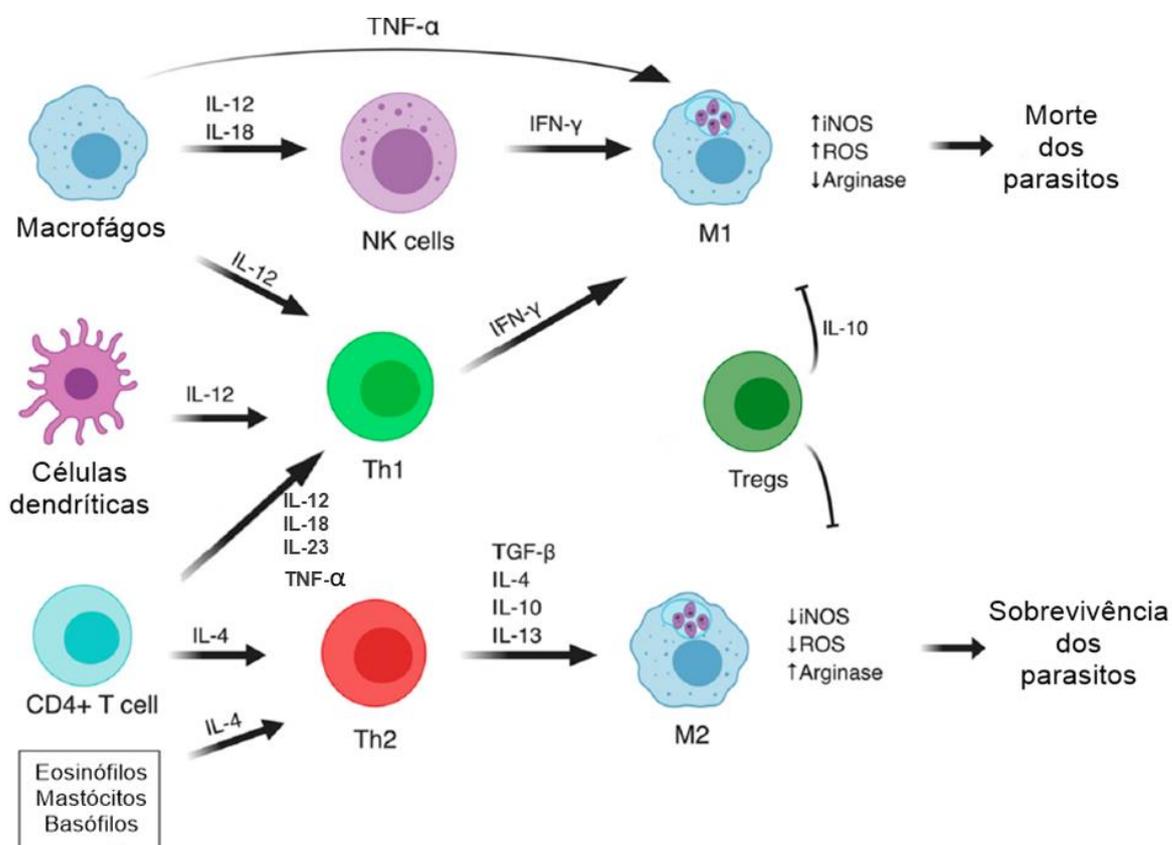
desenvolvidos usando modelos animais infectados com *L. major* para LT e *L. infantum* para LV na tentativa de elucidar esse papel dual que é observado no curso da infecção (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; MEIRA; GEDAMU, 2019; REIS et al., 2007; REITHINGER et al., 2007).

A ativação das células T é observada quando os componentes da imunidade inata no início da infecção produzem e liberam IL-12, ocasionando a ativação e diferenciação das mesmas em células T auxiliares (do inglês “helper”) (Th) (MEIRA; GEDAMU, 2019). Estas por sua vez compreendem células T CD4+ que podem diferenciar-se em subpopulações com padrões diferentes de citocinas: Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Tregs). Os perfis Th1 e Th2 são os principais envolvidos na resposta contra o parasito, podendo conduzir a uma resposta protetora, observada no perfil Th1 ou para a patogênese da doença desencadeado pelo perfil Th2 (DE FREITAS; NUNES-PINHEIRO, 2013; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Com relação ao papel das células Th17, estudos indicam que elas podem estar influenciando no equilíbrio de citocinas anti e pró-inflamatórias através da expressão de IL-17 que permite modular a resposta adaptativa. Outra função importante associada ao perfil Th17 é a contribuição, também através da IL-17, para recrutamento de neutrófilos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). As células Tregs também estão envolvidas na regulação da resposta que pode conferir resistência ou suscetibilidade da infecção. A produção de IL-10 por estas células podem suprimir a atividade do perfil Th1 que levam adiante o curso da infecção. As IL-10 podem também além deste potencial supressor da resposta Th1, promover uma exacerbação dessa resposta que causa danos teciduais, auxiliando na progressão e processo de cura (MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016).

Alguns estudos em modelos experimentais mostram que a diferenciação das células T CD4+, que leva a resposta do tipo Th1, se dá após o reconhecimento de antígenos a partir do MHC de classe II e está associado ao desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória. Esta resposta é representada pela secreção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e o fator de necrose tumoral (TNF), associado ao aumento na produção de intermediários reativos do oxigênio, óxido nítrico (NO) através dos macrófagos classicamente ativado (M1), óxido nítrico sintase (iNOS) e o aumento da fagocitose resultando no controle da infecção (MEIRA; GEDAMU, 2019; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Por outro lado, quando há a diferenciação

destas células para um perfil Th2, observa-se uma resposta anti-inflamatória caracterizada pela produção de citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e fator de transformação do crescimento (TGF)  $\beta$ , estimulando assim a ativação de macrófagos do tipo (M2), que contribuem para proliferação parasitária e conseqüentemente a

**Figura 8 - Esquema representativo da ativação de células da resposta imune inata e adaptativa que influenciam na eliminação ou sobrevivência do patógeno**



evolução da doença (Figura 8)(MEIRA; GEDAMU, 2019).

Fonte: Adaptado de MEIRA; GEDAMU, 2019

Legenda: Macrófagos e Células dendríticas induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 que auxilia na diferenciação da resposta Th1. Diferentes estímulos dependendo da diferenciação de células T CD4 + nos perfis de resposta Th1 ou Th2 promovem a diferenciação em macrófagos do tipo M1 ou M2 podendo levar a morte ou sobrevivência dos parasitos no interior destas células. As células Tregs atua na regulação destas respostas podendo conferir resistência ou suscetibilidade da infecção.

Além dos estudos que procuram elucidar o papel das células T CD4+, outros também avaliam a atuação de outro tipo de células T, chamadas de células citotóxicas, que são CD8+, frente a infecção por *Leishmania*, e propõem que estas também atuam como produtoras de citocinas no processo de ativação dos macrófagos. Um estudo realizado por Brelaz de Castro e colaboradores (2012) indicaram a importância do

balanço entre os linfócitos T CD4+ e T CD8+ no processo de cura clínica (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). Estas células podem apresentar propriedades regulatórias envolvidos tanto na resolução da infecção quanto na progressão da mesma. O envolvimento destas células que resulta no combate a infecção, se dá principalmente através de seus mecanismos citotóxicos por meio da exocitose de seus grânulos líticos contendo granzimas A e B, granulicina, perforinas e a indução apoptótica através da via Fas/FasL (STÄGER; RAFATI, 2012). Essas células também podem contribuir com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF, que induzem uma resposta imune protetora do tipo Th1 (CARVALHO et al., 2012; KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Quanto ao papel relacionado a suscetibilidade da doença, estudos mostram que pode estar relacionado com a exacerbação da expressão desta resposta citotóxica que levam ao dano tecidual (CARVALHO et al., 2012).

## 2. 5 Tratamento

Um dos grandes desafios encontrados no controle das leishmanioses está principalmente relacionado ao tratamento, devido a diversas complicações descritas como o modo de administração, longo tempo e seu alto custo. Também há ausência de uma vacina eficaz para humanos, outro fator que limita a prevenção da doença e consequentemente seu controle (QUEIROZ, 2019; SANTOS, 2017).

O esquema terapêutico adotado como primeira escolha para o tratamento das leishmanioses é realizado por meio dos antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), que vem sendo utilizado há mais de 70 anos. Hoje em dia existem duas formulações que são disponibilizadas no mercado, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®), considerada a droga de primeira escolha para o tratamento no Brasil, e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) cuja comercialização não é permitida no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é recomendado que a dose terapêutica utilizada destes antimoniais seja calculada em miligramas de acordo com o peso corporal por dia (20 mg  $Sb^{+5}$ /kg/dia), sendo este um tratamento contraindicado para gestantes, pacientes acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e que apresente hipersensibilidade aos componentes da medicação (BRASIL, 2017a).

Os antimoniais pentavalentes são utilizados para tratar todas as formas clínicas da doença, sendo administrado por via intramuscular ou endovenosa na dose terapêutica recomendada por um período entre 20 e 30 dias. Ao longo do tratamento diversos efeitos adversos podem ser desenvolvidos como: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda, podendo ainda nas formas mais graves levar a alterações cardíacas, hepáticas e pancreáticas que pode acarretar a interrupção do tratamento (BRASIL, 2014, 2017a).

O mecanismo de ação destes fármacos, apesar de estarem estabelecidos há muito tempo, ainda não são totalmente conhecidos. Entretanto, acredita-se que a molécula pentavalente ( $Sb^{+5}$ ) atue como um pró-fármaco sendo convertido em antimônio trivalente ( $Sb^{+3}$ ) que lhes confere maior toxicidade e permite interferir nas vias bioenergéticas, como o processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise das formas amastigota (QUEIROZ, 2019; RATH et al., 2003).

Uma inovação relacionada a este medicamento observada nos últimos anos é o tratamento intralesional com antimoniato de meglumina, recomendado para o uso restrito dos casos de leishmaniose cutânea localizada e para a leishmaniose recidiva cútis. Essa forma de aplicação do fármaco apresenta efeitos colaterais bem mais leves do que aqueles observados na administração sistêmica. Um estudo realizado por Yesilova e colaboradores (2015) mostrou a eficácia deste tratamento em pacientes infectados com *L. tropica* e/ou *L. major* que apresentaram cura com cicatrização total da lesão (BRASIL, 2017a; YESILOVA et al., 2016).

Apesar da descrição de sua potente ação contra o parasito estes medicamentos apresentam diversos fatores limitantes ao seu uso. Um dos principais que já vem sendo relatado é a resistência de cepas de *Leishmania*, indicando falhas ao longo deste tratamento. Estudos destacam que a Índia é o país no qual encontra-se os principais relatos desta resistência (HALDAR; SEN; ROY, 2011; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Para os casos que não obtiverem sucesso no tratamento por estes fármacos de primeira linha, ou forem contraindicados, são disponibilizados medicamentos de segunda escolha com a Anfotericina B (AmB) e a Pentamidina (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Com relação a Anfotericina B, ela apresenta excelente atividade

contra as formas evolutivas de *Leishmania*. A membrana do parasito contém ergosterol e o mecanismo de ação desta droga está associado a ligação a estes esteróis, implicando em uma aumentada permeabilidade celular, o que leva a perda de cátions como  $K^+$  e causa a morte parasitária (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; SEIFERT, 2011). A dosagem de administração recomendada pelo Ministério da Saúde é de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg, administrado por via endovenosa. Os efeitos colaterais observados estão relacionados à sua toxicidade e inclui reações à infusão, febre, hipocalcemia, anorexia, hipotensão, miocardite e um comprometimento mais agravado das funções hepática e renal, sendo contraindicado para pacientes com insuficiência renal (BRASIL, 2017a).

Na intenção de reduzir estes níveis de toxicidade, foram realizadas modificações físico-químicas na estrutura da AmpB, e foi desenvolvido a Anfotericina B lipossomal (AmBisome®), Anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil®) e anfotericina B em complexo lipídico (Abelcet®). Esta formulação se utiliza de liberação mais lenta do fármaco em sistemas nanoestruturados capazes de formar micelas que ao serem capturadas por macrófagos, liberam o fármaco no interior das células infectadas. Foi recomendada pela OMS para o tratamento da doença, por conta de sua eficácia e diminuição da toxicidade em relação a AmpB livre. Os efeitos colaterais também foram reduzidos, inclusive o efeito nefrotóxico apresentado pela formulação convencional. Apesar da AmpB lipossomal apresentar resultados satisfatórios para o tratamento da doença quando comparado a convencional, a terapia baseada nesta nova formulação requer um alto custo que inviabiliza muitas vezes seu uso (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Com relação a Pentamidina, outro medicamento considerado como segunda escolha no esquema terapêutico no tratamento das leishmanioses, esse é um fármaco da classe de diaminas aromáticas que também exibiu grande eficácia leishmanicida. No entanto, possui grande toxicidade com a apresentação de efeitos colaterais cardíacos e gastrointestinais graves incluindo pancreatite, arritmias cardíacas, leucopenia, insuficiência renal aguda, hipocalcemia e taquicardia ventricular (BRASIL, 2017). A dose recomendada é de 4mg/Kg/dia, pela via de administração intramuscular ou endovenosa. Assim como a AmpB a utilização deste medicamento requer alto

custo e uma maior necessidade dos serviços de maior complexidade para a sua administração (BRASIL, 2017a; SANTOS, 2017).

Outro medicamento utilizado é a Miltefosina (Impavido™), um fármaco que foi desenvolvido inicialmente como antineoplásico e que foi redirecionado para tratamento da leishmaniose, devido sua alta eficácia no combate ao parasito. Este medicamento tornou-se o primeiro tratamento para doença por via oral em alguns países, sendo eficaz em todas formas clínicas, funcionando como outra opção para os casos de resistência aos antimoniais (SANTOS et al., 2020; TIUMAN et al., 2011). Apesar de sua eficiente ação, assim como os outros medicamentos estabelecidos, a miltefosina também apresenta alta toxicidade com efeitos gastrointestinais e teratogênicos, sendo contraindicado para gestantes. Uma formulação deste medicamento foi autorizada para fins veterinários (Milteforan® Virbac) para tratar a leishmaniose visceral canina (QUEIROZ, 2019). Mesmo sua eficácia sendo relatada em Países como a Índia, em outros países do novo mundo como Colômbia, Bolívia e Brasil esta eficiência pode variar de acordo com as espécies de *Leishmania* (SANTOS et al., 2020; SOTO et al., 2004).

Alternativas terapêuticas como a termoterapia vem obtendo êxito em estudos como possível novo tratamento para LT. A terapia consiste na aplicação de ondas de radiofrequência no local da lesão, que penetra na camada da derme superior atingindo as formas amastigotas, conseguindo eliminá-las com eficiência sem danificar o tecido ao redor (GONÇALVES; COSTA, 2018).

Alguns outros medicamentos como Paromomicina, azitromicina, cetoconazol, fluconazol e outros considerados antifúngicos tem mostrado boa atividade leishmanicida e são adotados como tratamento para os casos de LTA. No entanto seus resultados não são tão conclusivos, pois seus mecanismos de ação contra o parasito ainda não estão completamente elucidados (GOTO; LINDOSO, 2010).

Diante das falhas observadas no atual arsenal terapêutico que é disponibilizado, é importante a busca por novas moléculas com ação leishmanicida eficaz com baixa toxicidade atrelado a um baixo custo para o combate desta doença.

## **2.6 Desafio no estudo de novos compostos**

Diante do cenário de medicamentos atualmente disponíveis e de acordo com a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas, do inglês, (*Drugs for*

*Neglected Diseases Initiative*) (DNDi), é um grande desafio a busca por novas moléculas para o tratamento das leishmanioses, principalmente porque é necessário suprir as limitações encontradas nos tratamentos atuais. É indispensável a busca por compostos com baixa toxicidade, eficazes para todas as formas clínicas da doença e, sobretudo, com o mínimo de efeitos colaterais ao indivíduo (DNDi, 2016).

Baseado nas estratégias de Target Product Profile (TPP) (Perfil de Produto-Alvo), o DNDi adota critérios que podem ser considerados como base para suprir os desafios nos estudos de novas moléculas. Estes critérios são divididos em: o que é considerado ideal e aceitável em um novo tratamento para leishmaniose tegumentar e visceral (DNDi, 2020) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Perfil do Produto- alvo para o desenvolvimento de novas drogas no combate das leishmanioses**

<b>Leishmaniose Cutânea e Visceral</b>		
<b>Crítérios</b>	<b>Ideal</b>	<b>Aceitável</b>
Espécies alvo	Todas as espécies	(Forma cutânea) <i>L. tropica</i> ou <i>L. braziliensis</i> (Forma visceral) <i>L. donovani</i>
População alvo	Todos	> 9 meses de idade e Imunocompetentes
Eficácia clínica	> 95%	>90%
Formulação	(Forma cutânea) Oral /Tópica (Forma visceral) Oral / Intramuscular	Não parenteral, ou com poucas doses se parenteral ou intramuscular
Regime de tratamento	(Forma cutânea) Oral <7 dias Tópica ≤ 14 dias (Forma visceral) Oral: 1 / dia por 10 dias Intramuscular: 3 doses/10 dias	(Forma cutânea) Oral: duas vezes ao dia por 28 dias Tópica: 28 dias (Forma visceral) <10 dias por via oral > 3 injeções intra- musculares em 10 dias

Contra indicações	Nenhuma	Gravidez / Lactação
Segurança / tolerabilidade	Nenhuma tolerância aos efeitos adversos que exija monitoramento	Monitoramento de segurança no nível de atenção primária à saúde

Fonte: Adaptado de DNDi (2020); Borsari et. al. (2018).

Associado a estes fatores, é importante incluir também na pesquisa por novos compostos aqueles que possa vir a atuar como imunomoduladores, estimulando uma resposta imune que possa induzir ao objetivo terapêutico. Isso é importante tendo em vista que a evolução para a cura nos casos de leishmaniose estão ligadas a diversos aspectos e um deles é a resposta imune do indivíduo (FIELD et al., 2017; SINGH et al., 2016).

## 2.7 Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas

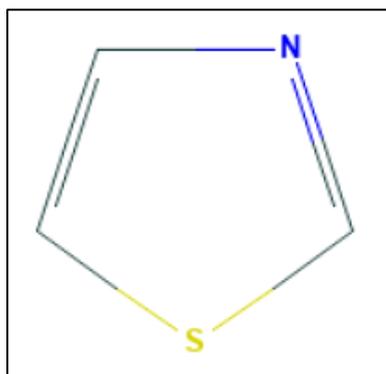
Para o desenvolvimento de novas drogas ativas contra as espécies de *Leishmania*, é recomendado que elas apresentem eficácia contra o parasito, e sejam planejadas para um modelo de tratamento de curta duração com segurança e tolerabilidade para os pacientes ( JEAN-YVES GILLON, DNDI, 2018).

Alguns parâmetros adotados pelo DNDi são utilizados para direcionar melhor os estudos de novas abordagens terapêuticas. Um estudo realizado por Don e Ioset (2014) aborda algumas destas características. O estudo traz indicadores na qual uma nova molécula deve ter para ser considerada promissora. Estes parâmetros estão relacionados principalmente à eficácia destes novos compostos já na fase inicial, ou seja, nos testes *in vitro*. São considerados promissores aqueles que apresentem valores de  $IC_{50} \leq 10 \mu M$ , em especial para forma amastigota, e que esteja aliado a uma seletividade 10 vezes maior ao parasito do que as linhagens celulares mamíferas (DON; IOSET, 2014).

O estudo de novas moléculas sintéticas cuja propriedades biológicas já são conhecidas ou estudadas, podem auxiliar na descoberta de drogas eficazes para o tratamento das leishmanioses. Os compostos heterocíclicos da classe das piridinas e dos tiazóis são considerados promissores pela química medicinal, e a utilização destes núcleos com a manipulação de seus radicais tem demonstrado diversas propriedades biológicas (LEITE et al., 2019; QUEIROZ, 2019).

Os compostos heterocíclicos tiazolínicos e seus análogos, os quais apresentam o núcleo tiazol como estrutura principal (Figura 9), são uma importante classe de compostos com um amplo espectro de atividade biológicas já conhecidas, como atividades antitumoral (OLIVEIRA, 2014), antibacteriana (BONDOCK; KHALIFA; FADDA, 2007), anti-inflamatória (SHAFI et al., 2012) e antichagásica (NAVA-ZUAZO et al., 2014).

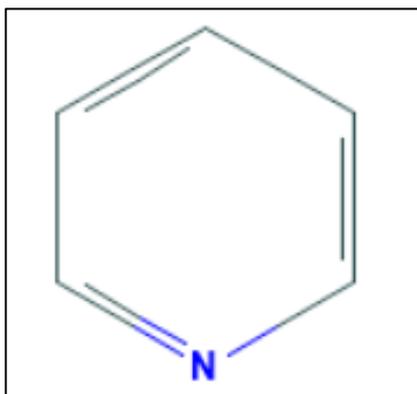
**Figura 9 - Representação da estrutura química do Tiazol**



Fonte: PubChem Database, 2020

O núcleo Piridina (Figura 10) também é considerado uma estrutura importante para síntese de novos produtos sintéticos, principalmente por sua ação biológica, facilidade na obtenção e síntese com um baixo custo (CARDOSO et al., 2014; QUEIROZ, 2019). Incluso na classe dos compostos heterocíclicos, está envolvido em diversos processos de oxidação-redução de inúmeras enzimas de organismos vivos (SILVA, 2014). Estudos mostram diversas atividades biológicas significativas da molécula de Piridina e seus derivados com propriedades bactericidas (BATHIA et al., 2009), fungicidas (ÖZDEMIR et al., 2010) e tripanocidas (DA SILVA et al., 2017b).

**Figura 10 - Representação da estrutura química da Piridina**



Fonte: PubChem Database, 2020.

A associação destas moléculas com variação de seus análogos na síntese de novos compostos, pode ser muito eficiente na busca por um novo protótipo leishmanicida. Como observado em um estudo realizado por Cardoso e colaboradores (2014), uma classe de compostos com derivados de piridina e tiazóis se mostrou como potentes agentes tripanocida, sendo mais potente que o fármaco de referência usado na doença de chagas, parasitos pertencentes a mesma família do gênero *Leishmania*. Outro estudo realizado por Silva e colaboradores (2017) também desenvolveu uma nova classe de compostos derivados de piridinas e tiazóis com potente ação frente a espécies de *T. cruzi* (CARDOSO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017b).

Alguns estudos com moléculas derivadas de tiazol e piridina mostraram a eficácia destes compostos e seus derivados frente a algumas espécies de *Leishmania*. Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2020) mostrou resultados eficazes de compostos derivados tiazolínicos e piridina com a atividade leishmanicida sobre espécies de *L. infantum* com potencial seletividade ao parasito e baixa toxicidade contra células de mamíferos (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Sendo assim, devido à ausência de compostos que atuem seletivamente sobre o parasita causador da leishmaniose com danos mínimos ao homem, estratégias e estudos sobre novas abordagens terapêuticas principalmente aquelas no qual o composto está associado a modulação imunológica, são bastante importantes para a saúde pública.

### 3 JUSTIFICATIVA

O grave problema de saúde pública que as leishmanioses representam é um grande desafio para autoridades de saúde mundial. Ela inclui-se entre as principais doenças negligenciadas no mundo e seu agente etiológico apresenta uma variedade de espécies com um ciclo de vida complexo, envolvendo diversos hospedeiros e vetores. Estas características resultam em um espectro de manifestações clínicas que acometem pele, mucosas e vísceras e comprometem a saúde do indivíduo infectado (OPAS, 2019; BRASIL, 2017,2014). Essa é uma das doenças infecto-parasitárias com bastante incidência em números de casos, cerca de 1,3 milhão de novos casos são registrados a cada ano em todo mundo (OPAS, 2019). O Brasil, neste ranking, é um dos principais representantes, com casos por todo país, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, bem como no estado de Pernambuco (DE BRITO et al. 2015; BRELAZ-DE-CASTRO, 2012).

O tratamento disponibilizado atualmente conta com medicamentos que estão no mercado há muitos anos e apresentam diversos problemas relatados como a alta toxicidade, alto custo, diversos efeitos colaterais. Vinculado a estes fatores inclui-se também a necessidade e demanda de serviços essenciais para sua administração, além dos casos de resistência do parasito já registrados (SANTOS, 2020; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Diante de toda esta problemática envolvendo o modelo de tratamento atual das leishmanioses, tornou-se evidente a necessidade de se buscar e triar novas moléculas que possuam atividade leishmanicida, atendam aos critérios de segurança, com baixa toxicidade, baixo custo, fácil administração e eficientes no processo de cura (LEITE et al., 2018; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida, citotoxicidade e capacidade imunomoduladora de novas piridina tiazóis.

### 4.2 Específicos

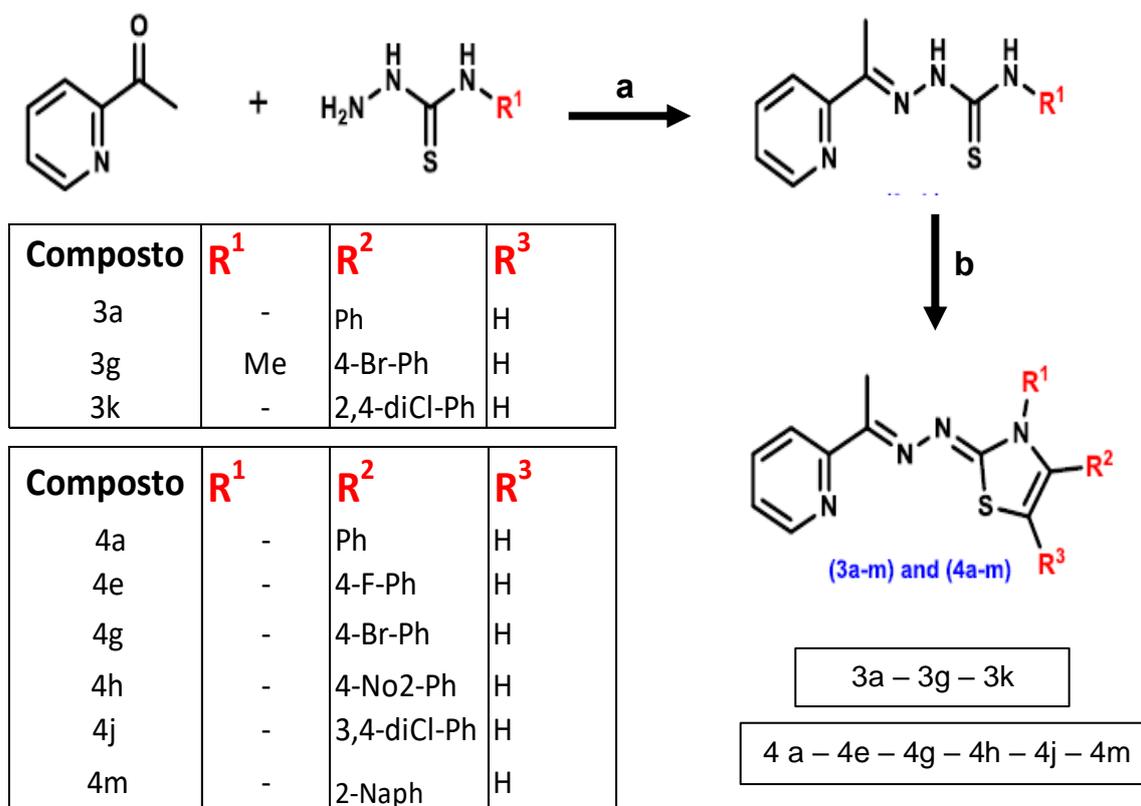
- Investigar *in vitro* a atividade antiparasitária dos compostos avaliados nas diferentes formas evolutivas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar *in vitro* a atividade tóxica dos compostos nas linhagens Hepg2, Esplenócitos e Raw 264.7
- Avaliar o potencial imunomodulador dos compostos por meio da quantificação da produção de óxido nítrico e das citocinas IFN- $\gamma$  (interferon-gama), TNF (fator de necrose tumoral), IL (interleucina)-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17;

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Compostos Sintéticos

Nove compostos foram testados no presente estudo, sendo sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A rota sintética para obtenção desta classe de compostos e seus substituintes foram apresentados em trabalho anterior por Da Silva et. al. (2017) e estão representados na figura 11. A estrutura química e seus respectivos pesos moleculares de cada composto estão descritos na figura 12. Todos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados a  $-20^{\circ}$  C para utilização nos ensaios posteriores, e foram dissolvidos no meio de cultura adequado para cada ensaio.

Figura 11 - Rota sintética para obtenção da piridil-1,3-tiazóis e seus substituintes



Fonte: Adaptado de Da Silva et al, 2017.

Figura 12 - Estruturas químicas e pesos moleculares da nova classe de composto piridil-1,3-tiazóis

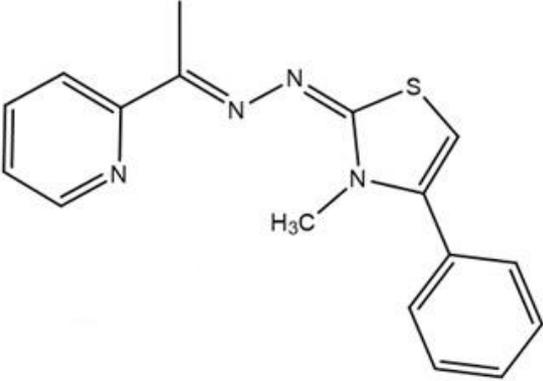
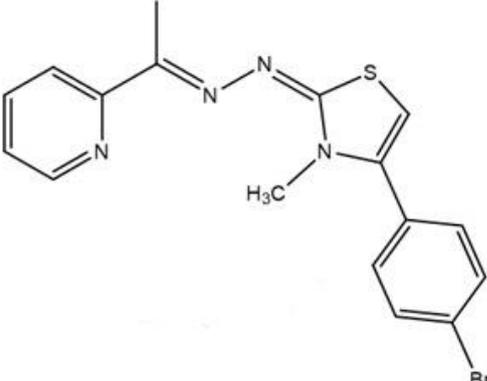
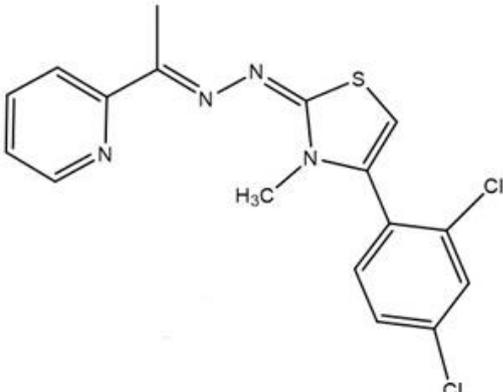
Composto	Estrutura química	Peso molecular
3a		308,40
3g		387,30
3k		377,29

Figura 12 – Estruturas químicas e pesos moleculares da nova classe de composto piridil-1,3-tiazóis

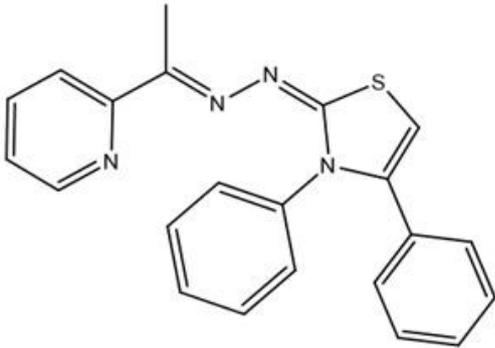
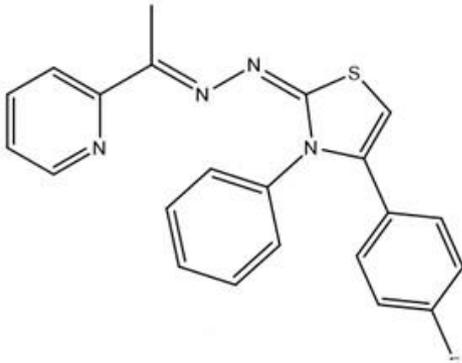
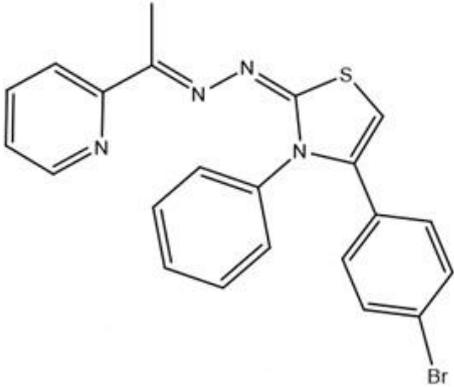
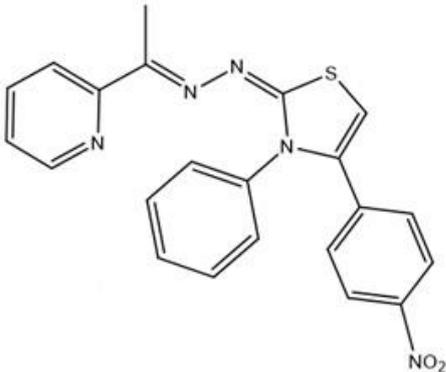
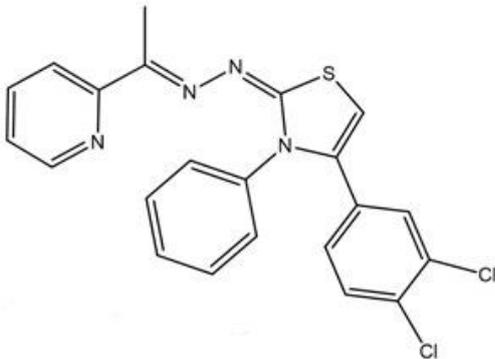
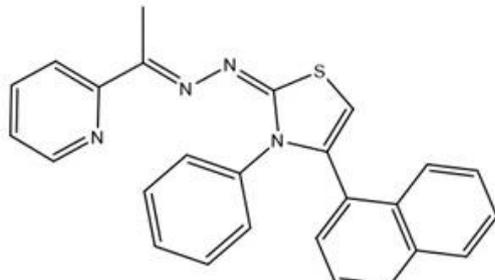
Composto	Estrutura química	Peso molecular
4a		370,47
4e		388,46
4g		449,37
4h		415,47

Figura 12 – Estruturas químicas e pesos moleculares da nova classe de composto piridil-1,3-tiazóis

Composto	Estrutura química	Peso molecular
4j		439,36
4m		420,53

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## 5.2 Avaliação da atividade leishmanicida

### 5.2.1 Promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Para avaliação da atividade leishmanicida dos compostos derivados de piridinas tiazóis sobre a espécie *L. amazonensis* e *L. infantum* formas promastigotas ( $10^6$  cel./ml) de cultura cultivadas em Schneider's foram incubadas a 26°C na presença de diferentes concentrações de todos os compostos (0.19 a 100 µg/ml) em placas de 96 poços por 72h. Os compostos 3a,4e e 4m ainda foram testados em uma faixa de concentração menores que os demais (0,02 a 10 µg/ml), pois a triagem inicial demonstrou a potente atividade desses compostos. Como controle negativo parasitas foram incubados apenas com meio de cultura e como controle positivo com a Miltefosina. A viabilidade parasitária foi determinada através da contagem direta dos parasitos em câmara de Neubauer e de acordo com os valores

encontrados foi estabelecida a IC<sub>50</sub> (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos). Cada teste foi realizado em duplicata. A atividade antiparasitária destes compostos também foi avaliada através de uma triagem colorimétrica *in vitro*, utilizando-se formas promastigotas com cepas transgênicas de *L. amazonensis* (WHOM/00LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) expressando beta-galactosidase, permitindo sua quantificação colorimétrica (DA SILVA SANTOS et al., 2019). O protocolo de avaliação desta atividade antiparasitária foi realizado conforme está descrito em Santos *et al* (2019).

### 5.2.2 Amastigotas

A avaliação da atividade antiparasitária dos compostos sob as formas amastigotas foi realizada com as cepas transgênicas de *L. amazonensis* (WHOM/00LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) (DA SILVA SANTOS et al., 2019). Para este fim, foram cultivados macrófagos RAW 264.7 em meio RPMI 1640 (Cultilab), suplementado com estreptomicina 100 mg / mL (GIBCO™), penicilina 100 U / mL (GIBCO™) e 10% de SFB, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos foram contados e ajustados para uma concentração de 4 × 10<sup>5</sup> células / mL. Em seguida foram plaqueados com 200 µL por poço em placas de 96 poços. As células foram então mantidas por 2 h a 37 °C e em 5% de CO<sub>2</sub> para adesão. Os promastigotas transfectados foram adicionados aos poços na proporção 15:1 parasita / macrófago. As placas foram então incubadas a 37 °C e em 5% de CO<sub>2</sub> por 6h, seguidas por lavagem dos poços três vezes com meio de cultura. As amastigotas que se desenvolveram a partir da infecção de macrófagos com promastigotas foram submetidos a seis concentrações diferentes dos compostos (3,125 a 100 µg / mL). A relação parasita: macrófago foi estabelecida após a padronização (descrito no protocolo estabelecido por Da Silva Santos et. al., 2019). Após 24 h de incubação, os poços foram lavados e foi seguido pela adição a cada poço de 50 µL de uma solução de 500 µM de clorofenol vermelho-β-D-galactopiranósido (CPRG, Sigma) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), suplementada com 0,5% de Nonidet P-40. As placas foram então incubadas a 23 °C por 20 min e lidas a 570 nm usando o aparelho Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) com a determinação da IC<sub>50</sub> por análise de regressão. O controle foi estabelecido como poços de reação em branco, consistiu em macrófagos submetidos aos mesmos procedimentos, exceto a incubação com promastigotas transfectados. Os poços de reação em branco receberam o mesmo

volume de meio de cultura e solução de CPRG. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **5.3 Avaliação da atividade citotóxica**

#### **5.3.1 Obtenção de esplenócitos murinos**

Baço murinos removidos em condições assépticas foram colocados em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) +1% de antibiótico (GIBCO™). Em ambiente estéril os baços foram macerados em placa Petri utilizando a parte fosca de lâminas de microscopia. As suspensões celulares foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10ml de meio RPMI+1% de antibiótico por baço e centrifugadas 400 x g durante cinco minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuscitado em meio RPMI+1% de antibiótico+10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão celular foi corada com azul de trypan para quantificação e verificada a viabilidade celular em câmara de Neubauer.

#### **5.3.2 Avaliação da citotoxicidade sobre células esplênicas, macrófagos RAW 264.7 e células hepáticas HepG2**

A citotoxicidade dos compostos frente a três linhagens celulares foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico do MTT brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bifenil tetrazolium). As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações adequadas para cada linhagem celular e foram incubadas por 24h para que aderissem. Após este período de incubação, foi adicionado os compostos em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL) e as placas foram incubadas novamente por um tempo de 48h. Após este período, 25 µL de MTT diluído em PBS (5 mg/mL, p/v) foi adicionado e as placas foram mantidas a 37 °C por 2 h. Posterior a esta incubação, o meio de cultura juntamente com o excesso de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan. Como controle negativo foram utilizados poços com apenas meio de cultura e células sem tratamento dos compostos. Após o tempo total de incubação, a viabilidade celular foi avaliada em espectrofotômetro (Multiskan FC-Thermo Scientific) com a absorbância lida a 595 nm. A partir desses valores, foram obtidas as concentrações citotóxicas para 50% das células (CC<sub>50</sub>) através do software GraphPad Prism 5.0. O índice de seletividade também foi calculado, a partir da razão entre os valores de

citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) para as células de mamíferos e os valores referente a atividade leishmanicida (IC<sub>50</sub>). Cada teste foi realizado em duplicata

#### **5.4 Obtenção de sobrenadante de cultura para quantificação da produção de citocinas**

Suspensões de células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços (10<sup>6</sup> células/ml), em duplicata. As células foram tratadas com 1x e 2x a IC<sub>50</sub> dos diferentes compostos de acordo com protocolo estabelecido e as placas foram mantidas em estufa à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48, 72h e 6 dias. A miltefosina foi utilizada como droga de referência e utilizou-se como controle de positivo de estimulação a concanavalina A (ConA). O controle sem tratamento foi denominado de basal. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (400x g por 10 min, a temperatura ambiente) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C para posterior utilização no ensaio de dosagem de citocinas pela citometria de fluxo.

#### **5.5 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo**

As citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram mensuradas em sobrenadante de cultura de células esplênica tratadas com 1x, 2x e 4x o valor da IC<sub>50</sub> dos compostos obtidas a partir dos testes de promastigotas selvagens da espécie de *L. amazonensis*. Foi utilizado neste ensaio o kit CBA mouse Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, BD Bioscience, San Jose, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2- 0,1 pg/ml; IL-4- 0,03 pg/ml; IL-6- 1,4 pg/ml; IL-10- 16,8 pg/ml; TNF- 0,9 pg/ml; IFN- $\gamma$ - 0,5 pg/ml; IL-17A- 0,8 pg/ml A aquisição dos dados foi realizada através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3 (Soft Flow Inc). Este ensaio foi realizado apenas com os compostos que se destacaram nos testes iniciais.

#### **5.6 Dosagem de Óxido Nítrico (ON)**

As células de linhagem macrofágica J774 foram cultivadas em meio RPMI completo, em condições axênicas até momento dos testes. As células foram plaqueadas (10<sup>5</sup> células/ml) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2h. Após esse tempo, as culturas foram lavadas com meio de cultura, para remoção das células não aderentes. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em diferentes concentrações dos

compostos (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL). Também foram adicionados poços com ConA – 100 ng/ml, poços sem tratamento e a droga de referência. Após 48h, transferiu-se 50 µl do sobrenadante de cada poço para placas de 96 poços e o mesmo volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloronaftiletileno diamina 0,1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,3 M) para avaliar a quantidade de ON. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan FC- Thermo Scientific) a 540 nm e a concentração de ON foi determinada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão preparada com nitrito de sódio. O percentual de produção de ON de cada composto foi avaliado comparando os resultados das absorbâncias com os das culturas não tratadas com os compostos.

### **5.7 Considerações Éticas**

Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais. O protocolo utilizado para obtenção de células esplênicas provenientes de camundongos isogênicos (BALB/c) (Item 5.3.1) possuiu aprovação no CEUA com Registro 103/2016 (Anexo A).

### **5.8 Análise Estatística**

As análises foram realizadas empregando-se testes paramétricos ou não paramétricos após a verificação da normalidade através do teste Shapiro-Walk. Para analisar a variabilidade entre grupos tratados e controle foi utilizado o teste Mann-Whitney, após verificação da não normalidade. Testes de regressão linear simples foram utilizados para determinar os valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>. O índice de seletividade foi calculado a partir da razão entre os valores da CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> obtidos. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativos).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação da atividade leishmanicida

#### 6.1.1 Avaliação dos compostos sobre as formas selvagens de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram na triagem inicial com cepas selvagens para as espécies de *L. amazonensis* que quase todos os compostos, exceto o 4h (108,96  $\mu\text{M}$ ) apresentaram inibição do crescimento parasitário com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 3,28  $\mu\text{M}$  (4e) a 108,96  $\mu\text{M}$  (4h) (Tabela 2). O 4e foi o composto mais ativo em relação aos demais para promastigotas de *L. amazonensis*. O composto 3k não apresentou dados de inibição de crescimento para calcular a IC<sub>50</sub>. Quando observada esta atividade frente as espécies de *L. infantum*, os valores de IC<sub>50</sub> variaram entre 1,01  $\mu\text{M}$  (3a) à 28,56  $\mu\text{M}$  (4j). Sendo o 3a para esta espécie o composto mais ativo. A Miltefosina foi utilizada como fármaco de referência e apresentou o valor de inibição de 15,8  $\mu\text{M}$  e 8,42  $\mu\text{M}$  para as duas espécies respectivamente. Outros compostos também se destacaram com uma boa ação leishmanicida frente as promastigotas de *L. infantum* quando comparado, por exemplo ao fármaco de referência também testado (8,42  $\mu\text{M}$ ) sendo eles, 4e (1,67  $\mu\text{M}$ ) e 3g 4,54 ( $\mu\text{M}$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Atividade leishmanicida – IC<sub>50</sub> em  $\mu\text{M}$  de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas selvagens de *L. amazonensis* e *L. infantum***

Compostos	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
3a*	<b>7,38</b>	<b>1,01</b>
3g	<b>3,74</b>	<b>4,54</b>
3k	N/D	N/D
4a*	<b>4,45</b>	16,13
4e	<b>3,28</b>	<b>1,67</b>
4g	108,96	N/D
4h	26,7	N/D
4j	<b>8,74</b>	28,56
4m	<b>5,41</b>	N/D
Miltefosina	15,8	8,42

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.  
 IC<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% das promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* / ND: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração de inibição) / \*: Compostos testados em uma concentração menor que os demais.

### 6.1.2 Avaliação dos compostos sobre cepas transgênica de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Os ensaios de avaliação de atividade leishmanicida também foram avaliados através do ensaio colorimétrico utilizando cepas transgênicas. Estas permite executar uma triagem mais rápida dos compostos em relação aos métodos mais tradicionais, podendo ser considerado uma metodologia alternativa na descoberta de novas moléculas (DA SILVA SANTOS et al., 2019). Como descrito na Tabela 3, foram obtidos os valores de inibição sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, que variaram entre 6,65  $\mu\text{M}$  (4e) a 279,44  $\mu\text{M}$  (4h), com os compostos 4e (6,65  $\mu\text{M}$ ), 3g (7,4  $\mu\text{M}$ ), 3k (16,91  $\mu\text{M}$ ) e 4a (18,51  $\mu\text{M}$ ), respectivamente, destacando-se com os melhores valores de inibição quando comparados a Miltefosina (26,94  $\mu\text{M}$ ). Com relação a ação leishmanicida frente a promastigotas de *L. infantum* houve uma variação de 6,71  $\mu\text{M}$  (3g) a 109,52  $\mu\text{M}$  (4h)  $\mu\text{M}$ . Com exceção dos compostos 4h (109.52  $\mu\text{M}$ ), 4m (55.36  $\mu\text{M}$ ) e 4g (63.56  $\mu\text{M}$ ) todos os outros apresentaram excelentes valores de inibição, sendo menores que a Miltefosina (38,20  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 3). Para as formas amastigotas observou-se que a maioria dos compostos não apresentaram valores satisfatórios de inibição do crescimento de 50% para as duas espécies quando comparado ao fármaco de referência também testado. Os compostos que apresentaram melhores valores de  $\text{IC}_{50}$  foi o 3a (18,2  $\mu\text{M}$  / 27,36  $\mu\text{M}$ ) para as duas espécies, respectivamente. A Miltefosina (7,07  $\mu\text{M}$  / 1,72  $\mu\text{M}$ ) apresentou grande eficácia frente as duas espécies avaliadas (Tabela 3).

**Tabela 3 - Atividade leishmanicida – IC<sub>50</sub> em µM de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas e amastigotas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum***

Compostos	Promastigotas		Amastigotas	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
3a*	N/D	<b>8,59</b>	18,2	27,36
3g	<b>7,4</b>	<b>6,71</b>	30,6	39,89
3k	16,91	16,61	28,17	37,05
4a	18,51	16	60,71	>100
4e*	<b>6,65</b>	<b>6,8</b>	77,8	50,28
4g	54,36	63,56	>100	>100
4h	279,44	109,25	>100	>100
4j	41,04	23,92	>100	>100
4m*	107,27	55,36	>100	>100
Miltefosina	26,94	38,2	7,07	1,72

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

IC<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% das promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* / ND: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração de inibição) / \*: Compostos testados em uma concentração menor que os demais.

## 6.2 Avaliação da atividade citotóxica

### 6.2.1 Células Esplênicas

Os valores da concentração citotóxica para as os esplenócitos murinos, obtidos através do ensaio de MTT, variaram entre 37,2 (3g) a 143,39 (4m) µM como representado na Tabela 4. De todos os compostos testados, o 4m (143,39 µM) foi o que apresentou o melhor valor de citotoxicidade, sendo menos tóxico que a Miltefosina. Entre os demais testados, ainda se destaca o 4h (107,23 µM) que também se mostrou com baixa toxicidade frente a estas células.

### 6.2.2 Células de linhagem Hepática (HepG2)

A atividade citotóxica destes compostos frente as células HepG2, mostrou valores de CC<sub>50</sub> variando entre 83,37 (4j) a >200 µM. Os compostos que mais se destacaram com valores que representam não haver toxicidade sobre estas células foram 3a, 3k, 4h e 4m (>200 µM) como mostra a Tabela 4. Ainda se observou que o 4g (149,48 µM) e 3g (183,0 µM) também apresentaram valores satisfatórios de CC<sub>50</sub> representando baixo potencial citotóxico com quando comparado a Miltefosina (131,55 µM).

### 6.2.3 Células de linhagem macrofágica (RAW 264.7)

O potencial citotóxico dos compostos estudados também foi avaliado sobre as células de linhagem RAW 264.7. Os resultados descritos na Tabela 4 mostrou a  $CC_{50}$  destes variando entre 26,7 (3g) a 68,55  $\mu$ M (Miltefosina). O composto que mais se destacou entre os outros e o fármaco de referência foi o 3a (63,7  $\mu$ M). Entretanto a Miltefosina (68,55  $\mu$ M) apresentou-se com uma toxicidade menor que os demais sobre estas células.

**Tabela 4 Atividade citotóxica –  $CC_{50}$  em  $\mu$ M de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis série frente a células esplênicas, RAW 264.7 e HepG2**

Compostos	Células Esplênicas	Raw 264.7	HepG2
	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
3a	47,2	63,7	>200
3g	37,2	26,7	183
3k	N/D	35,7	>200
4a	41	42,81	110,27
4e	53,8	56,6	67,3
4g	45,91	41,93	149,48
4h	107,23	40,27	>200
4j	60,77	31,57	83,37
4m	143,39	37,41	>200
Miltefosina	125,93	68,55	131,55

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

$CC_{50}$ : Concentração citotóxica para 50% das células

N/D: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração citotóxica)

### 6.3 Índice de Seletividade (IS)

Os compostos ainda foram avaliados quanto a seu índice de seletividade, que corresponde na razão entre os valores de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) para as células de mamíferos e os valores referente a atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ). Quanto maior se apresenta este IS, subentende-se que mais específico é o composto para as espécies do parasito do que as células do hospedeiro mamífero (SILVA, 2018). Os compostos que apresentaram melhores IS sobre as promastigotas selvagens de *L. amazonensis* e *L. infantum* diante das duas espécies sobre as três linhagens celulares: HepG2, Raw 264.7 e Esplenócitos quando comparados a miltefosina, foram (3a, 3g e 4e) como observados na Tabela 5. Com relação aos valores de IS dos compostos que foram avaliados utilizando os dados de  $IC_{50}$  obtidos de promastigota de cepas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os que se apresentaram com mais seletividade para

as três linhagens celulares testadas foram respectivamente 3a, 3g e 4e como descrito na Tabela 6.

**Tabela 5 - Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota selvagens de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis**

<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum</i>			
Composto	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino	Composto	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	43,51	8,64	6,4	3a	318,91	63,34	46,91
3g	48,88	7,14	9,93	3g	40,34	5,89	8,2
3k	N/D	N/D	N/D	3k	N/D	N/D	N/D
4a	24,8	9,63	9,22	4a	6,84	2,65	2,54
4e	20,55	17,27	16,43	4e	40,39	33,95	32,28
4g	5,6	1,57	1,72	4g	N/D	N/D	N/D
4h	2,15	0,37	0,98	4h	N/D	N/D	N/D
4j	9,54	3,61	6,96	4j	2,92	1,11	2,13
4m	87,91	6,91	26,51	4m	ND	ND	ND
Miltefosina	8,33	4,34	7,97	Miltefosina	15,62	8,14	14,95

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

**Tabela 6- Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota transgênica de *L. amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis**

<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum</i>			
Compostos	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino	Compostos	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	N/D	N/D	N/D	3a	37,37	7,42	5,5
3g	24,72	3,61	5,02	3g	27,29	3,99	5,54
3k	13,24	N/D	N/D	3k	13,48	2,15	N/D
4a	5,96	2,31	2,22	4a	6,89	2,68	2,56
4e	10,12	8,51	8,09	4e	9,9	8,32	7,91
4g	2,75	0,77	0,84	4g	2,35	0,66	0,72
4h	0,84	0,14	0,38	4h	2,15	0,37	0,98
4j	2,03	0,77	1,48	4j	3,49	1,32	2,54
4m	4,43	0,35	1,34	4m	8,59	0,68	2,59
Miltefosina	4,88	2,54	4,67	Miltefosina	3,44	1,79	3,3

Fonte: Elaborado pela autora, 2020

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

O IS obtido para as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* indicaram que todos os compostos não apresentam indicativo de seletividade parasitária para os três tipos celulares testados, no entanto, a miltefosina apresentou valores relevantes de seletividade para as duas espécies avaliadas (Tabela 7).

**Tabela 7- Índice de Seletividade (IS) para a forma amastigota transgênica de *L. amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis**

Compostos	<i>L. amazonensis</i>			<i>L. infantum</i>			
	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino	Compostos	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	17,68	3,51	2,6	3a	11,73	2,33	1,73
3g	5,97	0,87	1,21	3g	4,59	0,67	0,93
3k	7,95	1,27	N/D	3k	6,04	0,96	N/D
4a	1,82	0,71	0,68	4a	N/D	N/D	N/D
4e	0,87	0,73	0,69	4e	1,34	1,13	1,07
4g	N/D	N/D	N/D	4g	N/D	N/D	N/D
4h	N/D	N/D	N/D	4h	N/D	N/D	N/D
4j	N/D	N/D	N/D	4j	N/D	N/D	N/D
4m	N/D	N/D	N/D	4m	N/D	N/D	N/D
Miltefosina	18,62	9,7	17,82	Miltefosina	76,6	39,91	73,33

Fonte: Elaborado pela autora, 2020

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

#### 6.4 Produção de óxido nítrico (ON)

Os ensaios realizados de dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes de macrófagos J774 não infectados, indicaram que nenhum composto avaliado no estudo induziu a produção de ON por estas células (dados não mostrados).

#### 6.5 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura por citometria de fluxo

As citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-6 e TNF), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17A) foram avaliadas nos tempos de 24h, 48h, 72h e 6 dias por meio da citometria de fluxo, apenas com os compostos que mais destacaram-se inicialmente nos testes de atividade leishmanicida e citotoxicidade. Os compostos foram 3a, 3g e 4e. Os resultados mostraram que houve uma indução principalmente dos níveis de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, como TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6 (Quadro 1).

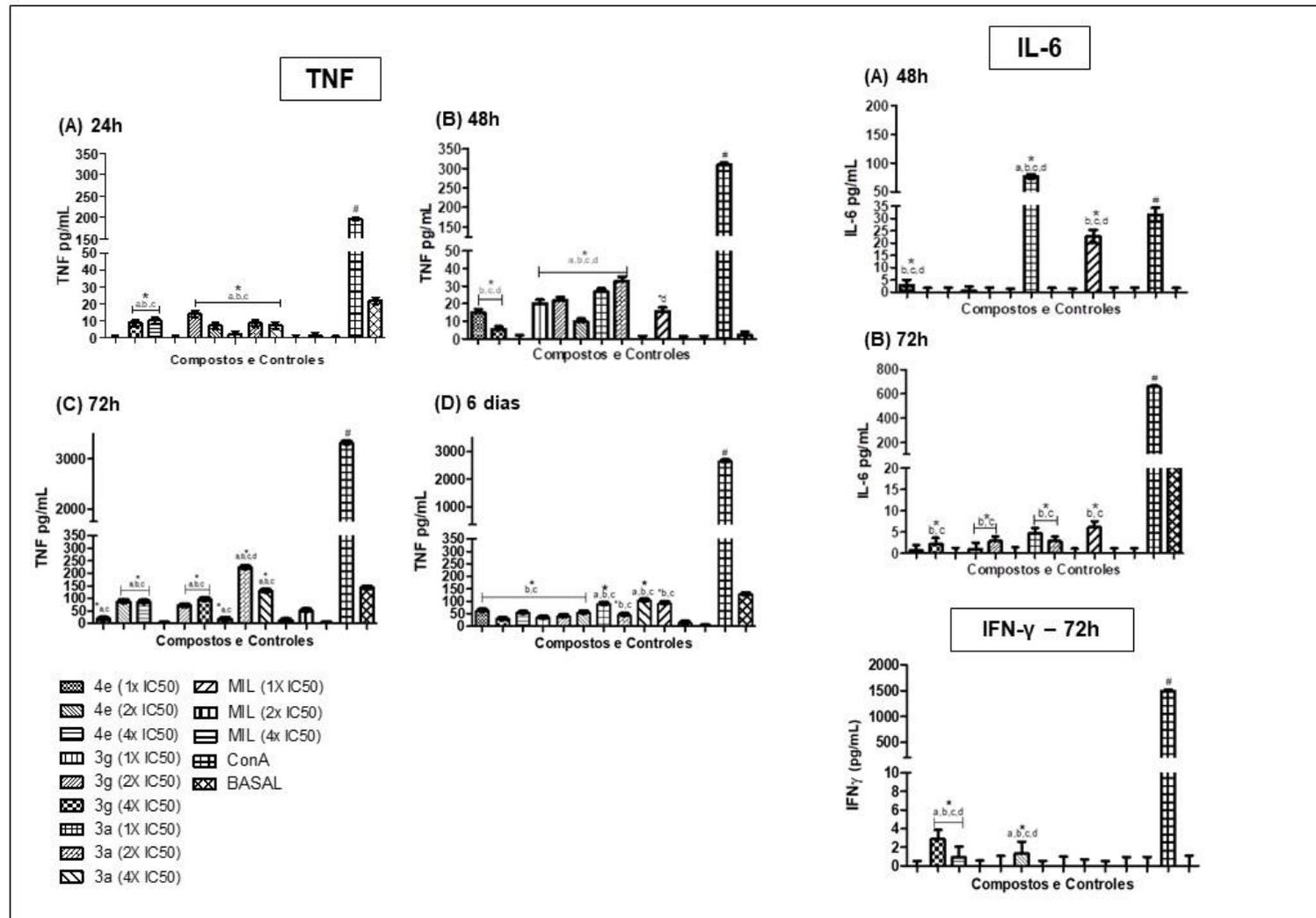
Sobre a produção de TNF, foi possível observar que os três compostos induziram de forma significativa (em relação ao controle positivo ConA e basal, conforme assinalado abaixo) a produção desta citocina nos quatro tempos avaliados. Foi observada uma maior produção nos tempos de 72h e 6 dias (Quadro 1 – gráfico

C e D). No tempo de 24h os compostos 3a, 3g e 4e nas concentrações de 2x e 4x IC50 foram estatisticamente significativos em relação ao tratamento com a Miltefosina (1x 2x e 4x IC50). A partir do tempo de 48h em diante, esta significância comparando os compostos do nosso estudo com o tratamento com a miltefosina também pode ser observada. No tempo de 48h os compostos 3a e 3g também induziu a produção de TNF de forma significativa quando comparado ao basal.

Com relação a indução de IFN- $\gamma$  foi observado no tempo de 72h que o composto 4e induziu sua produção nas concentrações de 2x e 4x IC50 e o 3g na concentração de 4x IC50. Estas produções foram estatisticamente significativos quando comparados a miltefosina nas concentrações 1x, 2x e 4x IC50 e ao controle basal (Quadro 1 - Gráfico IFN- $\gamma$  72h).

A produção de IL-6 foi observada no tempo de 48h com o composto 3a na concentração 1xIC50 estimulando a indução desta citocina de forma significativa, quando comparada aos tratamentos com a miltefosina e aos controles Conavalina A (ConA) e basal (Quadro 1 – IL-6 / Gráfico A). No tempo de 6 dias os compostos 4e na concentração 2xIC50 e 3a 1xIC50 e 2xIC50 também se mostraram significativos em relação ao tratamento com a miltefosina (Quadro 1 – IL-6 / Gráfico B).

Quadro 1 - Indução da produção da citocina TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$  pelos compostos nos tempos de 24h, 48h, 72h e 6 dias



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Legenda: a: tratamento com miltefosina 1xIC50; b: tratamento com miltefosina 2xIC50; c: tratamento com miltefosina 4xIC50; d: controle basal; #: controle positivo Concalina A (ConA); \*: correspondem a valores significativos  $p < 0,05$  quando comparado ao tratamento com a miltefosina e o controle basal

## 7 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças de caráter endêmico em diversos países no mundo. O tratamento disponibilizado principalmente os antimoniais pentavalentes, que ainda são os mais utilizados, vem apresentando ao longo do tempo diversos problemas. A preocupação dar-se principalmente pelas limitações que são vistas neste esquema terapêutico atual como: alta toxicidade, diversos efeitos colaterais, alto custo e casos de resistência (PONTE-SUCRE et al., 2017; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Tendo em vista as falhas recorrentes do atual tratamento, destaca-se a necessidade de descoberta de novas abordagens terapêuticas com eficiente potencial leishmanicida e baixos níveis de toxicidade ao homem (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

Alguns estudos já vêm demonstrando classes de compostos derivados das piridinas tiazóis exibindo atividades antiparasitárias importantes. Nava-Zuazo e colaboradores (2014) descreveram em seu trabalho a atividade de compostos com a presença do anel tiazólico em sua estrutura química inibindo o crescimento promastigotas de *L. amazonensis*. Queiroz (2019) também descreveu a atividade leishmanicida frente a promastigotas e amastigotas de uma classe de compostos com a presença desses anéis piridil-tiázol frente a espécies de *Leishmania*. Estes dados assemelham-se ao que foi visto em nosso trabalho sugerindo que esses núcleos possuem atividades leishmanicidas promissoras.

Os compostos do nosso estudo foram testados quanto as suas propriedades leishmanicidas para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os testes iniciais de contagem em câmara de Neubauer destacaram principalmente para as duas espécies os compostos 3a, 3g e 4e com os melhores valores de IC50 em comparação a droga de referência. Os ensaios realizados com cepas transgênicas compostos também destacaram 4e e 3g com melhores valores de inibição de crescimento frente a estas espécies.

Um estudo realizado por Silva et. al (2017) avaliou a atividade antiproliferativa desta mesma série, derivada da estrutura do 1,3 piridil- tiázol contra espécies de *Trypanosoma cruzi*, parasito pertencente à família dos Tripanossomatídeos, onde inclui-se também as espécies do gênero *Leishmania*. Os mesmos compostos que em nosso trabalho tiveram excelente atividade leishmanicida, também demonstraram neste estudo ser potentes agentes tripanocidas. Isto torna evidente que a estrutura

química dos anéis piridil-tiazol podem estar atuando de forma eficiente contra tripanossomatídeos.

Nava-Zuazo e colaboradores (2014) descreveram em seu trabalho a atividade de compostos com a presença do anel tiazólico em sua estrutura química inibindo o crescimento promastigotas de *L. amazonensis*. Queiroz (2019) também descreveu a atividade leishmanicida de uma classe de compostos com a presença desses anéis piridil-tiazol frente a espécies de *Leishmania*. Estes dados assemelham-se ao que foi visto em nosso estudo sugerindo que esses núcleos possuem atividades leishmanicidas promissoras.

Também foi avaliado a ação destes compostos frente a forma evolutiva amastigota das duas espécies utilizadas no estudo. Esta forma é observada no interior das células do hospedeiro vertebrado sendo capaz de desenvolver a doença nestes indivíduos. Dessa maneira, é importante ressaltar que a ação leishmanicida destas moléculas sobre estas células é muito relevante no processo de descoberta de novas drogas (QUEIROZ, 2019). Os compostos do nosso estudo não apresentaram valores relevantes de inibição de crescimento destas formas evolutivas, quando comparado a droga de referência.

Estes resultados podem estar refletindo o que Muylder e colaboradores (2011) abordam em seu estudo, onde descreveram que muitas vezes compostos ativos contra formas promastigotas podem ser ineficientes contra as amastigotas intracelulares. Isto ocorre devido à dificuldade destes em atravessar a membrana celular do hospedeiro, em geral dos macrófagos, bem como também o vacúolo parasitóforo até chegar ao parasito (DE MUYLDER et al., 2011). Entretanto o impedimento da ação dos compostos de chegarem até ao parasito dentro das células do hospedeiro, pode ser contornado posteriormente com a adição destas moléculas em nanoestruturas que permitem a entrega mais precisa diretamente no alvo (PATRA et al., 2018)

Um critério importante a ser considerado no estudo de novas drogas, consiste na avaliação dos efeitos tóxicos que estas moléculas possam estar causando as células viáveis do hospedeiro mamífero (CHINEDU; ENEGIDE, 2013). Desta forma, além da avaliação dos efeitos microbicida dos compostos sobre os parasitos, também foi avaliado o potencial citotóxico destes frente a algumas linhagens celulares. Em nosso estudo a citotoxicidade de todos os compostos foi avaliada sobre células do

sistema imune como as células esplênicas e macrófagos (RAW 264.7) e sobre células de linhagem hepática (HepG2), sendo estas consideradas importantes no processo de metabolização de drogas (SILVA, 2018). Diante de todos os tipos celulares analisados, as células hepáticas foram as quais quase todos os compostos apresentam menos toxicidade que a droga de referência. Para as células esplênicas apenas os compostos 4m e 4h se destacaram com menos citotoxicidade quando comparada a miltefosina. Na avaliação da citotoxicidade frente a linhagem de macrófagos RAW 264.7 apenas o composto 3a mostrou-se ser menos tóxico também quando comparado a droga de referência.

O índice de seletividade calculado a partir da razão entre os valores de CC50 e IC50 obtidos, demonstrou também que os compostos 3a, 3g e 4e destacaram-se mais seletivos ao parasito do que as células de mamíferos principalmente para RAW.264.7 e HepG2 para as duas espécies utilizadas, mostrando o seu potencial promissor.

Outra característica importante que também deve ser considerada no estudo de novos compostos é o sistema imunológico do indivíduo frente a infecção pelo parasito. As *Leishmanias* conseguem desde o início da infecção ativar mecanismos da imunidade inata e adaptativa que podem contribuir para sua sobrevivência (MIRZAEI et al., 2021). Desta forma, identificar novos compostos com propriedades leishmanicidas que possam auxiliar na modulação de uma resposta imune protetora ao indivíduo é de extrema relevância (SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

Em nosso trabalho buscamos compreender o papel imunomodulador destes compostos visando sua contribuição nos mecanismos imunológicos desenvolvidos na infecção por *Leishmania*. No que diz respeito a estimulação da produção de citocinas após o tratamento com os compostos 3a, 3g e 4e em sobrenadantes de cultura *in vitro*, foi possível observar a produção de TNF e IFN- $\gamma$ , citocinas pró-inflamatórias que compõem o perfil de resposta Th1. Estudos relatam que respostas mediadas por células Th1 estão intimamente relacionadas a resistência do indivíduo na leishmaniose (ALEXANDER; BRYSON, 2005; DAYAKAR et al., 2019; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; MIRZAEI et al., 2021). A produção de IFN- $\gamma$  e TNF pode induzir a atividade microbicida dos macrófagos através da produção de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e óxido nítrico (ON) capaz de direcionar o curso da infecção desde o estágio inicial (ROSTAMI; KHAMESIPOUR, 2021). A indução destas

citocinas observadas pelos compostos da nossa pesquisa indica uma possível modulação que pode conduzir a uma resposta direcionada a proteção do indivíduo.

Também foi avaliado a produção de ON em macrófagos não infectados tratado com os compostos, porém os resultados não indicaram uma produção significativa de ON quando dosados nos sobrenadantes de cultura destas células. Embora nossos compostos não induziram produção de ON (dados não mostrados), esse mediador é importante, atuando como um mecanismo de defesa que conseguem eliminar o parasito no início da infecção. Entretanto esta possivelmente não foi uma via de modulação em que os compostos pudessem estar atuando, ou abordagem mais específicas deverão ser usadas para mensurar corretamente esse radical em estudos futuros como por exemplo em um contexto de infecção. É importante ressaltar que o NO é um radical gasoso com uma vida fisiológica muito curta, o que dificulta a sua mensuração e extrapolação dos dados encontrados (BRYAN; GRISHAM, 2007).

A indução dos níveis de IL-6 foi observada de forma significativa principalmente pelo composto 3a e comparação a droga de referência e ao basal. No tempo de 6 dias além do composto 3a o 4e também se mostrou ser indutor desta citocina. Alguns estudos mostram que a IL-6 pode apresentar uma dualidade no que diz respeito as suas funções no curso da infecção, podendo exibir um papel tanto pró quanto anti-inflamatório contribuindo para resistência ou para progressão da doença (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; STÄGER et al., 2006). A produção de IL-6 pode ser desencadeada por diversas células, como células dendríticas, macrófagos e monócitos induzido por outras citocinas presentes no meio como exemplo o TNF (NASEEM; IQBAL; MUNIR, 2016). Isto ajuda a explicar o que foi visto em nosso trabalho, onde a produção de IL-6 por ter sido induzida a partir dos níveis de TNF, e pode estar associada também ao perfil de resposta Th1 que confere proteção ao hospedeiro.

Neste estudo apresentamos resultados visando a seleção de novos compostos para o tratamento de duas importantes espécies causadoras de Leishmaniose, as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foi possível selecionar entre os demais, os compostos 3a, 3g e 4e como promissores candidatos a novos fármacos. Estes apresentaram uma atividade leishmanicida relevante frente as promastigotas, bons índices de seletividade e pouca toxicidade frente a células de mamíferos. Ao analisarmos a atividade sobre as formas amastigotas os resultados não foram tão expressivos, no entanto, mais estudos podem ser realizados visando ajustes quanto

a sua solubilidade intracelular. Além disso, vimos que os compostos induziram um perfil de resposta imunológica Th1, que favorece a resolução da doença. Desta maneira, os compostos aqui avaliados se apresentam como promissores nos estudos de novas drogas para tratamento das leishmanioses.

## 8 CONCLUSÕES

- a) Os compostos 3a, 3g e 4e se destacaram entre os demais com os melhores valores de IC<sub>50</sub> para as formas promastigotas em comparação a droga de referência;
- b) Com relação a toxicidade dos compostos frente as linhagens celulares testadas, foi possível observar que a células hepáticas foram as quais quase todos os compostos apresentam menos toxicidade que a droga de referência. Para as células esplênicas os compostos 4m e 4h apresentaram baixa toxicidade, enquanto para os macrófagos RAW 264.7 o 3a mostrou-se ser menos tóxico;
- c) O índice de seletividade calculado demonstrou que os compostos 3a, 3g e 4e foram mais seletivos para as formas promastigotas do que para as células de mamífero, em especial as células RAW 264.7 e HepG2;
- d) Sobre a capacidade imunomoduladora avaliada em sobrenadantes de cultura após o tratamento com os compostos 3a, 3g e 4e, foi possível observar a indução de citocinas associadas a um perfil de resposta Th1 (TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6), algo que pode ser considerado positivo na busca por novas drogas leishmanicidas tendo em vista que este perfil de resposta auxilia para progressão de cura da doença. Quanto a produção de ON, sua produção não foi observada.
- e) Os compostos 3a, 3g e 4e se apresentam como promissores nos estudos de novas drogas para tratamento das leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. F. Visceral Leishmaniasis in Brazil : review article. **Revista Unimontes Científica**. v. 19, n. 1. 2017.
- AIRES, D. C. G. **Derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos como possíveis candidatos ao tratamento da leishmaniose**. 2017. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 2017.
- AL-SAID, M. S. et al. Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 137–141, 2011.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: Paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.
- BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 948–954, 2007.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, Brasília, 2017. [s.l: s.n.].
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose visceral**, Brasília, 2014. [s.l: s.n.].
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. **Estudo do papel de linfócitos T CD4 + e CD8 + e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2013. (Tese) Doutorado em Inovação Terapêutica - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- BRITO, F. F. DE et al. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para leishmaniose tegumentar americana em centro de referência em dermatologia. **Hansen. int**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.
- BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CAMPOS, T. M. et al. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 6, p. 973–982, 2020.
- CARDOSO, M. V. D. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi

agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 2014.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.

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

CHINEDU; ENEGIDE, D. A. The importance of toxicity testing. **J. Pharm. BioSci.**, v. 4, n. 6, p. 146–148, 2013.

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

DA SILVA, E. B. et al. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017b.

DA SILVA SANTOS, A. C. et al. Assessment of *Leishmania* cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 166, n. September, p. 105732, 2019.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.

DE FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 193–204, 2013.

DE MORAES GOMES, P. A. T. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016.

DE MUYLDER, G. et al. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

DE OLIVEIRA DUQUE, M. C. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774–776, 2016.

DE OLIVEIRA, V. V. G. et al. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous

Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DIAS, L. R. S. et al. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 211–219, 2007.

DNDI. **InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH**. v. 1 edição, p. 1–12, 2016.

DNDI. **InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH**. v. 1 edição, p. 1–12, 2018.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1–12, 2012.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need (Nature reviews. Microbiology (2017) 15 4 (217-231)). **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 447, 2017.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GONÇALVES, S. V. C. B.; COSTA, C. H. N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study. **Anais Brasileiros de Dermatologia [online]**. v. 93, n. 3, p. 347-355. 2018.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

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

GUEDES FARIAS, F. T. et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Diagnosticados Com Leishmaniose Visceral Humana No Brasil. **Revista Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, n. 3, p. 485–501, 2019.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016.

JERONIMO, S. M. B.; DE QUEIROZ SOUSA, A.; PEARSON, R. D. **Leishmaniasis**. Thrid Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.

JOSÉ, F. F. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista**

**da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537–542, 2001.

JÚNIOR, L. F. E. F.; COSTA, G. N. J.; DONATO, E. L. et. al. Leishmaniose Tegumentar. In.: **Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde**. v. 50, 2019.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

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

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

LEITE, A. C. L. et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4323–4354, 2019.

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

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

MEIRA, C. DOS S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.

MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, n. September, p. 155297, 2021.

MS, B. et al. Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene) pyridin-2-amine derivatives as potential antibacterials. **International Journal of Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2009.

NASEEM, S.; IQBAL, R.; MUNIR, T. Role of Interleukin-6 in Immunity: a Review. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 4, n. 2, p. 268–274, 2016.

NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic and Medicinal**

**Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1626–1633, 2014.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações Sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana E Sua Expansão No Território Brasileiro. **Revista Percursos**, v. 6, n. 1, p. 147, 2014.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.

OLIVEIRA, A. R. **Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro**. 2014. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2013.

ÖZDEMİR, A. et al. Synthesis and the selective antifungal activity of 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 2080–2084, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [s.l: s.n.].

PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects Jayanta. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.

PIETRZAKI CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55–59, 2017.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, 2014.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

PORFIRIO-PASSOS ET AL. Métodos para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana - Revisão. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1232, 2012.

QUEIROZ, C. M. **Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de Leishmania infantum ( Nicolle , 1908)**. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REIS, L. D. C. et al. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, 2021.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011.

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

SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, 2020.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.

SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 324–333, 2012.

SILVA, A. C. C. **Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

SILVA, E. B. DA. **Concepção, síntese e caracterização de novos derivados piridil-1,3-tiazol como agentes antichagásicos**. 2014. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs

and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.

STÄGER, S. et al. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1764–1771, 2006.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in *Leishmania* infections: Friends or foes? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2019.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, 2011.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 2018.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365–384, 2020.

WHO. Leishmaniasis country profile- 2015 Brazil. **World Health Organization**, v. 2015, p. 1–2, 2017.

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.

YESILOVA, Y. et al. Meglumine antimoniate is more effective than sodium stibogluconate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 1, p. 83–87, 2016.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

## APÊNDICE A – ARTIGO DE OPINIÃO SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL OF TROPICAL PATHOLOGY E COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

### Opinion article

Considerations about leishmaniasis and the current scenario for the development of new treatments.

Vanessa Nunes dos Santos Silva<sup>1,2</sup>, Aline Caroline Da Silva Santos<sup>2</sup>, Valéria Rêgo Alves Pereira<sup>2</sup>, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Parasitology Laboratory, Federal University of Pernambuco- Academic Center of Vitória (UFPE-CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. Postal adress: Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista. Vitória de Santo Antão/PE, Brasil, 55608-680.

<sup>2</sup> Department of Immunology, Oswaldo Cruz Pernambuco Foundation (Fiocruz/PE), Recife, Pernambuco, Brazil. Postal adress: Av. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil, 50670-420.

\*Corresponding author: [carolina.brelaz@gmail.com](mailto:carolina.brelaz@gmail.com), Parasitology Laboratory, Federal University of Pernambuco- Academic Center of Vitória (UFPE- CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. Postal adress: Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista. Vitória de Santo Antão/PE, Brasil, 55608-680

Funding: Silva, V.N. S is the recipient of a MSc fellowship from FACEPE. This work was supported by FACEPE (APQ 0820-2.11.2017).

Abstract (max 250 palavras)

Leishmaniasis is a neglected disease that affects millions of people around the world, mainly populations with low social conditions. It is considered a serious public health problem. Caused by several species of the flagellated protozoa of the *Leishmania* genus, it is transmitted to man through the bite of female sand fly insects. The disease can present itself in cutaneous, mucocutaneous and visceral clinical forms, which varies according to the species of parasite and depending on the host immune response. According to its evolution, the disease can pose serious risks to the individual's health. In general, the treatment for Leishmaniasis is with pentavalent antimonials, used for about 70 years. However, the existing treatments for Leishmaniasis presents problems such as high toxicity, several side effects, cases of resistance, making evident the need to search for new efficient therapeutic approaches. Given all the problems that involve the current treatment of leishmaniasis, there is a urgent need to seek and screen new molecules that have leishmanicidal activity, meet the safety criteria, with low toxicity, low cost, easy administration and that are efficient in the process of cure. In this paper we present some considerations about the situation of leishmaniasis, its treatments and the current panorama for the development of new therapies.

Keywords (3-5): *Leishmania* spp., therapeutics, drug development, Immune response.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis represents a group of diseases present in about 102 countries. It is characterized as a serious public health problem, mainly affecting populations with vulnerable social conditions. Is a disease with 1.3 million new cases and 20,000 to 30,000 deaths each year (Pan American Health Organization, 2019). In addition, the number of people residing in endemic areas, considered to be at imminent risk of transmission, is about 1.7 billion individuals, which makes the disease even more distressing (Pigott et al., 2014). These data also alert that there may be many underreported cases (Ministério da Saúde, 2017; Negrão & Ferreira, 2014).

The disease is caused by several species of flagellated protozoa of the *Leishmania* genus transmitted to man through the bite of female sand fly insects, and may present itself in cutaneous, mucocutaneous and visceral clinical forms, which varies according to the species of parasite and depending on the response host immune system. According to its evolution, the disease can pose serious risks to the individual's health (Da Silva et al., 2017; De Oliveira et al., 2020; Gurung & Kanneganti, 2015).

This genus has a diversity of species and about 22 are capable of infecting humans and other animals. In Brazil, three species are considered main for the development of the tegumentary form: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis*. *L. (L.) infantum* is the cause of the visceral form (Pan American Health Organization, 2019).

The clinical forms observed in leishmaniasis can develop according to some factors, such as the geographical distribution of the parasite and insect vectors, and also those directly linked to the individual, such as the relationship between the parasite species and the host's immune response, age, nutritional status, coinfections with other diseases such as HIV and genetic factors. They are parasites that develop in the cells of the mononuclear phagocytic system of the infected individual (Aires, 2017; Brelaz-de-Castro, 2013).

Depending on the aforementioned factors, the clinical forms can be classified as cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL) leishmaniasis, which occurs when the parasite species present tissue tropism for skin and mucocutaneous tissue macrophages, and the visceral clinical form (VL), when they present tropism for tissues of the reticuloendothelial system in visceral organs (Kulkarni et al., 2014; Santos, 2017). The visceral form is the most severe form of the disease (Kevric et. al., 2015; WHO, 2017).

Regarding CL, epidemiological data show that cases are worldwide distributed, with an estimate of 0.6 to 1.0 million cases. Among these cases, the American continent stands out as a great representative of these numbers, having records from the extreme south of the United States to the north of Argentina, with the exception of Chile and Uruguay (Ministério da Saúde, 2017).

In Brazil, there are CL cases in all regions of the country and, according to the Ministry of Health, between 2003 and 2018, more than 300.000 cases were registered, with an average of 21.158 cases per year. This further highlights the major public health problem that this parasitosis represents. The North and Northeast regions stand out in this scenario, with high prevalence in these numbers. This may be associated with the fact that these regions have extensive areas of Atlantic Forest, places that present a great diversity of vectors and reservoirs with different transmission patterns (Brito et al., 2015; Guedes Farias et al., 2019).

Regarding VL, a high distribution of the number of cases is also observed throughout the world and recurrent outbreaks have been occurring in eastern Africa, causing high morbidity and mortality in these regions. This highlights this clinical form of the disease, in view of the high lethality that is observed in immunocompromised individuals and cases of coinfection with HIV. Epidemiological data suggest that there is an incidence of about 0.2 to 0.4 million cases of VL in the world, but the vast majority of cases occur in rural and suburban areas of six countries mainly: Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, Sudan and South Sudan (Okwor & Uzonna, 2016; WHO, 2021).

In Brazil, records on the number of VL cases are mainly restricted to rural areas with few urban regions, but over the last few years the disease has also been expanding to urban centers. Currently, all regions of the country confirm cases annually, especially the North, Northeast, Southeast and Midwest regions. The latest data show that this rise in the number of cases was mainly due to the peri-urbanization and urbanization of the disease, a scenario that is strongly related to the migratory flow of people between these regions and the environmental changes that modify the ecosystem (Aguiar & Rodrigues, 2017; Brasil, 2017).

#### CURRENT TREATMENT IN LEISHMANIASIS

The therapeutic scheme adopted as the first line in leishmaniasis is performed using pentavalent antimonials (Sb+5), which have been used for over 70 years. Nowadays, there are two formulations that are available on the market, N-methylglucamine antimoniate (Glucantime®), considered the drug of first choice for treatment in Brazil, and sodium stibogluconate (Pentostan®) whose commercialization is not allowed in the country (Ministério da Saúde, 2017; Zulfiqar et. al., 2017).

According to the World Health Organization (WHO) it is recommended that the therapeutic dose used of these antimonials to be calculated in milligrams according to body weight per day (20 mg Sb+5/kg/day). This is a contraindicated treatment for pregnant women, patients over 50 years of age, patients with heart disease, kidney disease, liver disease and hypersensitivity to medication components (Ministério da Saúde, 2017).

Pentavalent antimonials are used to treat all clinical forms of the disease, being administered intramuscularly or intravenously at the recommended therapeutic dose for a period between 20 and 30 days. During treatment, several adverse effects may develop, such as: arthralgia, myalgia, anorexia, nausea, vomiting, gastric fullness, epigastric pain, heartburn, abdominal pain, pancreatitis, itching, fever, weakness, headache, dizziness, palpitation, insomnia, nervousness, pyrogenic shock, edema and acute renal failure, which can, in the most

severe forms, lead to cardiac, liver and pancreatic changes that can lead to treatment interruption (McGwire & Satoskar, 2014).

The mechanism of action of these drugs, although they are a long established treatment, are not yet fully known. However, it is believed that the pentavalent molecule ( $\text{Sb}^{+5}$ ) acts as a prodrug, being converted into trivalent antimony ( $\text{Sb}^{+3}$ ), which gives them greater toxicity and allows interfering with bioenergetic pathways, such as the fatty acid oxidation process and glycolysis of amastigote forms (Queiroz, 2019; Rath et al., 2003).

An alternative related to this drug, observed in recent years, is the intralesional treatment with meglumine antimoniate, with the restricted use in cases of localized cutaneous leishmaniasis and for recurrent CL. This form of drug application has much milder side effects than those observed in systemic administration. A study by Yesilova et al. (2015) showed the effectiveness of this treatment in patients infected with *L. tropica* and/or *L. major* who presented cure with total wound healing (De Oliveira Duque et al., 2016; Yesilova et al., 2016).

Despite the description of its potent action against the parasite, these drugs have several factors that limit their use. Among the great challenges described are its high toxicity, its high cost, the mode of administration and the long time of use, requiring several doses to reach the effective therapeutic concentration (Chakravarty & Sundar, 2019) This can lead to withdrawal by the patient and the emergence of resistant strains, which have been reported, indicating failures throughout this treatment (Meheus et al., 2010). Studies highlight that India is the country in which the main reports of this resistance are found (Haldar et. al. 2011; Zulfiqar et. al. 2017).

For cases that are not successful in the treatment with these first-line drugs, or are contraindicated, second-line drugs are available with Amphotericin B (AmB) and Pentamidine (De Vries et. al. 2015; Ministério da Saúde, 2017). With respect to Amphotericin B, it has excellent activity against the evolutionary forms of Leishmania. The parasite membrane contains ergosterol and the mechanism of action of this drug is associated with binding to these

sterols, implying an increased cell permeability, which leads to the loss of cations such as  $K^+$  and causes parasitic death (Chávez-Fumagalli et al., 2015) The administration dosage recommended by the Ministry of Health is 0.7 to 1.0 mg/kg/day, with a total dose of 25 to 40 mg/kg, administered intravenously. The side effects observed are related to its toxicity and include infusion reactions, fever, hypokalemia, anorexia, hypotension, myocarditis and a more aggravated impairment of liver and kidney functions, being contraindicated for patients with renal failure (Burza; et al, 2018).

In order to reduce these toxicity levels, physicochemical modifications were carried out in the AmB structure, and liposomal amphotericin B (AmBisome®), amphotericin B in colloidal dispersion (Amphocil®) and amphotericin B in lipid complex (Abelcet®) were developed. These formulations use a slower release of the drug in nanostructured systems capable of forming micelles that, when captured by macrophages, release the drug inside the infected cells. It is recommended by the WHO for the treatment of the disease, due to its effectiveness and reduced toxicity compared to free AmB. Side effects were also reduced, including the nephrotoxic effect presented by the conventional formulation. Although liposomal AmpB presents satisfactory results for the treatment of the disease when compared to conventional ones, the therapy based on this new formulation requires a high cost and hospitalization, which often makes its use unfeasible. (Chávez-Fumagalli et al., 2015; Oliveira et al., 2013; Singh et al., 2016).

Regarding to Pentamidine, another drug considered to be the second choice in the therapeutic scheme for the treatment of leishmaniasis, is a class of aromatic diamines that has also shown great leishmanicidal efficacy. However, it has great toxicity with the presentation of severe cardiac and gastrointestinal side effects including pancreatitis, cardiac arrhythmias, leukopenia, acute renal failure, hypocalcemia, and ventricular tachycardia (Ghorbani & Farhoudi, 2018; Ministério da Saúde, 2017). The recommended dose is 4mg/Kg/day, by intramuscular or intravenous route of administration. As well as AmpB, the use of this drug

requires high cost and a greater need for more complex services for its administration (Ministério da Saúde, 2017).

Another drug used is Miltefosine (Impavido<sup>TM</sup>), a drug that was initially developed as an antineoplastic and was redirected to treat leishmaniasis, due to its high effectiveness in combating the parasite. This drug became the first treatment for oral disease in some countries, being effective in all clinical forms, working as another option for cases of resistance to antimonials (Santos et al., 2020; Tiunan et al., 2011). Despite its efficient action, as well as other established drugs, miltefosine also presents high toxicity with gastrointestinal and teratogenic effects, being contraindicated for pregnant women. A formulation of this drug was authorized for veterinary purposes (Milteforan<sup>®</sup> - Virbac) to treat canine visceral leishmaniasis (Queiroz, 2019). Even though its effectiveness is reported in countries like India, in other countries of the new world like Colombia, Bolivia and Brazil this efficiency can vary according to the species of *Leishmania* (Santos et al., 2020; Soto et al., 2004).

Some other drugs such as Paromomycin, azithromycin, ketoconazole, fluconazole and others considered antifungal have shown good leishmanicidal activity and are adopted as treatment for cases of ACL. However, its results are not so conclusive, as its mechanisms of action against the parasite are not yet fully elucidated (Brelaz-de-Castro, 2013; Goto & Lindoso, 2010).

Given the flaws observed in the current therapeutic arsenal that is available, it is important to search for new molecules with effective leishmanicidal action with low toxicity (more selective to the parasite and less toxic to the infected individual) coupled with a low cost to fight this disease (Queiroz, 2019). One of the ways of improvement can be to change the chemical constituents used in the synthesis of drugs, and in the development of therapies associated with the modulation of the host's immune system, as it plays an important role in the development of the disease (Singh et al., 2012).

## CHALLENGE IN THE STUDY OF NEW COMPOUNDS

Given the scenario of currently available drugs and according to the Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi) (2018), the search for new molecules for the treatment of leishmaniasis is a great challenge, mainly because it is necessary to overcome the limitations found in current treatments. It is essential to search for compounds with low toxicity, effective for all clinical forms of the disease and, above all, with minimal side effects to the individual (DNDi, 2018).

Based on the Target Product Profile (TPP) strategies, the DNDi adopts some criteria that can be considered as a basis to meet the challenges in the study of new molecules. These criteria are divided into: what is considered ideal and acceptable in a new treatment for tegumentary and visceral leishmaniasis (DNDi, 2018) (Table 1).

Tabela 8 - Target Product Profile for the development of new drugs to combat leishmaniasis

Cutaneous and Visceral Leishmaniasis		
Criteria	Ideal	Acceptable
Target species	All species	(Cutaneous form) <i>L. tropica</i> ou <i>L. braziliensis</i> (Visceral form) <i>L. donovani</i>
Target population	All	> 9 months of age and Immunocompetents
clinical effectiveness	> 95%	>90%
Formulation	(Cutaneous form) Oral /Tópica (Visceral form) Oral / Intramuscular	Not parenteral, or with few doses if parenteral or intramuscular

		(Cutaneous form)
	(Cutaneous form)	Oral: twice daily for 28 days
	Oral <7 days	
	Topic $\leq$ 14 days	Tópica: 28 dias
Treatment regimen	(Visceral form)	(Visceral form)
	Oral: 1 / dia for 10 days	<10 days orally
	Intramuscular: 3 doses/10 days	> 3 intra-muscle injections in 10 days
Contraindications	None	Pregnancy / Lactation
Safety / tolerability	No tolerance for adverse effects requiring monitoring	Safety monitoring at the primary health care level

Source: Adapted from DNDi (2020); Borsari et. al. (2018).

Associated with these factors, it is also important to include in the search for new compounds those that may act as immunomodulators, stimulating an immune response that can induce the therapeutic objective. This is important considering that the evolution towards a cure in cases of leishmaniasis is linked to several aspects and one of them is the individual's immune response (Field et al., 2017; Singh et al., 2016)

The immune response plays an important role in the progression of healing and the course of disease development. Studies report the role of T cell-mediated immune responses in this parasitosis, with cytokines associated with a Th1 profile (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12) leading to the activation of macrophages and parasite death, and functioning as a protective immunity, and the production of Th2 cytokines (IL-4, IL 5 and IL-10) causing the evolution of the disease with the replication and persistence of the parasite (Dayakar et al., 2019; Maspi et al. 2016; Scorza et al 2017). Therefore, it is important to consider this response when developing new drugs.

For the development of new drugs active against *Leishmania* species, it is recommended that they present efficacy against the parasite, and that they are planned for a short-term

treatment model with safety and tolerability for patients. Even the study and modification of synthetic molecules whose biological properties are already known or studied can help in the discovery of effective drugs for the treatment of leishmaniasis (DNDi, 2018).

Some parameters adopted by DNDi are used to better target studies of new therapeutic approaches and have already been discussed in Table 1. A study by Don and Ioset (2014) also addresses some of these characteristics. The study brings indicators in which a new molecule must have to be considered promising. These parameters are mainly related to the effectiveness of these new compounds already in the initial phase, that is, in *in vitro* tests. Those with IC50 values  $\leq 10 \mu\text{M}$  are considered promising, especially for the amastigote form, and that are allied to a 10-fold higher selectivity to the parasite than mammalian cell lines (Don & Ioset, 2014).

#### CONCLUDING REMARKS

Therefore, due to the absence of compounds that selectively act on the parasite that causes leishmaniasis with minimal harm to humans, strategies and studies on new therapeutic approaches, especially those in which the compound is associated with immune modulation, are very important for public health and should be considered in the development of drugs for the disease.

#### REFERENCES

- AGUIAR, P. F. UNIMONTES CIENTÍFICA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL : ARTIGO DE REVISÃO Visceral Leishmaniasis in Brazil : review article. 2017.
- AIRES, D. C. G. DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E TIAZOLIDINÔNICOS COMO POSSÍVEIS CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE. v. 4, p. 9–15, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 2017.
- AL-SAID, M. S. et al. Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 137–141, 2011.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: Paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

- BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 948–954, 2007.
- BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l.: s.n.]. v. 1
- BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL, M. DA S. Leishmaniose visceral Situação Epidemiológica da. **10/2017**, p. 25, 2017b.
- BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. v. 50, 2019.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. MARIA CAROLINA ACCIOLY BRELAZ DE CASTRO Estudo do papel de linfócitos T CD4 + e CD8 + e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana Orientadora : Profa . Dra . Valéria Rêgo Alves Pereira. 2013.
- BRITO, F. F. DE et al. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para leishmaniose tegumentar americana em centro de referência em dermatologia. **Hansen. int**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.
- BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CAMPOS, T. M. et al. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 6, p. 973–982, 2020.
- CARDOSO, M. V. D. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48–59, 2014.
- CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.
- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.
- CHINEDU; ENEGIDE, D. A. The importance of toxicity testing. **J. Pharm. BioSci.**, v. 4, n. 6, p. 146–148, 2013.
- DA SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 57–65, 2017a.
- DA SILVA, E. B. et al. Desing and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new

thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017b.

DA SILVA, E. B. et al. Design and synthesis of potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017c.

DA SILVA SANTOS, A. C. et al. Assessment of *Leishmania* cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 166, n. September, p. 105732, 2019.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.

DE FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 193–204, 2013.

DE MORAES GOMES, P. A. T. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016.

DE MUYLDER, G. et al. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

DE OLIVEIRA DUQUE, M. C. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774–776, 2016.

DE OLIVEIRA, V. V. G. et al. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DIAS, L. R. S. et al. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 211–219, 2007.

DNDI. InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH. v. 1 edição, p. 1–12, 2016.

DNDI. InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH. v. 1 edição, p. 1–12, 2018.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1–12, 2012.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need (Nature reviews. Microbiology (2017) 15 4 (217-231)). **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 447, 2017.

- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.
- GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
- GUEDES FARIAS, F. T. et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Diagnosticados Com Leishmaniose Visceral Humana No Brasil. **Revista Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, n. 3, p. 485–501, 2019.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.
- HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.
- HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016.
- JERONIMO, S. M. B.; DE QUEIROZ SOUSA, A.; PEARSON, R. D. **Leishmaniasis**. Thrid Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.
- JOSÉ, F. F. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537–542, 2001.
- KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.
- KULKARNI, M. M. et al. Design of protease-resistant pexiganan enhances antileishmanial activity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1971–1976, 2014.
- LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.
- LEITE, A. C. L. et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4323–4354, 2019.
- LESSA, J. A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 30, n. 2, p. 372–380, 2011.
- MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in

- cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.
- MEIRA, C. DOS S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
- MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, n. September, p. 155297, 2021.
- MS, B. et al. Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene) pyridin-2-amine derivatives as potential antibacterials. **International Journal of Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2009.
- NASEEM, S.; IQBAL, R.; MUNIR, T. Role of Interleukin-6 in Immunity : a Review. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 4, n. 2, p. 268–274, 2016.
- NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1626–1633, 2014.
- NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações Sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana E Sua Expansão No Território Brasileiro. **Revista Percurso**, v. 6, n. 1, p. 147, 2014.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.
- OLIVEIRA, A. R. Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro. p. 101, 2014.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- OLIVEIRA, L. F. G. et al. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2013.
- ÖZDEMİR, A. et al. Synthesis and the selective antifungal activity of 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 2080–2084, 2010.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [s.l: s.n.].
- PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.
- PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects Jayanta. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.

- PIETRZAKI CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55–59, 2017.
- PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, 2014.
- PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.
- PORFIRIO-PASSOS ET AL. Métodos para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana - Revisão. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1232, 2012.
- QUEIROZ, C. M. Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* ( Nicolle , 1908 ) Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e ama. 2019.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.
- REIS, L. D. C. et al. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 2007.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.
- ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.
- ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, 2021.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011.
- SANTOS, A. C. DA S. Estudos in vitro de novos candidatos a fármacos anti- *Leishmania*. **Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife**, p. 149 f, 2017.
- SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, 2020.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

- SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.
- SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 324–333, 2012.
- SILVA, A. C. C. Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas. 2018.
- SILVA, E. B. DA. CONCEPÇÃO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS PIRIDIL-1,3-TIAZOL COMO AGENTES ANTICHAGÁSICOS. 2014.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.
- SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.
- SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.
- STÄGER, S. et al. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1764–1771, 2006.
- STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in *Leishmania* infections: Friends or foes? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2019.
- TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, 2011.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 2018.
- VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365–384, 2020.
- WHO. Leishmaniasis country profile- 2015 Brazil. **World Health Organization**, v. 2015, p. 1–2, 2017.
- WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.
- YESILOVA, Y. et al. Meglumine antimoniate is more effective than sodium stibogluconate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 1, p. 83–87, 2016.
- ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

- 1 Who. *Leishmaniasis*. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>

The screenshot shows the user interface of the Open Journal Systems (OJS) submission platform. At the top, the page title is "Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Path..." and the user is logged in as "carolinacastro". The main heading is "Submissões" (Submissions). Below this, there are two tabs: "Fila" (Queue) with a count of 1, and "Arquivos" (Files). A search bar with the text "Buscar" and a "Nova Submissão" (New Submission) button are visible. The main content area is titled "Minhas Submissões Designadas" (My Designated Submissions) and contains a single submission entry:

ID	Author	Title	Status	Actions
69817	Accioly Brelaz de Castro et al.	Considerations about leishmaniasis and the current scenario for the development of new treatments: Leishmaniasis treatments	Submissão	▼

At the bottom of the page, it states "Platform & workflow by OJS / PKP".

## APÊNDICE B – Artigo em Preparação

### Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico, leishmanicida e capacidade imunomoduladora de novas piridinas-tiazóis

#### RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causada por diversas espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Configurando-se como um grave problema de saúde pública, o tratamento existente apresenta alta toxicidade, diversos efeitos colaterais e casos de resistência, tornando evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida, a citotoxicidade e a capacidade imunomoduladora de novas piridinas tiazóis. Neste estudo foram utilizados nove compostos derivado das piridinas tiazóis, para investigar a atividade leishmanicida sobre diferentes formas evolutivas promastigotas e amastigotas selvagens e transgênicas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*. A atividade citotóxica foi avaliada sobre esplenócitos murinos, células HepG2 e RAW264.7. O potencial imunomodulador foi avaliado mediante a dosagem da produção de Óxido nítrico (ON) em macrófagos J774 não infectados e a dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de cultura de esplenócitos murinos através do kit CBA. Os resultados obtidos sobre a atividade leishmanicida para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, indicaram que os compostos 3a, 3g e 4e que apresentaram melhores valores de IC<sub>50</sub> para as duas espécies, considerando as cepas selvagens e transgênicas quando comparado a miltefosina. Quanto a citotoxicidade os compostos mostraram ser menos tóxicos frente as células HepG2 em relação a miltefosina, droga de referência. Para as células esplênicas apenas compostos 4h e 4m se destacaram em relação a miltefosina, enquanto para os macrófagos RAW 264.7 apenas o 3a mostrou-se ser menos tóxico. Não foi observada a produção de ON induzido pelos compostos. Quanto a produção de citocinas observou-se a indução de citocinas relacionadas ao perfil Th1 (TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6) que desempenham papel importante para resolução da doença. De acordo com os resultados obtidos os compostos 3a, 3g e 4e se destacaram entre os demais como potenciais candidatos a novos fármacos, apresentando atividades leishmanicidas relevantes frente as promastigotas, bons índices de seletividade e pouca toxicidade. Além disso, eles induziram citocinas importantes que compõem um perfil de resposta imunológica Th1, associado ao combate da infecção. Dessa maneira os compostos 3a, 3g e 4e apresentam-se como promissores nos estudos de novas drogas para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chaves: Leishmanioses. Compostos sintéticos. Tiazóis piridina. Imunomodulação.

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com cerca de 22 espécies sendo patogênicas aos humanos (VALERO; URIARTE, 2020). Com incidência de casos em diversas populações ao redor do mundo, apresentam-se como um grave problema de saúde pública. Encontram-se presentes em cerca de 102 países, com uma estimativa de 350 milhões de pessoas vivendo em regiões com risco de contrair a infecção (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A doença causa em humanos uma série de síndromes clínicas, que acomete a pele, mucosas e vísceras. O grau de evolução destas manifestações irão depender da espécie do parasito envolvido na infecção, assim como também a resposta imune do hospedeiro (ARENAS et al., 2017; GURUNG; KANNEGANTI, 2015). No Brasil, três espécies são consideradas principais para o desenvolvimento da forma tegumentar: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Já a *L. (L.) infantum* é a causadora da forma visceral (BRASIL, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Um dos fatores que agravam as leishmanioses inclui o atual esquema terapêutico ofertado (DA SILVA et al., 2017a; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). A primeira opção utilizada são os antimoniais pentavalentes, fármacos que apresentam alta taxa de toxicidade e diversos efeitos colaterais. Como segunda opção outros medicamentos como a Pentamidina, Anfotericina B e a Miltefosina são utilizados (TIUMAN et al., 2011).

Além dos problemas devido as características tóxicas dos fármacos, limitações como o alto custo, necessidade de cuidados hospitalares e casos de cepas resistentes também são relatados. Com isto, surge a necessidade da descoberta de um novo modelo de tratamento com drogas de alta eficácia leishmanicida, baixo custo e que não cause danos fisiológicos ao homem (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). É importante incluir na pesquisa compostos que possam vir a atuar como imunomoduladores, uma vez que a sucesso terapêutico está diretamente relacionado a resposta imune do indivíduo (ROATT et al., 2020).

Com a ausência de uma terapia eficiente que seja seletiva apenas do parasito, muitos compostos vêm sendo estudados, dentre eles destaca-se as estruturas químicas dos núcleos tiazol e piridina, com atividades biológicas já descritas como: antibacteriana (BONDOCK; KHALIFA; FADDA, 2007; BATHIA, M.S. et al., 2009), anticâncer (AL-SAID et al., 2011) antiprotozoária, como potentes agente tripanocidas (CARDOSO et al., 2014; DA SILVA et al., 2017). Outros estudos também tem evidenciado ainda mais a importância dessas moléculas, demonstrando êxito no processo inicial de identificação de novos compostos derivados dessas estruturas como novos agentes leishmanicidas (DE OLIVEIRA et al., 2020; QUEIROZ, 2019).

Baseado no potencial dos compostos provenientes dos núcleos piridinas-tiazol, que têm se destacado com diversas propriedades biológicas e associado a necessidade de novos estudos visando à eleição de protótipos competentes a fármacos leishmanicidas, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade biológica de nove compostos derivados das piridinas tiazóis frente as espécies de

*Leishmania amazonensis* e *L. infantum*, bem como seus efeitos citotóxicos em linhagens celulares de mamíferos e capacidade imunomoduladora.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Compostos Sintéticos

Nove compostos da classe piridil-1,3-tiazóis (3a, 3g, 3k, 4a, 4e, 4g, 4h, 4j e 4m) foram sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A rota sintética para obtenção desta classe de compostos foi descrita em trabalho anterior por Da Silva et al. (2017). Para utilização nos ensaios, todos os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA) e estocados a -20° C e foram dissolvidos no meio de cultura adequado para cada experimento.

### 2.2 Parasitos e Esplenócitos murinos

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Parasitas em fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. As formas amastigotas foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas em cultura de células de macrófagos RAW 264.7 em meio RPMI 1640 (Cultilab), suplementado com estreptomicina 100 mg / mL (GIBCO™), penicilina 100 U / mL (GIBCO™) e 10% de SFB, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células esplênicas foram coletadas a partir da eutanásia de camundongos isogênicos (BALB/c). Baço murinos foram removidos em condições assépticas e foram colocados em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) +1% de antibiótico (GIBCO™). As células foram processadas e contadas e a concentração celular foi ajustada de acordo com o experimento a ser realizado. Os procedimentos que foram realizados utilizando células de animais possui aprovação junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IAM) com Registro 102/2016.

### 2.3 Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* dos compostos sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Para uma triagem inicial de avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos, as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram utilizadas. Foram incubadas em meio de cultura Schneider's (Sigma) suplementado a 10% de SFB na concentração ( $1 \times 10^6$  cel./ml) na presença de diferentes concentrações (0.19 a 100 µg/ml) de todos os compostos em placas de 96 poços por 72h. O controle negativo foi determinado com parasitas incubados apenas com meio de cultura, e como controle positivo utilizou-se a droga de referência Miltefosina. A viabilidade parasitária após o tratamento destas células com os compostos foi determinada através da contagem direta dos parasitos em câmara de Neubauer. De acordo com os valores encontrados foi estabelecida a IC<sub>50</sub> (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos). Cada teste foi realizado em duplicata. A atividade antiparasitária destes compostos também foi avaliada através de uma triagem colorimétrica *in vitro*, utilizando-se formas promastigotas com cepas transgênicas de *L. amazonensis* (WHOM/00LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) expressando beta-

galactosidase, permitindo sua quantificação colorimétrica (SANTOS, 2017) (ALINE TALVEZ VOCÊ POSSA SUGERIR UMA FRASE MELHOR). O protocolo de avaliação desta atividade antiparasitária foi realizado conforme está descrito em Santos *et al* (2019).

#### **2.4 Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* dos compostos sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum***

A avaliação da atividade antiparasitária dos compostos sob as formas amastigotas foi realizada com as cepas transgênicas de *L. amazonensis* (WHOM/00LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) (DA SILVA SANTOS *et al*, 2019). Para este fim, foram cultivados macrófagos RAW 264.7 em meio RPMI 1640 (Cultilab), suplementado com estreptomicina 100 mg / mL (GIBCO™), penicilina 100 U / mL (GIBCO™) e 10% de SFB, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos foram contados e ajustados a uma concentração de 4x10<sup>5</sup> células / mL. Em seguida foram plaqueados com 200 µL por poço em placas de 96 poços. As células foram então mantidas por 2h a 37°C e em 5% de CO<sub>2</sub> para adesão. As promastigotas transfectadas foram adicionados aos poços na proporção 15:1 parasita / macrófago. As placas foram então incubadas a 37 °C e em 5% de CO<sub>2</sub> por 6h. As amastigotas que se desenvolveram a partir da infecção de macrófagos com promastigotas foram submetidos a 24 h de incubação com seis concentrações diferentes dos compostos (3,125 a 100 µg / mL). Após este período, os poços foram lavados e foi adicionado a cada poço 50 µL de uma solução de 500 µM de clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), suplementada com 0,5% de Nonidet P-40. As placas foram então incubadas a 23 ° C por 20 min e lidas a 570 nm usando o aparelho Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) para a determinação da IC<sub>50</sub> por análise de regressão. O controle foi estabelecido como poços de reação em branco, consistiu em macrófagos submetidos aos mesmos procedimentos, exceto a incubação com promastigotas transfectados. Os poços de reação em branco receberam o mesmo volume de meio de cultura e solução de CPRG. Todos os ensaios foram realizados conforme estabelecido por SANTOS *et al*. 2019 em triplicata.

#### **2.5 Avaliação da atividade citotóxica sobre células esplênicas, macrófagos RAW 264.7 e células hepáticas HepG2**

A citotoxicidade dos compostos frente a três linhagens celulares foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico do MTT brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bifenil tetrazolium). As células foram mantidas em meio RMPI 1640 (Sigma-Aldrich) completo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações adequadas para cada linhagem celular e foram incubadas por 24h para que aderissem. Após este período de incubação, foi adicionado os compostos em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL) e as placas foram incubadas novamente por um tempo de 48h. Após este período, 25 µL de MTT diluído em PBS (5 mg/mL, p/v) foi adicionado e as placas foram mantidas a 37 °C por 2 h. Posterior a esta incubação, o meio de cultura juntamente com o excesso de MTT foi

aspirado e 100  $\mu$ L de DMSO foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan (Alley et al., 1998). Como controle negativo foram utilizados poços com apenas meio de cultura e células sem tratamento dos compostos. Após o tempo total de incubação, a viabilidade celular foi avaliada em espectrofotômetro com a absorbância lida a 595 nm. A partir desses valores, foram obtidas as concentrações citotóxicas para 50% das células ( $CC_{50}$ ) através do software GraphPad Prism 5.0. O índice de seletividade também foi calculado, a partir da razão entre os valores de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) para as células de mamíferos e os valores referente a atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ).

## **2.5 Produção de óxido nítrico (ON)**

As células da linhagem macrófaga J774 foram cultivadas em meio RPMI completo. Em seguida foram plaqueadas ( $10^5$  células/ml) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ , durante 2h. Após esse período, as culturas foram lavadas com meio de cultura, para remoção das células não aderentes. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$  em diferentes concentrações dos compostos (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200  $\mu$ g/mL). Após 48h, transferiu-se 50  $\mu$ l do sobrenadante de cada poço para placas de 96 poços e o mesmo volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloronaftiletileno diamina 0,1% em  $H_3PO_4$  a 0,3 M) para avaliar a quantidade de ON produzida por estas células após tratamento com os compostos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan FC- Thermo Scientific) a 540 nm e a concentração foi determinada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão preparada com nitrito de sódio.

## **2.6 Obtenção de sobrenadante de cultura e dosagem de citocinas por citometria de fluxo**

As suspensões de células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços ( $10^6$  células/ml), em duplicata. As células foram tratadas com 1x e 2x o valor  $IC_{50}$  dos diferentes compostos (nos testes com as cepas selvagens) de acordo com protocolo estabelecido e as placas foram mantidas em estufa à 37°C, 5% de  $CO_2$  durante 24, 48, 72h e 6 dias. A miltefosina foi utilizada como droga de referência e utilizou-se como controle de positivo de estimulação a concanavalina A (ConA). O controle sem tratamento foi denominado de basal. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (400x g rpm por 10 min, a temperatura ambiente) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C para posterior utilização no ensaio de dosagem de citocinas pela citometria de fluxo.

A avaliação da produção de citocinas foi realizada através do kit CBA mouse Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, BD Bioscience, San Jose, CA). As citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram mensuradas em sobrenadante de cultura de esplenócitos murinos tratados ou não com os compostos. O protocolo desenvolvido seguiu de acordo com as recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2- 0,1 pg/ml; IL-4- 0,03 pg/ml; IL-6- 1,4 pg/ml; IL-10- 16,8 pg/ml; TNF- 0,9 pg/ml; IFN- $\gamma$ - 0,5 pg/ml; IL-17A- 0,8 pg/ml. A aquisição dos dados foi realizada através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3 (Soft Flow Inc).

## 2.7 Análise estatística

As análises foram realizadas empregando-se testes paramétricos ou não paramétricos após a verificação da normalidade através do teste Shapiro-Walk. Para analisar a variabilidade entre grupos tratados e controle foi utilizado o teste Mann-Whitney. Testes de regressão linear simples foram utilizados para determinar os valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  = estatisticamente significativos).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Efeito leishmanicida *in vitro* dos compostos sobre as formas selvagens de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram na triagem inicial com cepas selvagens para as espécies de *L. amazonensis* quase todos os compostos, exceto o PF-02 apresentaram inibição do crescimento parasitário com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 3,28  $\mu$ M (PF-04) a 108,96  $\mu$ M (PF-02) (Tabela 1). O PF-04 foi o composto mais ativo em relação aos demais para promastigotas de *L. amazonensis*. Quando observada esta atividade frente as espécies de *L. infantum*, os valores de IC<sub>50</sub> variaram entre 1,01  $\mu$ M (AT-13) à 47,87  $\mu$ M (PF-01). Sendo o AT-13 para esta espécie foi o composto mais ativo. A Miltefosina foi utilizada como fármaco de referência e apresentou o valor de inibição de 15,8  $\mu$ M e 8,42  $\mu$ M para as duas espécies respectivamente.

Tabela 1 - Atividade leishmanicida – IC<sub>50</sub> em  $\mu$ M de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas selvagens de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Compostos	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
3a*	7,38	1,01
3g	3,74	4,54
3k	N/D	N/D
4a*	4,45	16,13
4e	3,28	1,67
4g	108,96	N/D
4h	26,7	N/D
4j	8,74	28,56
4m	5,41	47,87
Miltefosina	15,8	8,42

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

IC<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% das promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* / ND: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração de inibição) / \*: Compostos testados em uma concentração menor que os demais.

### 3.2 Efeito leishmanicida *in vitro* dos compostos sobre cepas transgênicas de promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*

A utilização de cepas transgênicas em ensaios biológicos *in vitro* pode ser considerado uma metodologia alternativa na descoberta de novas moléculas (DA SILVA SANTOS et al, 2019). Os valores de IC<sub>50</sub> variaram entre 6,65 µM (PF-04) a 279,44 µM (PF-02) para as promastigotas de *L. amazonensis*. Com relação a ação leishmanicida frente a promastigotas de *L. infantum* houve uma variação de 6,71 µM (AT-07) a 109,52 µM (PF-02) µM. Com exceção dos compostos PF-02 (109.52 µM), PF-01 (55.36 µM) e PF-08 (63.56 µM) todos os outros apresentaram excelentes valores de inibição, sendo menor que a Miltefosina (38,20 µM) (Tabela 2). Para as formas amastigotas observou-se que a maioria dos compostos não apresentaram valores satisfatórios de inibição do crescimento de 50% para as duas espécies quando comparado ao fármaco de referência também testado. Os compostos que apresentaram melhores valores de IC<sub>50</sub> foi o AT-13 (18,2 µM / 27,36 µM) para as duas espécies respectivamente. A Miltefosina (7,07 µM / 1,72 µM) apresentou grande eficácia frente as duas espécies avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade leishmanicida – IC<sub>50</sub> em µM de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas e amastigotas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Compostos	Promastigotas		Amastigotas	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
3a*	N/D	8,59	18,2	27,36
3g	7,4	6,71	30,6	39,89
3k	16,91	16,61	28,17	37,05
4a	18,51	16	60,71	>100
4e*	6,65	6,8	77,8	50,28
4g	54,36	63,56	>100	>100
4h	279,44	109,25	>100	>100
4j	41,04	23,92	>100	>100
4m*	107,27	55,36	>100	>100
Miltefosina	26,94	38,2	7,07	1,72

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

IC<sub>50</sub>: concentração inibitória para 50% das promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* / ND: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração de inibição) / \*: Compostos testados em uma concentração menor que os demais.

### 3.3 Citotoxicidade *in vitro* sobre células esplênicas, macrófagos RAW 264.7, células HepG2

Os resultados das concentrações citotóxicas para as três linhagens celulares de mamífero avaliada foram obtidos através do ensaio de MTT. Para os esplenócitos murinos, os valores de toxicidade variaram entre 37,2 e 143,39 µM como representado na Tabela 3. O composto o PF-01 (143,39 µM) apresentou baixa toxicidade frente a estas células sendo menos tóxico que a Miltefosina. Para as células RAW 264.7 a CC<sub>50</sub> variou entre 26,7 e 68,55 µM. O composto que mais se destacou entre os outros e o fármaco de referência foi o AT-13 (63,7 µM). Nas células HepG2 os compostos com melhores resultados, com valores que representam não haver toxicidade sobre

esta linhagem foram PF-01, PF-02, AT-05 a AT-13 ambos com  $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$  (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade citotóxica –  $CC_{50}$  em  $\mu\text{M}$  de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a células esplênicas, RAW 264.7 e HepG2

Compostos	Células Esplênicas	Raw 264.7	HepG2
	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
3a	47,2	63,7	>200
3g	37,2	26,7	183
3k	N/D	35,7	>200
4a	41	42,81	110,27
4e	53,8	56,6	67,3
4g	45,91	41,93	149,48
4h	107,23	40,27	>200
4j	60,77	31,57	83,37
4m	143,39	37,41	>200
Miltefosina	125,93	68,55	131,55

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

$CC_{50}$ : Concentração citotóxica para 50% das células

N/D: Não determinada. (não foi possível calcular a concentração citotóxica)

### 3.4 Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade também foi calculado, ele corresponde a razão entre os valores de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) para as células de mamíferos e os valores referente a atividade leishmanicida ( $IC_{50}$ ) (SILVA, 2018). Os compostos que apresentaram melhores IS frente das duas espécies da cepa selvagem e sobre as três linhagens celulares quando comparados a miltefosina, foram (PF-04, AT-07 e AT-13) como observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota selvagens de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis série PF e AT

Composto	<i>L. amazonensis</i>			<i>L. infantum</i>			
	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino	Composto	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	43,51	8,64	6,4	3a	318,91	63,34	46,91
3g	48,88	7,14	9,93	3g	40,34	5,89	8,2
3k	N/D	N/D	N/D	3k	N/D	N/D	N/D
4a	24,8	9,63	9,22	4a	6,84	2,65	2,54
4e	20,55	17,27	16,43	4e	40,39	33,95	32,28
4g	5,6	1,57	1,72	4g	N/D	N/D	N/D
4h	2,15	0,37	0,98	4h	N/D	N/D	N/D
4j	9,54	3,61	6,96	4j	2,92	1,11	2,13
4m	87,91	6,91	26,51	4m	ND	ND	ND
Miltefosina	8,33	4,34	7,97	Miltefosina	15,62	8,14	14,95

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

Os valores de IS dos compostos que foram avaliados utilizando os dados de IC<sub>50</sub> obtidos de promastigota de cepas transgênicas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, indicaram que os compostos 3a, 3g e 4e apresentaram mais seletividade para as três linhagens celulares testadas como descrito na Tabela 5. Para as formas amastigotas das duas espécies, os dados mostraram que todos os compostos não apresentam indicativo de seletividade parasitária para os três tipos celulares testados. No entanto, a miltefosina apresentou valores relevantes de seletividade para as duas espécies avaliadas (Tabela 6).

Tabela 5 - Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota transgênica de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis

Compostos	<i>L. amazonensis</i>			Compostos	<i>L. infantum</i>		
	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino		Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	43,51	8,64	6,4	3a	37,37	7,42	5,5
3g	24,72	3,61	5,02	3g	27,29	3,99	5,54
3k	13,24	N/D	N/D	3k	13,48	2,15	N/D
4a	5,96	2,31	2,22	4a	6,89	2,68	2,56
4e	10,12	8,51	8,09	4e	9,9	8,32	7,91
4g	2,75	0,77	0,84	4g	2,35	0,66	0,72
4h	0,84	0,14	0,38	4h	2,15	0,37	0,98
4j	2,03	0,77	1,48	4j	3,49	1,32	2,54
4m	4,43	0,35	1,34	4m	8,59	0,68	2,59
Miltefosina	4,88	2,54	4,67	Miltefosina	3,44	1,79	3,3

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

Tabela 6 - Índice de Seletividade (IS) para a forma amastigota transgênica de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis

<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum</i>			
Compostos	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino	Compostos	Hepg2	Raw 264.7	Esplenócito murino
3a	17,68	3,51	2,6	3a	11,73	2,33	1,73
3g	5,97	0,87	1,21	3g	4,59	0,67	0,93
3k	7,95	1,27	N/D	3k	6,04	0,96	N/D
4a	1,82	0,71	0,68	4a	N/D	N/D	N/D
4e	0,87	0,73	0,69	4e	1,34	1,13	1,07
4g	N/D	N/D	N/D	4g	N/D	N/D	N/D
4h	N/D	N/D	N/D	4h	N/D	N/D	N/D
4j	N/D	N/D	N/D	4j	N/D	N/D	N/D
4m	N/D	N/D	N/D	4m	N/D	N/D	N/D
Miltefosina	18,62	9,7	17,82	Miltefosina	76,6	39,91	73,33

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

N/D: Seletividade parasitária não determinada.

### 3.5 Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura por citometria de fluxo

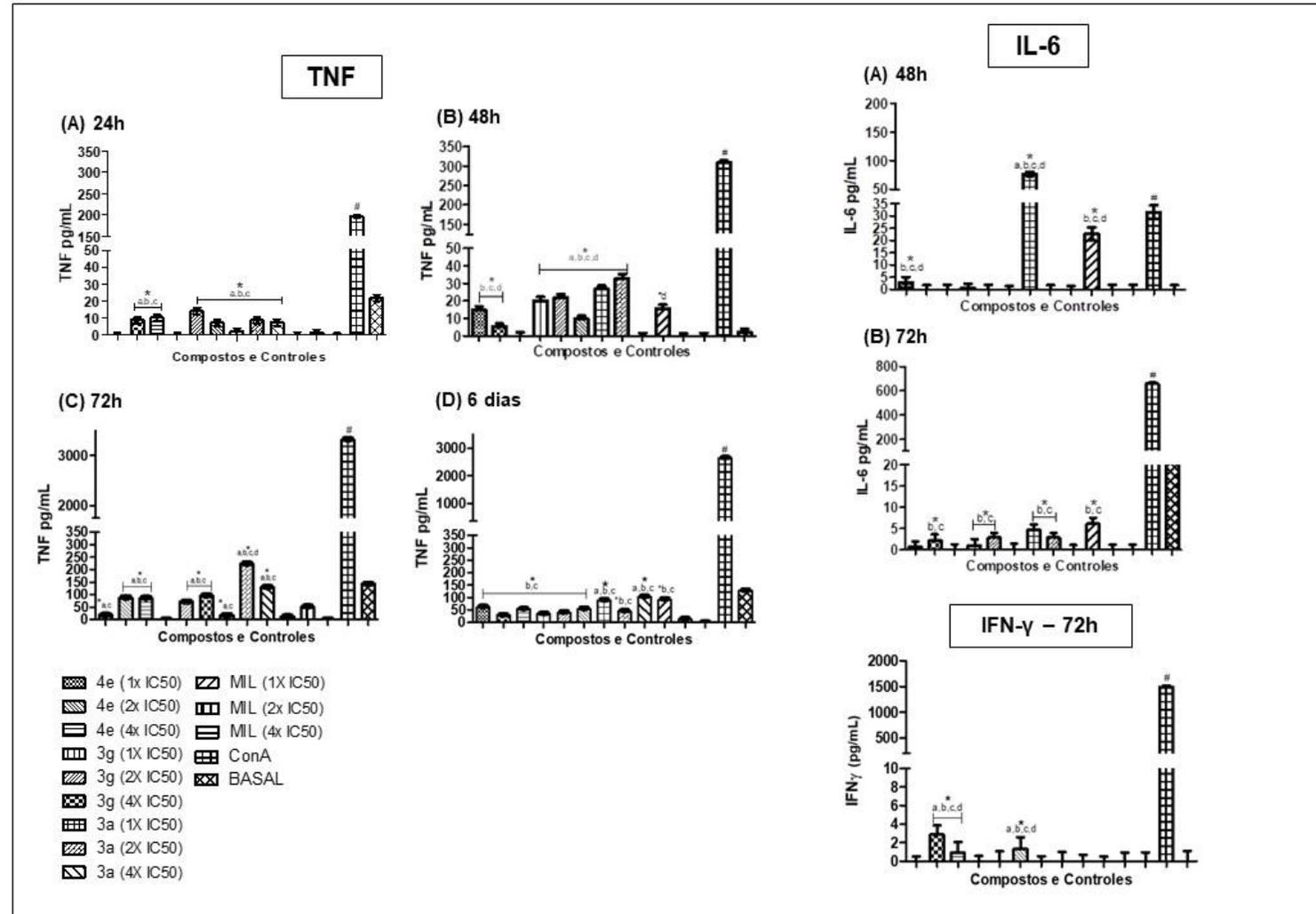
As citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-6 e TNF), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17A) foram avaliadas nos tempos de 24h, 48h, 72h e 6 dias por meio da citometria de fluxo, apenas com os compostos que mais destacaram-se inicialmente nos testes de atividade leishmanicida e citotoxicidade. Os compostos foram 3a, 3g e 4e. Os resultados mostraram que houve uma indução principalmente dos níveis de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, como TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6 (Quadro 1).

Sobre a produção de TNF, foi possível observar que os três compostos induziram de forma significativa (em relação ao controle positivo ConA e basal, conforme assinalado abaixo) a produção desta citocina nos quatro tempos avaliados. Foi observada uma maior produção nos tempos de 72h e 6 dias (Quadro 1 – gráfico C e D). No tempo de 24h os compostos 3a, 3g e 4e nas concentrações de 2x e 4x IC<sub>50</sub> foram estatisticamente significativos em relação ao tratamento com a Miltefosina (1x 2x e 4x IC<sub>50</sub>). A partir do tempo de 48h em diante, esta significância comparando os compostos do nosso estudo com o tratamento com a miltefosina também pode ser observada. No tempo de 48h os compostos 3a e 3g também induziu a produção de TNF de forma significativa quando comparado ao basal.

Com relação a indução de IFN- $\gamma$  foi observado no tempo de 72h que o composto 4e induziu sua produção nas concentrações de 2x e 4x IC<sub>50</sub> e o 3g na concentração de 4x IC<sub>50</sub>. Estas produções foram estatisticamente significativos quando comparados a miltefosina nas concentrações 1x, 2x e 4x IC<sub>50</sub> e ao controle basal (Quadro 1 - Gráfico IFN- $\gamma$  72h).

A produção de IL-6 foi observada no tempo de 48h com o composto 3a na concentração 1xIC<sub>50</sub> estimulando a indução desta citocina de forma significativa, quando comparada aos tratamentos com a miltefosina e aos controles Conavalina A (ConA) e basal (Quadro 1 – IL-6 / Gráfico A). No tempo de 6 dias os compostos 4e na concentração 2xIC<sub>50</sub> e 3a 1xIC<sub>50</sub> e 2xIC<sub>50</sub> também se mostraram significativos em relação ao tratamento com a miltefosina (Quadro 1 – IL-6 / Gráfico B)

Quadro 1 - Indução da produção da citocina TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$  pelos compostos nos tempos de 24h, 48h, 72h e 6 dias



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Legenda: a: tratamento com miltefosina 1xIC50; b: tratamento com miltefosina 2xIC50; c: tratamento com miltefosina 4xIC50; d: controle basal; #: controle positivo Concalvina A (ConA); \*: correspondem a valores significativos  $p < 0,05$  quando comparado ao tratamento com a miltefosina e o controle basal.

## 4 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas de caráter endêmico que afetam a saúde pública em diversos países no mundo, principalmente as populações de baixo poder aquisitivo (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Com falhas recorrentes do atual tratamento, destaca-se a necessidade de novos ensaios com triagem e descoberta de novas moléculas com eficiente potencial leishmanicida e baixos níveis de toxicidade ao homem atuando sobre todas as formas clínicas da doença (PONTE-SUCRE et al., 2017; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Alguns estudos já vêm demonstrando classes de compostos derivados das piridinas tiazóis exibindo atividades antiparasitárias importantes. Nava-Zuazo e colaboradores (2014) descreveram em seu trabalho a atividade de compostos com a presença do anel tiazólico em sua estrutura química inibindo o crescimento promastigotas de *L. amazonensis*. Queiroz (2019) também descreveu a atividade leishmanicida de uma classe de compostos com a presença desses anéis piridil-tiazol frente a espécies de *Leishmania*. Estes dados assemelham-se ao que foi visto em nosso trabalho sugerindo que esses núcleos possuem atividades leishmanicidas promissoras.

Os compostos do nosso estudo foram testados quanto as suas propriedades leishmanicidas para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os testes iniciais de contagem em câmara de Neubauer destacaram principalmente para as duas espécies os compostos 3a, 3g e 4e com os melhores valores de IC<sub>50</sub> em comparação a droga de referência. Os ensaios realizados com cepas transgênicas compostos também destacaram 4e e 3g com melhores valores de inibição de crescimento frente a estas espécies.

Um estudo realizado por Silva et. al (2017) avaliou a atividade antiproliferativa desta mesma série, derivada da estrutura do 1,3 piridil- tiázol contra espécies de *Trypanosoma cruzi*, parasito pertencente à família dos Tripanossomatídeos, onde inclui-se também as espécies do gênero *Leishmania*. Os mesmos compostos que em nosso trabalho tiveram excelente atividade leishmanicida, demonstraram neste estudo ser potentes agentes tripanocidas. Isto torna evidente que a estrutura química dos anéis piridil-tiazol podem estar atuando de forma eficiente contra tripanossomatídeos

Com relação as ações dos compostos sobre as formas amastigotas das duas espécies utilizadas no estudo, os resultados não apresentaram valores relevantes de inibição de crescimento destas formas evolutivas, quando comparado a droga de referência. Estes dados podem estar refletindo o que Muylder e colaboradores (2011) abordam em seu estudo, onde descreveram que as vezes compostos ativos contra formas promastigotas podem ser ineficientes contra as amastigotas intracelulares. Isto pode ser observado devido à dificuldade destes em atravessar a membrana celular do hospedeiro, em geral dos macrófagos, bem como também o vacúolo parasitóforo até chegar ao parasito (DE MUYLDER et al., 2011). Entretanto o impedimento da ação dos compostos de chegarem até ao parasito dentro das células do hospedeiro, pode ser contornado posteriormente com a adição destas moléculas em nanoestruturas que permitem a entrega mais precisa diretamente no alvo (PATRA et al., 2018).

Um dos critérios a ser considerado no estudo de novas drogas, consiste na avaliação dos efeitos tóxicos que estas moléculas possam estar causando as células viáveis do hospedeiro mamífero (CHINEDU; ENEGIDE, 2013). Em nosso estudo a citotoxicidade de todos os compostos foi avaliada sobre células do sistema imune como as células esplênicas e macrófagos (RAW 264.7) e sobre células de linhagem hepática (HepG2), sendo estas consideradas importantes no processo de metabolização de drogas (SILVA,2018). Diante de todos os tipos celulares analisados, a células hepáticas foram as quais quase todos os compostos apresentam menos toxicidade que a droga de referência. Para as células esplênicas os compostos PF-01 e PF-02 se destacaram em relação a miltefosina, enquanto para os macrófagos RAW 264.7 o AT-13 mostrou-se ser menos tóxico.

O índice de seletividade calculado a partir da razão entre os valores de  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  obtidos, demonstrou também que os compostos PF-04, AT-07 e AT-13 destacaram-se mais seletivos ao parasito do que as células de mamíferos principalmente para RAW.264.7 e HepG2 para as duas espécies utilizadas, mostrando o seu potencial promissor.

Outra característica importante que também deve ser considerada no estudo de novos compostos é o sistema imunológico do indivíduo frente a infecção pelo parasito. As *Leishmanias* conseguem desde o início da infecção ativar mecanismos da imunidade inata e adaptativa que podem contribuir para sua sobrevivência (MIRZAEI et al., 2021). Desta forma, identificar novos compostos com propriedades leishmanicidas que possam auxiliar na modulação de uma resposta imune protetora ao indivíduo é de extrema relevância (SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

Também foi avaliado a produção de ON em macrófagos não infectados tratado com os compostos, porém os resultados não indicaram uma produção significativa de ON quando dosados nos sobrenadantes de cultura destas células. Embora nossos compostos não induziram produção de ON (dados não mostrados), esse mediador é importante, atuando como um mecanismo de defesa que conseguem eliminar o parasito no início da infecção. Entretanto esta possivelmente não foi uma via de modulação em que os compostos pudessem estar atuando, ou abordagem mais específicas deverão ser usadas para mensurar corretamente esse radical em estudos futuros como por exemplo em um contexto de infecção. É importante ressaltar que o NO é um radical gasoso com uma vida fisiológica muito curta, o que dificulta a sua mensuração e extrapolação dos dados encontrados (BRYAN; GRISHAM, 2007).

A indução dos níveis de IL-6 foi observada de forma significativa principalmente pelo composto 3a e comparação a droga de referência e ao basal. No tempo de 6 dias além do composto 3a o 4e também se mostrou ser indutor desta citocina. Alguns estudos mostram que a IL-6 pode apresentar uma dualidade no que diz respeito as suas funções no curso da infecção, podendo exibir um papel tanto pró quanto anti-inflamatório contribuindo para resistência ou para progressão da doença (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; STÄGER et al., 2006). A produção de IL-6 pode ser desencadeada por diversas células, como células dendríticas, macrófagos e monócitos induzido por outras citocinas presentes no meio como exemplo o TNF

(NASEEM; IQBAL; MUNIR, 2016). Isto ajuda a explicar o que foi visto em nosso trabalho, onde a produção de IL-6 por ter sido induzida a partir dos níveis de TNF, e pode estar associada também ao perfil de resposta Th1 que confere proteção ao hospedeiro.

Neste estudo apresentamos resultados visando a seleção de novos compostos para o tratamento de duas importantes espécies causadoras de Leishmaniose, as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foi possível selecionar entre os demais, os compostos 3a, 3g e 4e como promissores candidatos a novos fármacos. Estes apresentaram uma atividade leishmanicida relevante frente as promastigotas, bons índices de seletividade e pouca toxicidade frente a células de mamíferos. Ao analisarmos a atividade sobre as formas amastigotas os resultados não foram tão expressivos, no entanto, mais estudos podem ser realizados visando ajustes quanto a sua solubilidade intracelular. Além disso, vimos que os compostos induziram um perfil de resposta imunológica Th1, que favorece a resolução da doença. Desta maneira, os compostos aqui avaliados se apresentam como promissores nos estudos de novas drogas para tratamento das leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, P. F. Visceral Leishmaniasis in Brazil : review article. **Revista Unimontes Científica**. v. 19, n. 1. 2017.

AIRES, D. C. G. **Derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos como possíveis candidatos ao tratamento da leishmaniose**. 2017. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 2017.

AL-SAID, M. S. et al. Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 137–141, 2011.

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

ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A. A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 948–954, 2007.

BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.]. v. 1

BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l: s.n.].

BRASIL, M. DA S. Leishmaniose visceral Situação Epidemiológica da. **10/2017**, p. 25, 2017b.

BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. v. 50, 2019.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. **Estudo do papel de linfócitos T CD4 + e CD8 + e suas citocinas na Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2013. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BRITO, F. F. DE et al. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para leishmaniose tegumentar americana em centro de referência em dermatologia. **Hansen. int**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMPOS, T. M. et al. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 6, p. 973–982, 2020.

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

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.

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

CHINEDU; ENEGIDE, D. A. The importance of toxicity testing. **J. Pharm. BioSci.**, v. 4, n. 6, p. 146–148, 2013.

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

DA SILVA, E. B. et al. Design and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017b.

DA SILVA, E. B. et al. Design and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 39–50, 2017c.

DA SILVA SANTOS, A. C. et al. Assessment of Leishmania cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 166, n. September, p. 105732, 2019.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.

DE FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 193–204, 2013.

DE MORAES GOMES, P. A. T. et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 46–57, 2016.

DE MUYLDER, G. et al. A screen against leishmania intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

DE OLIVEIRA DUQUE, M. C. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774–776, 2016.

DE OLIVEIRA, V. V. G. et al. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

DE SANTANA, T. I. et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 874–886, 2018.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DIAS, L. R. S. et al. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 211–219, 2007.

DNDI. InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH. v. 1 edição, p. 1–12, 2016.

DNDI. InfoLEISH: Boletim informativo da redeLEISH. v. 1 edição, p. 1–12, 2018.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140–146, 2014.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1–12, 2012.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need (Nature reviews. Microbiology (2017) 15 4 (217-231)). **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 447, 2017.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

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

GUEDES FARIAS, F. T. et al. Perfil Epidemiológico De Pacientes Diagnosticados Com Leishmaniose Visceral Humana No Brasil. **Revista Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, n. 3, p. 485–501, 2019.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1286–1294, 2015.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–23, 2011.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016.

JERONIMO, S. M. B.; DE QUEIROZ SOUSA, A.; PEARSON, R. D. **Leishmaniasis**. Thrid Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.

JOSÉ, F. F. et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537–542, 2001.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

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

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

LEITE, A. C. L. et al. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4323–4354, 2019.

LESSA, J. A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones:

Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 30, n. 2, p. 372–380, 2011.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

MEIRA, C. DOS S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].

MIRZAEI, A. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, n. September, p. 155297, 2021.

MS, B. et al. Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene) pyridin-2-amine derivatives as potential antibacterials. **International Journal of Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2009.

NASEEM, S.; IQBAL, R.; MUNIR, T. Role of Interleukin-6 in Immunity: a Review. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 4, n. 2, p. 268–274, 2016.

NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1626–1633, 2014.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações Sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana E Sua Expansão No Território Brasileiro. **Revista Percurso**, v. 6, n. 1, p. 147, 2014.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2016.

OLIVEIRA, A. R. Obtenção de novos ftalil-tiazóis e avaliação das atividades antitumoral e imunomodulatória in vitro. 2014.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.

OLIVEIRA, L. F. G. et al. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. **Revista Fitos**, v. 8, n. 1, p. 33–42, 2013.

ÖZDEMİR, A. et al. Synthesis and the selective antifungal activity of 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 2080–2084, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [s.l: s.n.].

- PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.
- PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects Jayanta. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–33, 2018.
- PIETRZAKI CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55–59, 2017.
- PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, 2014.
- PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.
- PORFIRIO-PASSOS ET AL. Métodos para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana - Revisão. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1232, 2012.
- QUEIROZ, C. M. **Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de Leishmania infantum (Nicolle , 1908)**. 2019. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Quimica Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.
- REIS, L. D. C. et al. Mecanismos Imunológicos Na Resposta Celular E Humoral Na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 2007.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.
- ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 2020.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.
- ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, 2021.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011.
- SANTOS, A. C. DA S. **Estudos in vitro de novos candidatos a fármacos anti-Leishmania**. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

- SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, 2020.
- SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.
- SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.
- SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 324–333, 2012.
- SILVA, A. C. C. Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas. 2018.
- SILVA, E. B. DA. **Concepção, síntese e caracterização de novos derivados piridil-1,3-tiazol como agentes antichagásicos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.
- SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: A public health perspective. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 1, 2016.
- SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.
- STÄGER, S. et al. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1764–1771, 2006.
- STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in *Leishmania* infections: Friends or foes? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2019.
- TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, 2011.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 2018.
- VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 365–384, 2020.

WHO. Leishmaniasis country profile- 2015 Brazil. **World Health Organization**, v. 2015, p. 1–2, 2017.

WHO. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.

YESILOVA, Y. et al. Meglumine antimoniate is more effective than sodium stibogluconate in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 1, p. 83–87, 2016.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA” protocolado sob nº 102/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dra **Valéria Pereira Hernandes** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 10/02/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 10 de fevereiro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico  (BALB/c)	375 (20-30 gr/ 60 dias/ machos)
<b>TOTAL</b>	<b>375</b>

We certify that project “AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA” (CEUA Protocol nº 102/2016) coordinated by **VALÉRIA PEREIRA HERNANDES** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on february, 10, 2017. In present version this project is licensed and valid until february 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) February, 10, 2017

*Sheilla Andrade de Oliveira*  
 Dr<sup>a</sup> Sheilla Andrade de Oliveira  
 Coordenadora CEUA/CPqAM

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