

Fabio Navarro Baltazar

**Otimização de novos candidatos a fármacos para
Leishmaniose Visceral Canina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Baltazar, Fabio Navarro

Otimização de novos candidatos a fármacos para leishmaniose visceral canina/Fabio Navarro Baltazar. - 2022.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

1. Leishmaniose visceral/tratamento farmacológico. 2. Antiparasitários/farmacologia. 3. Doenças transmitidas por vetores/parasitologia. 4. Descoberta de drogas/educação. 5. Doenças do cão/parasitologia. 6. Cães/parasitologia.

SES/CCD/CD - 451/2022

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e ao plano espiritual, por representarem fundamental base de sustentação em minha caminhada evolutiva.

Agradecimentos

Inicialmente minha profunda gratidão ao meu orientador e amigo Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, pelo acolhimento em seu laboratório, paciência durante as situações difíceis, incontáveis (e inestimáveis) ensinamentos (acadêmicos e de vida) e conselhos durante a confecção deste trabalho. Trata-se de um grande exemplo (profissional e pessoal) a ser seguido por todos os seus alunos.

Agradeço ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. José Eduardo Tolezano por ter confiado em meu trabalho desde o mestrado (quando me orientou de maneira excepcional) e contribuído (diretamente e indiretamente) com a minha chegada ao doutorado.

Agradeço (com todo o meu coração) aos meus pais Antônio Carlos Baltazar e Elisabete Darci Navarro Baltazar, por terem proporcionado tudo o que disponho hoje, desde a educação, a vida acadêmica, profissional, e por consequência, os ganhos materiais. Sem vocês nada disso teria sido possível. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los como meus pais, meus maiores exemplos de vida.

Agradeço à minha filha Olívia, por ter despertado o maior amor que já senti, desta maneira me dando forças para continuar aprendendo com as adversidades da vida e reforçando os meus objetivos nesta caminhada evolutiva.

Agradeço à minha irmã Carla, meu cunhado Ricardo e minha segunda filha (afilhada) Estela, por terem sido tão compreensivos (e tão pacientes) com minhas ausências durante a confecção deste trabalho (muitas vezes concomitante aos plantões). Mesmo ausente fisicamente, permaneço sempre com vocês em pensamento.

Agradeço profundamente (e com muito amor) à minha namorada Camila por todo o suporte (profissional, acadêmico e emocional) prestado

durante o doutorado, me acalmado nos momentos de desespero (e não foram poucos...) com a maior paciência do mundo. Com toda a certeza, sua ajuda foi fundamental para que esta etapa pudesse ser concluída. Aproveitando o ensejo, incluo nos agradecimentos minha segunda família João, Nilda, Ana Carina, Luís, Maria Eduarda e Liz por todo o carinho e momentos de descontração vividos durante esta etapa acadêmica.

Agradeço profundamente meus colegas de laboratório, especialmente minhas queridas amigas Maiara Amaral, Maiara Romanelli, Viviane, Thaís, Érica e Matília, por toda ajuda despendida com os experimentos, e, principalmente, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de todos estes anos de trabalho. Serei eternamente grato por tudo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pelo trabalho impecável relacionado aos moldes da formação acadêmica *strictu-senso*, em especial à secretária Tirces, sempre tão disponível em ajudar os alunos.

Por fim, agradeço imensamente a Deus e ao plano espiritual em sua totalidade, especialmente pela dádiva de poder continuar meu trajeto evolutivo, pelo acesso à educação e à vida acadêmica.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina se trata de enfermidade infecciosa, zoonótica, de caráter insidioso e multissistêmica. Fatores como a ineficácia dos métodos de controle aplicados sobre os reservatórios caninos (incluindo eutanásia) e a toxicidade dos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento humano, justificam urgência na busca de novos candidatos a fármacos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial anti-*Leishmania* de 25 compostos sintéticos derivados do gibilimbol. Destes, quatro apresentaram atividade em amastigotas sem citotoxicidade a células de mamíferos, com o CE_{50} em amastigotas variando entre 5,1 e 13,5 μM , e dois (**LPM-21** e **LPM-22**) foram submetidos à predição *drug-likeness in silico* e ensaios de mecanismo de ação em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Ambos demonstraram alta absorção gastrointestinal, permeabilidade à barreira hematoencefálica, solubilidade moderada e alta (respectivamente), ausência de moléculas de interferência, e perfil *drug-likeness* favorável para futuros candidatos a fármacos. Nos ensaios de mecanismo de ação, **LPM-21** induziu tardiamente a permeabilização plasmática parasitária (220 minutos), além de ter ocasionado a despolarização da membrana mitocondrial, redução nos níveis de ROS, alcalinização dos acidocalcissomos e importante elevação do Ca^{2+} intracelular, fatos que sugerem um mecanismo de ação tendo como principal alvo de atuação os acidocalcissomos, resultando no extravasamento do Ca^{2+} e subsequente despolarização da membrana mitocondrial. O composto **LPM-22** não alterou a permeabilidade da membrana plasmática, não atuou sobre o potencial de membrana mitocondrial, induziu a acidificação dos acidocalcissomos, elevação do Ca^{2+} e redução nos níveis de ROS, podendo sugerir danos à membrana mitocondrial e consequente elevação deste íon. A espectrometria de massas por MALDI-TOF revelou aumento na intensidade dos picos em promastigotas incubadas com **LPM-21** e **LPM-22**. Logo, este trabalho concretiza o potencial anti-*Leishmania* dos derivados sintéticos do gibilimbol, em especial os compostos **LPM-21** e **LPM-22**, os colocando como futuros candidatos para estudos *in vivo*.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is an infectious, zoonotic, insidious and multisystemic disease. Factors such as the ineffectiveness of the control methods applied to canine reservoirs (including euthanasia) and the toxicity of the drugs currently available for human treatment, brings the urgency in search for new drug candidates. The present study aimed to evaluate the anti-*Leishmania* potential of 25 synthetic compounds derived from gibilimbol, a phenolic isolate extracted from the leaves of *Piper malacophyllum*. Four compounds showed activity in amastigotes without cytotoxicity to mammalian cells, with EC₅₀ in amastigotes ranging between 5.1 and 13.5 µM, and two (**LPM-21** and **LPM-22**) were submitted to the *in silico* drug-likeness prediction, and mechanism of action assays in *Leishmania (L.) infantum* promastigotes. Both demonstrated high gastrointestinal absorption, permeability to the blood-brain barrier, moderate and high solubility (respectively), and favorable drug-likeness profile for future drug candidates, without revealing *PAINS* molecules. In the mechanism of action assays, **LPM-21** induced parasitic plasmatic permeabilization only at later times (220 minutes), in addition to depolarization of the mitochondrial membrane, reduction in ROS levels, acidocalcisomes alkalinization and significant increase in intracellular Ca²⁺, suggesting a mechanism of action targeting acidocalcisomes, resulting in extravasation of Ca²⁺ and subsequent depolarization of the mitochondrial membrane. In contrast, **LPM-22** did not alter the permeability of the plasma membrane and the mitochondrial membrane potential, resulting in acidification of acidocalcisomes, elevation of Ca²⁺ and reduction in ROS levels, which may suggest damage to the mitochondrial membrane and consequent calcium elevation. Mass spectrometry by MALDI-TOF revealed an increase in peak intensity in promastigotes incubated with **LPM-21** and **LPM-22**. Finally, this work realizes the anti-*Leishmania* potential of synthetic gibilimbol derivatives, especially the compounds **LPM-21** and **LPM-22**, placing them as future candidates for *in vivo* studies.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion
AM	Éster acetoximetil
ATP	Adenosina trifosfato
BL-1	Filtro de Emissão de 530 nm
BL-2	Filtro de Emissão de 574 nm
Ca ²⁺	Íon cálcio
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%
CCCP	Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CHX	Trocador Ca ²⁺ / H ⁺
CO ₂	Gás carbônico
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DP	Desvio padrão
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ DCFDA	2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IF	Índice de infecção
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-4R	Receptor de interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF- γ	Intérferon- γ
IS	Índice de seletividade

JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LV	Leishmaniose visceral
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MCU	Uniportador de cálcio mitocondrial
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaN ₃	Azida sódica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAINS	Pan Assay Interference Compounds
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Farmacodinâmica
PGE2	Prostaglandina E2
PK	Farmacocinética
PKDL	Post-kala-azar dermal leishmaniasis
P-MAPA	Agregado protéico de fosfolinoleato de amônio e magnésio e anidrido palmitoleato
PSG	Gel secretório de promastigota
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
T CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
T CD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos
TGF-β	Fator transformador do crescimento β
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1

Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator transformador do crescimento beta
VDAC1	Canal aniônico voltagem-dependente
WHO	World Health Organization
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Estrutura química e massa molecular dos 25 compostos derivados do gibilimbol testados em *Leishmania (L.) infantum*. 52
- Tabela 2:** Avaliação atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* em promastigotas e amastigotas, citotoxicidade em células NCTC e índice de seletividade dos compostos inseridos neste estudo (incluindo o fármaco padrão miltefosina). 66
- Tabela 3:** Estudo *in silico* dos parâmetros físico-químicos, estruturais e ADME dos compostos LPM-21 e LPM-22.Erro! Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características ultraestruturais de <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 2: Casos confirmados e inespecíficos (limítrofes) para leishmaniose visceral entre 1960 e 2012.....	21
Figura 3: Taxonomia de <i>Leishmania</i> spp	23
Figura 4: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	26
Figura 5: Estruturas moleculares dos antimoniais pentavalentes disponíveis para quimioterapia anti- <i>Leishmania</i>	34
Figura 6: Estrutura molecular da anfotericina B	35
Figura 7: Estrutura molecular da miltefosina	36
Figura 8: Estrutura molecular da paromomicina.....	38
Figura 9: Estrutura molecular da Pentamidina	39
Figura 10: Estruturas moleculares dos compostos ativos com atividade anti- <i>Leishmania</i> e imunomoduladora, extraídos de produtos naturais.....	46
Figura 11: Estrutura molecular dos compostos fenólicos gibilimbol A e B, isolados de <i>Piper malacophyllum</i>	47
Figura 12: Radares de biodisponibilidade disponibilizados pela ferramenta virtual SwissADME, e sua aplicação sobre os compostos LPM-21 e LPM-22	70
Figura 13: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> após 4h de tratamento com LPM-21.....	72
Figura 14: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> após 4h de tratamento com LPM-22	73
Figura 15: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> após 4h de tratamento com LPM-22.....	74
Figura 16: Determinação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> durante 4 horas de tratamento com LPM-21 ..	75
Figura 17: Determinação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> durante 4 horas de tratamento com LPM-22. .	76

Figura 18: Alteração do pH dos acidocalcissomos em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> tratados com LPM-21.....	78
Figura 19: Alteração do pH dos acidocalcissomos em promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> tratados com LPM-22.....	78
Figura 20: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> após 4 horas de tratamento LPM-21 e LPM-22.	80
Figura 21: Espectros de massas de promastigotas de <i>Leishmania. (L.) infantum</i> obtidos por MALDI-TOF/MS.	82
Figura 22: Espectros de massas de promastigotas de <i>Leishmania. (L.) infantum</i> (MALDI-TOF/MS) não tratadas e incubadas com miltefosina, LPM-21 e LPM-22.....	83

ÍNDICE

1. Introdução.....	16
1.1. Características morfológicas e ultraestruturais de <i>Leishmania</i>	16
1.2. Epidemiologia e etiopatogenia das leishmanioses.....	19
1.3. Interações <i>Leishmania</i> -hospedeiro e fisiopatogenia.....	23
1.4. Imunologia das leishmanioses em pacientes humanos.....	26
1.5. Imunologia das leishmanioses em cães.....	28
1.6. Tratamento da leishmaniose visceral humana.....	31
1.6.1. Antimoniais pentavalentes.....	32
1.6.2. Desoxicolato de anfotericina B e sua forma lipossomal.....	33
1.6.3. Miltefosina.....	35
1.6.4. Paromomicina.....	36
1.6.5. Pentamidina.....	37
1.7. Controle e tratamento da leishmaniose visceral canina.....	38
1.8. Descoberta de fármacos.....	40
1.8.1. Compostos naturais com potencial anti- <i>Leishmania</i>	41
1.8.2. Compostos derivados do gibilimbol com efeito antiparasitário.....	45
1.9. Justificativa.....	47
2. Objetivos.....	48
2.1. Objetivos gerais.....	48
2.2. Objetivos específicos.....	48
3. Materiais e Métodos.....	49
3.1. Reagentes e equipamentos.....	49
3.2. Modelos experimentais.....	49
3.3. Células de mamíferos.....	50
3.4. Parasitas.....	50
3.5. Derivados do gibilimbol avaliados.....	51

3.6. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀)	56
3.7. Determinação <i>in vitro</i> da concentração citotóxica 50% (CC ₅₀)	57
3.8. Determinação do índice de seletividade (IS)	57
3.9. Determinação dos parâmetros físico-químicos, ADMET e PAINS (in silico).....	58
3.10. Determinação do mecanismo de ação em promastigotas	58
3.10.1. Permeabilização da membrana plasmática	59
3.10.2. Estudo dos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS).....	60
3.10.3. Estudo dos níveis de cálcio intracelular (Ca ²⁺).....	61
3.10.4. Alterações nos acidocalcissomos.....	61
3.10.5. Estudo do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	62
3.11. Caracterização do perfil espectral proteico parasitário (MALDI-TOF MS)	63
3.12. Análises estatísticas	64
4. Resultados.....	65
4.1. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀), concentração citotóxica 50% (CC ₅₀) e índice de seletividade (IS)	65
4.2. Predições <i>in silico</i>	67
4.3. Determinação do mecanismo de ação em promastigotas	69
4.3.1. Permeabilidade da membrana plasmática	70
4.3.2. Estudo dos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS).....	72
4.3.3. Estudos dos níveis de cálcio intracelular (Ca ²⁺)	73
4.3.4. Alterações nos acidocalcissomos	76
4.3.5. Estudo do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	78
4.4. Avaliação do perfil espectral proteico por MALDI-TOF/MS.....	79
5. Discussão	83
6. Conclusões.....	95
7. Referências bibliográficas.....	96
ANEXOS.....	114

1. Introdução

As leishmanioses constituem enfermidade que acomete tanto os seres humanos quanto os animais domésticos e silvestres, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com dois subgêneros e diversas espécies e subespécies traduzindo panoramas clínicos distintos. A transmissão se dá por flebotomíneos de diferentes gêneros, a depender da região geográfica (a nível mundial), também popularmente conhecidos como “mosquitos-palha”. No que se refere aos animais de companhia, a doença se encontra mais frequente nos caninos (comparativamente à sua incidência na espécie felina), com os cães sendo os principais reservatórios de *Leishmania infantum*, espécie responsável pela forma visceral. Ainda sobre os reservatórios caninos, diversas questões éticas tornam o manejo (clínico e profilático) da doença bastante problemático, especialmente no que tange a eutanásia como método adotado na tentativa de redução da incidência em seres humanos (já tendo se mostrado ineficaz), e a grande limitação terapêutica (exclusivamente veterinária) presente no Brasil.

1.1. Características morfológicas e ultraestruturais de *Leishmania*

A enfermidade decorre da infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), intracelulares, os quais, a depender da espécie envolvida e do status imunopatogênico do hospedeiro, traduzem formas clínicas distintas, incluindo a cutânea (localizada e disseminada), a mucocutânea e a visceral. Os vetores putativos destes protozoários (incluindo suas diferentes espécies e subespécies) são os dípteros do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Vargas-Martínez et al, 2011). Já o referido protozoário, por sua vez, se caracteriza como digenético, apresentando-se morfológicamente sob duas formas distintas: promastigota (encontrada no

sistema digestório do vetor) e amastigota (intracelular em hospedeiros vertebrados). As formas promastigotas são alongadas, de tamanho variável (1,5 a 3 μm de largura e 16 a 40 μm de comprimento), e com flagelo tendo origem em sua porção anterior. O núcleo se encontra na porção média do parasito, arredondado ou ovalado, e o cinetoplasto, entre a porção anterior e o núcleo. Já as formas amastigotas podem ser ovaladas ou circulares, com o núcleo ocupando aproximadamente 30% das dimensões do parasita, flagelo situado no interior da bolsa flagelar, tamanho variável de acordo com a espécie, e cinetoplasto próximo à bolsa flagelar.

Ainda do ponto de vista ultraestrutural, tais protozoários são envolvidos pela membrana plasmática, na qual diversas moléculas se encontram ancoradas (em sua face externa), como as lipofosfoglicanas, as proteofosfoglicanas, as glicoproteínas 63, e os glicosilinositolfosfolídeos. Os microtúbulos subpeliculares, constituídos por α e β -tubulina e dispostos longitudinalmente, dão origem ao citoesqueleto, responsável pela manutenção da forma do parasita. A bolsa flagelar, sítio de origem do flagelo, decorre de uma invaginação da membrana plasmática na porção anterior do parasita. Abaixo dos microtúbulos subpeliculares, ao longo do parasita, encontra-se o retículo endoplasmático. Já o complexo de Golgi está situado entre o núcleo e o cinetoplasto, na porção anterior parasitária. Nas formas amastigotas são encontrados os megassomos, organelas que albergam vesículas eletrodensas algumas vezes maiores do que o próprio núcleo. Os tripanossomatídeos apresentam, ainda, o glicossoma, caracterizado por organela circular de aproximadamente 0,7 μm e matriz homogênea, e os acidocalcissomos, organelas polimórficas de conteúdo eletrodense, distribuídas pelo parasita e delimitadas por apenas uma membrana. A mitocôndria, única em *Leishmania*, é constituída por duas membranas e acompanha o corpo do parasita, e o cinetoplasto, característico da ordem Kinetoplastida, emerge da porção proximal mitocondrial, próxima à base do flagelo (Silva et al, 2014). Algumas das organelas supracitadas podem ser visualizadas na **Figura 1**.

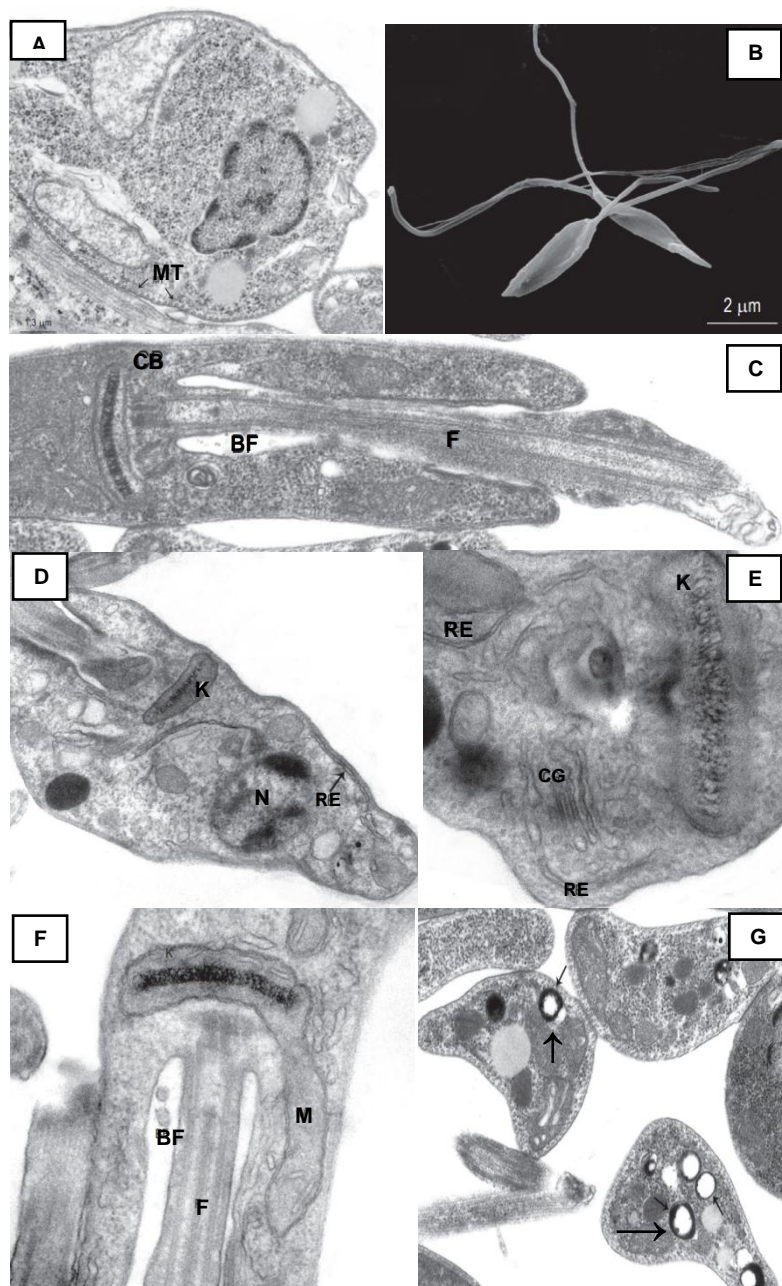


Figura 1: Características ultraestruturais de *Leishmania* spp. (microscopia eletrônica). (A) Microtúbulos subpeliculares (MT) presentes abaixo da membrana plasmática em promastigota. (B) Forma afilada e flagelos de promastigota. (C) Flagelo (F), corpúsculo basal (CB) e bolsa flagelar (BF) de forma promastigota. (D) Cinetoplasto (K), núcleo (N) e perfis tubulares do retículo endoplasmático (RE). (E) Complexo de Golgi (CG) composto por cisternas e localizado entre o núcleo e o cinetoplasto. (F) Mitocôndria (M) única composta por duas membranas. (G) Organelas com conteúdo eletrodense (acidocalcissomos) distribuídas pelo citoplasma. Fonte: Silva et al, 2014.

1.2. Epidemiologia e etiopatogenia das leishmanioses

A leishmaniose apresenta distribuição cosmopolita, sendo endêmica na África, Ásia, Américas e no Mediterrâneo. Ainda, a doença se faz presente em cerca de 89 países, nas Américas desde o sudoeste dos Estados Unidos até as províncias do nordeste da Argentina, exceto em El Salvador, Uruguai e Chile, fato eventualmente justificado por se tratar de zoonose relacionada à ambientes florestais (Torres-Guerrero et al, 2017; Reithinger et al, 2007). Especialmente no que se refere à sua forma visceral, minimamente 55 países já haviam sido afetados até meados de 2012, além de outros 45 países com casos inespecíficos, porém fortemente suspeitos (**Figura 2**). Estima-se que 350 milhões de pessoas se encontram sob o risco de adquirir a doença, com aproximadamente 12 a 15 milhões infectadas no mundo, e 1,5 a 2 milhões de novos casos sendo diagnosticados a cada ano (a América Latina contribuindo com cerca de 60 mil novos casos), com a taxa de óbitos girando em torno de 70 mil por ano (Reithinger et al, 2007). Neste contexto, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio de extenso estudo de distribuição da doença a nível mundial, realizado em 2012, 90% dos casos de leishmaniose visceral humana foram observados no Sudão (incluindo sua região Sul), Índia, Etiópia, Brasil e Bangladesh, e aproximadamente 70% dos casos de leishmaniose cutânea humana, na Costa Rica, Colômbia, Argélia, Brasil, Afeganistão, Etiópia, Iran, República Árabe Síria e Sudão (Torres-Guerrero et al, 2017). Ainda no que se refere a este estudo, 13 países foram descritos com altas taxas de leishmaniose visceral, 11 países com altas taxas de leishmaniose cutânea, e apenas o Brasil contribuindo significativamente com ambas as formas clínicas, fato que justifica, dentre diversos outros aspectos, a relevância dos conhecimentos acerca da doença neste país.

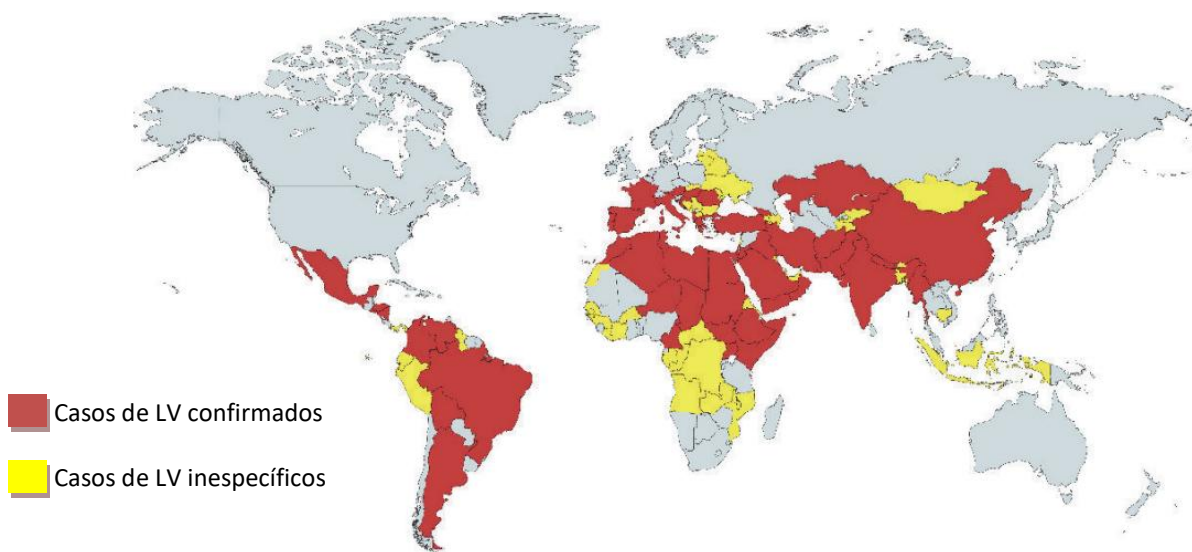


Figura 2: Casos confirmados e inespecíficos (limítrofes) para leishmaniose visceral entre 1960 e 2012 (Pigott et al, 2014).

No que se refere à taxonomia do protozoário *Leishmania*, a depender da literatura consultada, pequenas diferenças podem ser encontradas. Entretanto, de maneira geral dois subgêneros são descritos atualmente, *Leishmania* e *Viannia*, com o primeiro albergando parasitas que se desenvolvem nas porções anterior e média do intestino dos vetores, e o segundo, parasitas com desenvolvimento nas regiões média e posterior dos insetos. O subgênero *Leishmania* inclui as espécies *L. amazonensis* (forma cutânea difusa), *L. chagasi* (responsável pela leishmaniose visceral americana), *L. mexicana* (induz a forma mucocutânea da doença), *L. pifanoi* (leishmaniose mucocutânea na Venezuela), *L. venezuelensis* (doença encontrada nos Andes venezuelenses), *L. donovani* (leishmaniose visceral presente no Velho Mundo), *L. infantum* (envolvida nas formas visceral e cutânea em crianças), *L. tropica* (forma clínica cutânea), e *L. aethiopica* (responsável pelas formas clínicas cutânea e mucocutânea). Já o subgênero *Viannia* inclui as espécies *L. braziliensis* (agente etiológico mais frequente nas formas clínicas cutânea e mucocutânea), *L. guyanensis* (forma cutânea), *L. lainsoni* (forma cutânea, distribuída na Amazônia Brasileira), *L. shawi* (doença tegumentar, encontrada no Pará), *L. naiffi* (Pará, Amazônia

Brasileira e Guiana Francesa, responsável pela forma cutânea), *L. peruviana* (encontrada nos Andes peruanos e causadora da forma cutânea conhecida como “Uta”), *L. panamensis* (agente etiológico da forma tegumentar no Equador, Costa Rica, Colômbia, Panamá e Honduras), e *L. colombiensis*, que traduz casos cutâneos humanos esporádicos e se encontra distribuída pelo Panamá, Colômbia e Venezuela (Torres-Guerrero et al., 2017). A compilação taxonômica de *Leishmania* realizada pela Organização Mundial da Saúde, em 2010, pode ser visualizada na **Figura 3**.

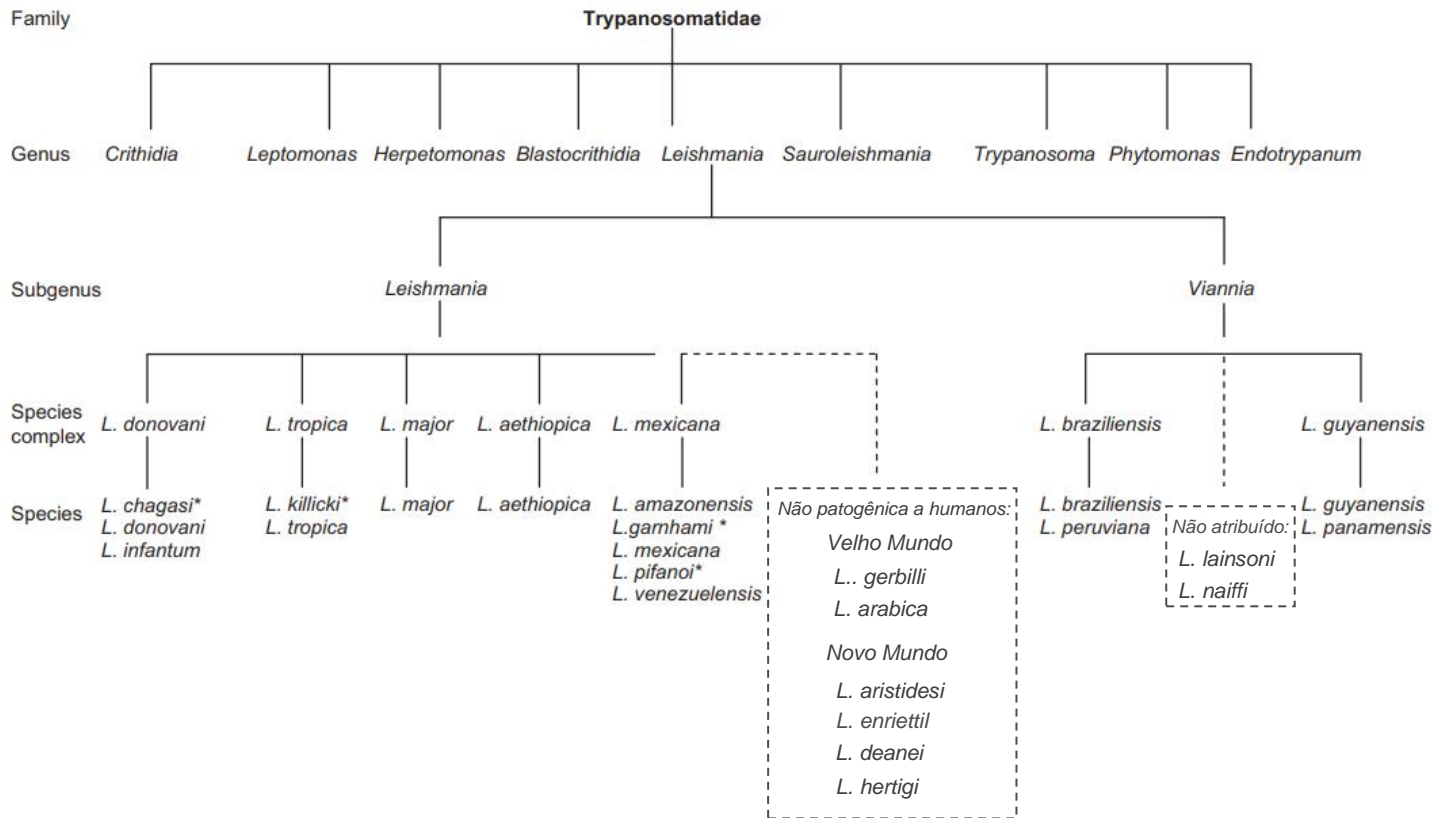


Figura 3: Taxonomia de *Leishmania* spp. (Fonte: WHO, 2010).

1.3. Interações *Leishmania*-hospedeiro e fisiopatogenia

Os protozoários causadores da enfermidade sob debate se apresentam morfológicamente sob duas formas distintas, a depender do estágio de seu ciclo de vida, promastigotas e amastigotas, encontradas, respectivamente, nos vetores flebotomíneos e hospedeiros vertebrados. As formas amastigotas, as quais são imóveis, ovaladas ou esféricas, e com cerca de 2,5 a 5 μm de diâmetro, encontram-se nas células do sistema mononuclear fagocitário (especialmente macrófagos) dos hospedeiros vertebrados, possuindo, um cinetoplasto próximo ao núcleo (Hoare e Wallace, 1966).

O ciclo biológico de *Leishmania* se inicia por meio da hematofagia desempenhada pelas fêmeas dos vetores anteriormente descritos, as quais se tornam infectadas pela ingestão do sangue ou linfa (intersticial) contendo macrófagos parasitados. Subsequentemente, as amastigotas se diferenciam em promastigotas no interior do trato digestivo do inseto, formas parasitárias móveis, alongadas e flageladas, com o cinetoplasto presente entre o núcleo e sua extremidade anterior, e aproximadamente 5 a 15 μm de comprimento. Esta etapa biológica do parasita inclui diversos estágios que irão preceder sua forma infectiva propriamente dita (promastigota metacíclica), como já descrito em literatura por Lawyer e colaboradores (1990), as quais são a promastigota procíclica (flagelo curto e com 3 a 10 μm de comprimento), a promastigota nectomona (flagelo longo, delgada e entre 12 e 19 μm), a promastigota paramastigota (tendendo a ovalada, com cinetoplasto disposto juntamente ao núcleo, flagelo de dimensões variadas, e 3,5 a 9 μm de comprimento), e promastigota haptomona (5 a 12 μm , larga e com flagelos variáveis). A forma infectiva aos vertebrados (promastigota metacíclica) se mostra com flagelo longo, afilada e medindo aproximadamente 6 a 10 μm , a qual migra à probóscida do vetor, sendo posteriormente inoculada (junto à sua saliva) no hospedeiro, durante o repasto sanguíneo. Tais promastigotas, uma vez inoculadas, serão internalizadas pelos macrófagos, nos quais se mantêm no interior do vacúolo parasitóforo, sendo modificadas

subsequentemente para a forma amastigota e multiplicando-se até que haja a ruptura da célula parasitada, infectando, posteriormente, outros macrófagos (De-Menezes et al, 2016). O ciclo biológico de *Leishmania*, em sua totalidade, pode ser visualizado na **Figura 4**.

Diversos mecanismos especializados para a sobrevivência das formas biológicas acima citadas se encontram descritos em literatura, tanto para a sobrevivência no vetor, quanto para sua manutenção no ambiente extracelular (mesmo que seja por um período muito breve) e intracelular dos hospedeiros vertebrados. No inseto, a *Leishmania* expressa moléculas como os lipofosfoglicanos e a metaloproteinase gp63 (proteção contra enzimas hidrolíticas do sistema digestivo), além de aderir nas células epiteliais intestinais para evitar sua eliminação junto às fezes, e ainda, produzir um gel que permite sua transmissão ao hospedeiro durante a regurgitação associada à hematofagia, denominado gel secretório de promastigota, ou PSG (Bates, 2007). Já no hospedeiro vertebrado, o escape do sistema complemento se dá pelos lipofosfoglicanos e metaloproteinase gp63 (resistência à lise), antes mesmo de sua internalização pelos macrófagos, fato este que ocorrerá através de seus receptores de membrana CR1 e CR3 (o último destes receptores, quando favorece a entrada do parasita, bloqueia o mecanismo respiratório de explosão microbicida e, concomitantemente, a produção de interleucina 12 pela imunidade celular) (Dos-Santos et al, 2016).

Ainda do ponto de vista do escape intracelular, a demora na formação do fagolisossomo no interior dos macrófagos (induzida pelo próprio parasita) mantém a sua sobrevivência, com este processo sendo dependente dos lipofosfoglicanos de superfície, da presença de cálcio, e da inibição da enzima proteína C quinase (Holm et al, 2003). Consecutivamente, já no interior dos fagolisossomos nos macrófagos, as formas amastigotas mantêm o seu escape pela inibição na produção de enzimas hidrolíticas, óxido nítrico e metabólitos secundários aos processos oxidativos destas células, além, ainda, de outros mecanismos bloqueadores da resposta imunológica

desempenhados pelos parasitas, como inibição da apresentação antigênica (interfere na expressão das moléculas MHC classe II), da produção de citocinas pró-inflamatórias (como interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral α), e indução na produção de moléculas “imunossupressivas” como prostaglandina E2 (PGE2), fator transformador do crescimento β (TGF- β), e interleucina 10 (tais características humorais serão abordadas adiante, na imunopatogenia das leishmanioses) (Kima, 2007).

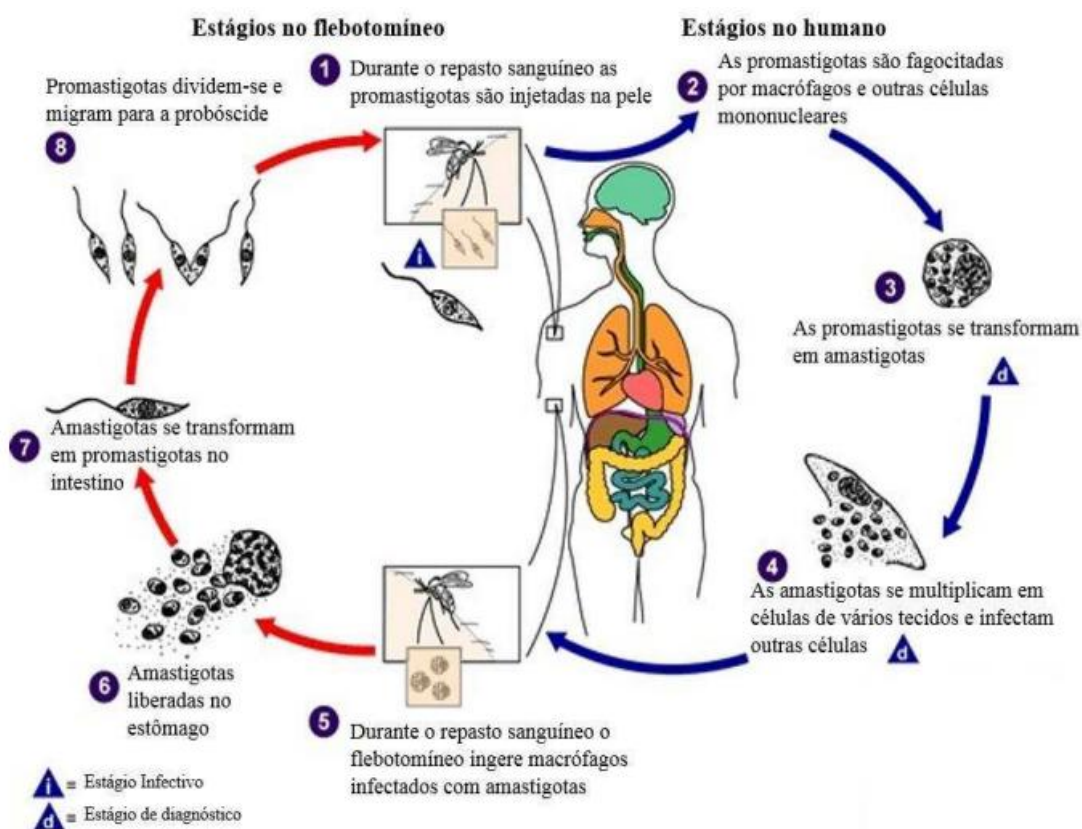


Figura 4: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Adaptado de CDC, 2010.

1.4. Imunologia das leishmanioses em seres humanos

As leishmanioses, do ponto de vista clínico, podem ser classificadas em cutânea (incluindo as formas localizada e disseminada), mucocutânea, visceral (também conhecida popularmente com *Kala-azar*), e finalmente uma apresentação clínica mais frequente no leste da África e subcontinente Indiano, conhecida como *post-kala-azar dermal leishmaniasis* (PKDL), apesar de presente em todas as regiões endêmicas para infecção por *L. donovani*. O desenvolvimento de cada uma destas formas clínicas dependerá de fatores como as características (incluindo a espécie) do parasita e a efetividade do sistema imunológico do hospedeiro. As espécies responsáveis pelo desenvolvimento da forma visceral da doença apresentam-se especializadas em acometer diferentes sistemas orgânicos, por meio da capacidade de invasão dos macrófagos do baço, fígado e medula óssea. Tal fato pode ser potencializado pela supressão da resposta imunológica destas células, a depender das interleucinas a serem produzidas nas respostas linfocitárias T helper 1 (Th-1) e T helper 2 (Th-2), durante a cascata inflamatória da doença (Kaye et al, 2020). Neste contexto, é sabido que a resolução da doença se dá pela ativação dos macrófagos (com subsequente destruição das formas amastigotas de *Leishmania*) mediada pelas células apresentadoras de antígenos (como células dendríticas e os próprios macrófagos) e os linfócitos CD4+ e CD8+, com tal interação culminando na secreção de citocinas pró-inflamatórias, das quais são citados o interferon- γ (INF- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Nylen e Sacks, 2007). A situação imunopatológica contrária, ou seja, exacerbação da resposta imunológica T helper 2, permite a desativação do macrófago por meio de falha ou inibição na produção de óxido nítrico e radicais livres do oxigênio, contexto este que acaba por traduzir as formas clínicas da doença, com destaque para visceral e cutânea difusa. Tal resposta imunológica, desativadora imunologicamente (T helper 2), cursa com a produção de citocinas como interleucina 10 e fator transformador do crescimento β (TGF- β). Esta dicotomia entre as respostas linfocitárias T helper 1 e T helper 2 (na

teoria, ativadora e desativadora de macrófagos, respectivamente) vem sendo explorada extensamente pela literatura há algumas décadas em modelos experimentais murinos, porém algumas diferenças se encontram presentes quando este cenário imunopatológico é extrapolado aos seres humanos. Nestes, interessadamente, o estímulo à produção de INF- γ pelas células T CD4+ (envolvidas na resposta Th-1) resulta da secreção de interleucina 4 (citocina protótipo da resposta T helper 2) (Biedermann et al, 2001). Ainda neste contexto, a imunidade induzida por vacinas em modelos experimentais de leishmaniose depende da sinalização do receptor de interleucina 4 (IL-4R), para que haja confecção de imunoproteção profilática, e a quimioterapia com estibogluconato de sódio (fármaco da classe dos antimoniais pentavalentes), para que seja efetiva, também depende da referida sinalização de IL-4R (Stager et al, 2003).

No que se refere à leishmaniose cutânea, a forma localizada da doença, mais frequente, se apresenta com lesões cutâneas eritematosas e edematosas inicialmente, as quais progridem para ulceração posteriormente, fatos estes que incluem um período de incubação entre 10 dias e 3 meses (Handler et al, 2015). Estas lesões ocorrem no local da picada do inseto, e do ponto de vista imunopatogênico (vindo de encontro ao exposto anteriormente), há predominância das citocinas envolvidas na resposta Th-1, como INF- γ e IL-12 (Scott e Novais, 2016). Já a apresentação cutânea difusa, por sua vez, possivelmente decorre da disseminação hematológica ou linfática da *Leishmania*, cursando com diversas pequenas ulcerações distribuídas pela superfície corpórea, e imunologicamente, com a resposta Th-1 sobrepujando a resposta Th-2 (Silveira et al, 2009). A forma mucosa traduz o envolvimento da face interna das vias aéreas superiores (com ou sem o acometimento cutâneo) e pode ocorrer secundariamente à evolução crônica da leishmaniose cutânea localizada, justificando frequentemente manifestações clínicas como epistaxe, hiperemia e obstrução nasal, afetando eventualmente o septo nasal, vestibulo, faringe, laringe, lábios e palato (Handler et al, 2015). A resposta imunológica aqui presente caracteriza-se tanto por Th-1 quanto por Th-2, na qual se observa altos

níveis de citocinas pró-inflamatórias (como INF- γ e TNF- α) e IL-4, concomitantemente a baixos níveis de IL-10 e TGF- β (Amato et al, 2003).

A apresentação visceral desta enfermidade se mostra de caráter insidioso e crônico, com período de incubação bastante amplo (10 dias a 24 meses), e acometimento de diversos tecidos linfoides, como medula óssea, fígado, baço, linfonodos, e menos frequentemente, outros tecidos como placas de Peyer, pulmões, rins e pele (Anversa et al, 2018). O envolvimento visceral traduz manifestações clínicas inespecíficas, como esplenomegalia, hepatomegalia, palidez cutânea e/ou de mucosas, emaciação e diarreia intermitente, e o contexto imunopatológico não segue os padrões da dicotomia Th-1 / Th-2 observados na forma cutânea da doença, com a cascata citocínica ocorrendo de maneira complexa e caracterizando altos níveis de anticorpos específicos (Bhattacharya e Ali, 2013).

1.5. Imunologia das leishmanioses em cães

Nos cães, as principais formas clínicas descritas são a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a leishmaniose visceral (LV), sendo que, no Brasil, dez espécies já foram descritas, com sete destas ocorrendo tanto em seres humanos como em cães, como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, e *Leishmania (Leishmania) infantum*. Destas espécies, apenas a última se caracteriza como o agente etiológico da leishmaniose visceral, com as demais sendo responsáveis pela forma cutânea da doença, a qual se inicia com o aparecimento de lesão eritemo-papulosa no local da picada do vetor, evoluindo posteriormente para um nódulo, com sua subsequente ulceração (Junior et al, 2015).

No que se refere à apresentação clínica visceral, aproximadamente 60% dos cães são assintomáticos, com o período de incubação podendo

incluir meses a anos. Os animais podem, ainda, ser classificados como oligossintomáticos (emaciação, opacidade do pelame e raras lesões cutâneas), ou sintomáticos, nos quais se observa manifestações clínicas neuromusculares (paresia, convulsões, atrofia muscular), oculares (blefarite, uveíte, conjuntivite, ceratite), gastrointestinais (êemese, diarréia), tegumentares e de mucosas (eritema, prurido, alopecias, nódulos, hiperqueratose, onicogribose, úlceras, palidez, epistaxe), além, ainda, de linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia e injúria renal aguda (Junior et al, 2015).

A imunopatogenia da leishmaniose visceral canina envolve diversos aspectos importantes a serem destacados, desde o papel das células mieloides até a exaustão de células T. A interação dos neutrófilos com a *Leishmania* inclui sua fagocitose e eliminação intracelular via estresse oxidativo, além da produção de TNF- α e INF- γ , os quais, por sua vez, irão recrutar progressivamente macrófagos aos tecidos infectados e ativar tais células ao estado leishmanicida (Almeida et al, 2013; Wardini et al, 2019). Tais situações imunopatológicas caracterizam, frequentemente, a fase subclínica da doença. Já na fase clínica, observa-se a persistência dos parasitas nos neutrófilos (no interior do vacúolo parasitóforo) por meio do aumento da sobrevivência deste tipo celular (semelhantemente a um “cavalo de tróia”), para posteriormente serem internalizados pelos macrófagos, sendo que a falta de sinalização inflamatória citocínica induz a desativação destas células (Regli et al, 2017). Em contrapartida, na fase clínica da doença canina, a transcrição de interleucina 17 (secretada pelas células Th-17 e importante para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos aos sítios de infecção) ocorre progressivamente, conforme já demonstrado em literatura (Nicolato et al, 2013) durante a infecção canina, fato que justifica o estado hiperinflamatório e os subseqüentes danos teciduais.

Os macrófagos, as principais células hospedeiras de *Leishmania*, podem se apresentar ativados ao estado leishmanicida, destruindo os parasitas no ambiente intracelular por meio da produção de radicais livres do

oxigênio e óxido nítrico (inibindo, assim, a progressão da doença), ou desativados, permitindo a sobrevivência do protozoário no vacúolo parasitóforo (Scorza et al, 2017). Tais macrófagos infectados, por meios de sinalização relacionados aos receptores *Toll-like*, geram estímulo à diminuição na produção de interleucina 12 (IL-12), citocina esta necessária ao direcionamento da resposta Th-1, mediada por células T CD4⁺ (Montserrat-Sangra et al, 2016). Neste contexto, *Leishmania infantum-chagasi* produz antioxidantes que anulam o efeito de destruição parasitária das espécies reativas do oxigênio (como pelo bloqueio da enzima superóxido dismutase), permitindo, assim, a multiplicação do protozoário no interior destas células (Longoni et al, 2013).

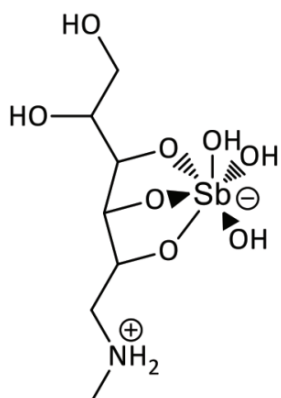
A resposta celular T CD4⁺ pelas células Th-1 apresenta papel fundamental no controle da multiplicação parasitária e progressão da doença, uma vez que produzem, dentre outras citocinas relevantes neste processo, INF- γ , interleucina 2 (IL-2), e TNF- α , responsáveis, respectivamente, pelo estímulo à ativação, diferenciação, recrutamento e manutenção dos macrófagos (Vida et al, 2016). O ambiente celular e citocínico aqui descrito pode ser encontrado nos cães na fase subclínica da doença, nos quais há o auxílio complementar das células T CD8⁺ citotóxicas, as quais controlam a carga parasitária de maneira indireta, destruindo os macrófagos infectados (Alexandre-Pires et al, 2010). Ainda nos pacientes em estado subclínico, pequenas quantidades de interleucina 10 (IL-10) são produzidas para que haja um equilíbrio em eventual estado inflamatório excessivo, com o intuito de prevenir lesões teciduais, porém com a progressão da doença e consequente estímulo antigênico prolongado, há um desequilíbrio na secreção das referidas citocinas (Carrillo e Moreno, 2009). A produção de IL-10 sobrepuja as demais citocinas envolvidas na resposta TH-1, diminuindo, desta maneira, a proliferação das células T CD4⁺ protetivas e, conseqüentemente, o número de células T que produzem INF- γ (tais situações imunopatogênicas desativam os macrófagos e reduzem a destruição parasitária intracelular) (Solano-Gallego et al, 2016).

1.6. Tratamento da leishmaniose visceral humana

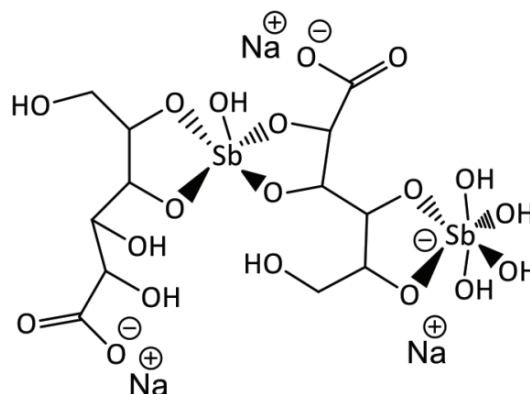
A leishmaniose visceral caracteriza-se por uma enfermidade que, sem terapia (antiparasitária e de suporte), se torna fatal, especialmente nos pacientes imunocomprometidos, como naqueles coinfectados com HIV. Adicionalmente, nas últimas décadas, têm-se observado a emergência de resistência do agente etiológico sob debate aos fármacos convencionais, fato este agravado pela alta toxicidade do grupo seletivo de drogas com ação anti-*Leishmania*, e pelo seu alto custo. Tais situações tornam o tratamento da leishmaniose visceral um grande desafio. No Brasil, os fármacos disponíveis para o tratamento da LV são o antimoniato de meglumina (da classe dos antimoniais pentavalentes), o desoxicolato de anfotericina B, e a anfotericina B lipossomal, fármacos estes distribuídos pelo Ministério da Saúde aos estados e municípios da federação (Ministério da Saúde, 2015). O antimoniato de meglumina ainda permanece como a primeira linha de tratamento no país, porém de maneira geral, devido à alta toxicidade destes fármacos, há necessidade de acompanhamento eletrocardiográfico e laboratorial no período terapêutico. O emprego da anfotericina B lipossomal passa a ser recomendado nos pacientes com idade inferior a seis anos e superior a cinquenta anos, além daqueles coinfectados com HIV, gestantes e pacientes com comorbidades no sentido lato-sensu, nestes casos sempre em ambiente hospitalar (De Carvalho et al, 2019). Já o emprego do desoxicolato de anfotericina B ocorre nos pacientes com hipersensibilidade ao antimoniato de meglumina, ou ainda naqueles que não preenchem os requisitos para a terapia com a anfotericina B lipossomal (Ministério da Saúde, 2017).

1.6.1. Antimoniais pentavalentes

O estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina compõem as formas disponíveis dos antimoniais pentavalentes, porém já se observa resistência parasitária a estes fármacos em determinadas localidades, como em Bihar e nas adjacências do Nepal (Sundar et al, 2000). As estruturas moleculares destes fármacos se encontram na **Figura 5**. Ambos os fármacos são utilizados sob a dose de 20 mg/kg durante 28 a 30 dias (Sundar e Singh, 2018). Esta classe de fármacos foi recomendada pela OMS como a primeira linha terapêutica para a leishmaniose visceral no leste da África, mediante a combinação entre o estibogluconato de sódio e a paramomicina (fármaco a ser debatido adiante), apesar de sua baixa eficácia nos pacientes coinfectados com HIV (Ritmeijer et al, 2006). A toxicidade dos antimoniais pentavalentes se relaciona especialmente com o tecido cardíaco, justificando arritmias cardíacas, prolongamento do intervalo QT, contrações ventriculares prematuras, taquicardia e fibrilação ventriculares, apesar de outros efeitos colaterais em sistemas distintos poderem ser observadas, como artralgia, mialgia, elevação das enzimas pancreáticas e hepáticas (Sundar e Chakravarty, 2015 b).



Antimoniato de meglumina



Estibogluconato de sódio

Figura 5: Estruturas moleculares dos antimoniais pentavalentes disponíveis para quimioterapia anti-*Leishmania*. Fonte: Drug Bank, 2018.

1.6.2. Desoxicolato de anfotericina B e sua forma lipossomal

A toxicidade do desoxicolato de anfotericina B, a qual inclui reações infusionais, hipocalemia, miocardite e nefrotoxicidade, pode representar custo hospitalar alto, uma vez que, quando presentes, trazem a necessidade de período prolongado de hospitalização. Logo, a elaboração de formulação lipossomal foi desenvolvida especialmente com o intuito de minimizar tais efeitos colaterais, além de permitir o aumento na dose diária do fármaco, fato que, conseqüentemente, acaba por resultar em maior efetividade terapêutica. Várias formulações lipídicas já foram descritas, as quais são rapidamente internalizadas (a nível celular) pelos tecidos reticuloendoteliais, conseqüentemente diminuindo a disponibilidade da droga em sua forma livre e reduzindo drasticamente sua toxicidade (Sundar e Agarwal, 2018). Neste contexto, três formulações apresentam-se como as mais utilizadas mundialmente, a anfotericina B lipossomal, anfotericina B em complexo lipídico, e a anfotericina B em dispersão coloidal, com diversas publicações científicas já tendo demonstrado diferentes resultados de eficácia com doses distintas, na dependência da região geográfica a ser considerada. Na Índia, por exemplo, Sundar e colaboradores (2010) relataram cura maior que 95%

com apenas 1 dose de 10 mg/kg. Já Burza e colaboradores (2014b) descreveram taxa de recidiva de apenas 2,4% quando o fármaco em questão foi empregado sob a dose de 20 mg/kg entre 4 e 10 dias. Em contrapartida, no Sudão, o tratamento com anfotericina B lipossomal sob 30 mg/kg durante 10 dias revelou taxa de cura de 92% apenas em 6 meses, com 1% de falhas terapêuticas, 5% de óbitos, e 7% de recidivas (Salih et al, 2014). O alto custo deste fármaco, quando se trata de áreas endêmicas, levou a Organização Mundial da Saúde a intervir com acordos comerciais de redução de custo para sua aquisição nestas regiões. Estudos posteriores revelaram resultados terapêuticos semelhantes, principalmente na Índia, quando se comparou a efetividade de dose única da formulação lipossomal a 15 infusões de 1 mg/kg da formulação convencional (desoxicolato), administradas em dias alternados durante 29 dias (Sundar et al 2010). A estrutura molecular da anfotericina B se encontra representada na **Figura 6**.

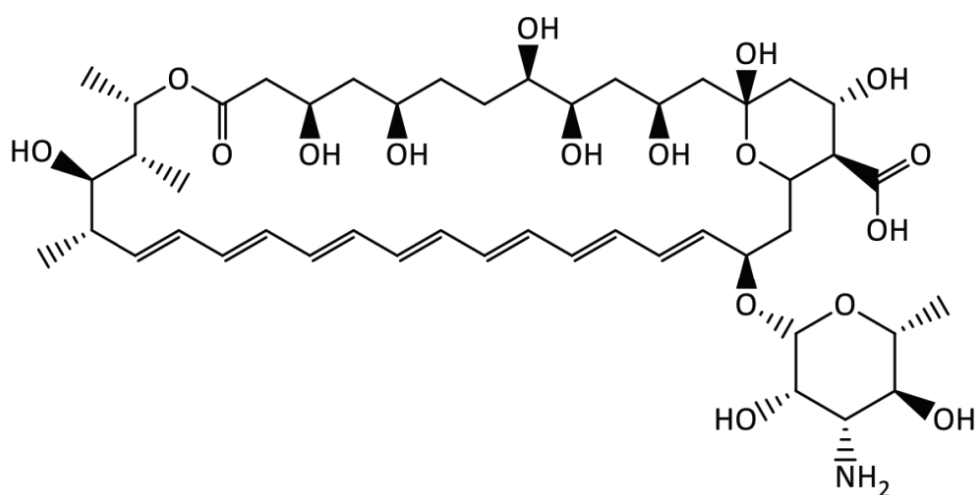


Figura 6: Estrutura molecular da anfotericina B. Fonte: Drug Bank, 2018.

1.6.3. Miltefosina

Trata-se do primeiro tratamento oral efetivo descrito para leishmaniose visceral, caracterizando-se por um composto alquilfosfolipídio, um éster fosforilcolina do hexadecanol, que ganhou o lugar do estibogluconato de sódio na primeira linha terapêutica contra a leishmaniose visceral no Subcontinente Indiano em 2002 (Ponte-Sucre et al, 2017). Desenvolvida inicialmente como quimioterápico para terapia auxiliar nas doenças oncológicas, a miltefosina ainda possui seu exato mecanismo de ação não completamente elucidado, porém alguns autores citam interferência direta na biossíntese de fosfolipídios e no metabolismo dos alquil-lipídios dos parasitas, alterando as oxidases dos citocromos mitocondriais, estimulando a despolarização mitocondrial e, conseqüentemente, a queda dos níveis de ATP intracelulares, com a morte celular por mecanismo semelhante a apoptose (Dorlo et al, 2012). A estrutura molecular da miltefosina pode ser melhor visualizada na **Figura 7**. Com taxas de cura atingindo 94% sob regime terapêutico de 50 a 100 mg/dia durante 28 dias, o fármaco foi direcionado como tratamento de eleição para a leishmaniose visceral na Índia, Nepal e Bangladesh, porém após uma década de uso, observou-se diminuição considerável de sua eficácia, com as taxas de recidiva tendo duplicado (Burza et al, 2013). A longa meia-vida desta droga (aproximadamente sete dias) pode ter facilitado o desenvolvimento de resistência parasitária, com seus efeitos tóxicos justificando eventos adversos gastrointestinais (vômitos e diarreia), teratogenia, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Sundar e Chakravarty, 2015 b).

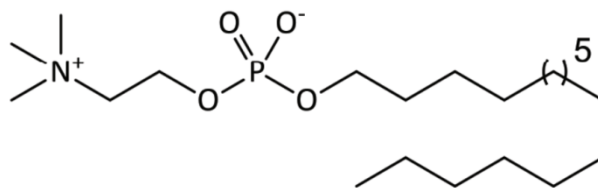


Figura 7: Estrutura molecular da miltefosina. Fonte: Drug Bank, 2018.

1.6.4. Paromomicina

A paromomicina pertence à classe dos antibióticos aminoglicosídeos, exercendo atividade antibacteriana, e ainda antiprotozoária contra *Leishmania* spp., *Entamoeba* spp. e *Cryptosporidium* spp., por meio de interferência na síntese proteica nos ribossomos e inibição da respiração celular (Chawla et al, 2011). O fármaco demonstrou 95% de taxa de cura em estudo de fase III, sob a dose de 15 mg/Kg/dia durante 21 dias, e em Agosto de 2006, o governo indiano aprovou o seu emprego no tratamento da leishmaniose visceral (Sundar et al, 2007). Entretanto, taxas de cura distintas são observadas nas diferentes regiões do planeta, eventualmente ainda menores do que aquelas observadas com o estibogluconato de sódio, como no Leste da África de maneira geral (Musa et al, 2012). Adicionalmente, a paromomicina demonstrou-se ineficaz na cura da leishmaniose dermal pós-calazar (PKDL), com taxas em torno de 37,5% (Sundar et al, 2014). Os principais efeitos adversos relatados no tratamento com esta droga se relacionam com dor no local da administração (presente em aproximadamente 55% dos pacientes), ototoxicidade geralmente reversível, elevação das transaminases hepáticas e nefrotoxicidade, e apesar do baixo custo terapêutico eventualmente poder representar grande vantagem, a monoterapia pode induzir o desenvolvimento de resistência parasitária (Sundar e Singh, 2018). Na **Figura 8** se encontra a representação molecular da paromomicina.

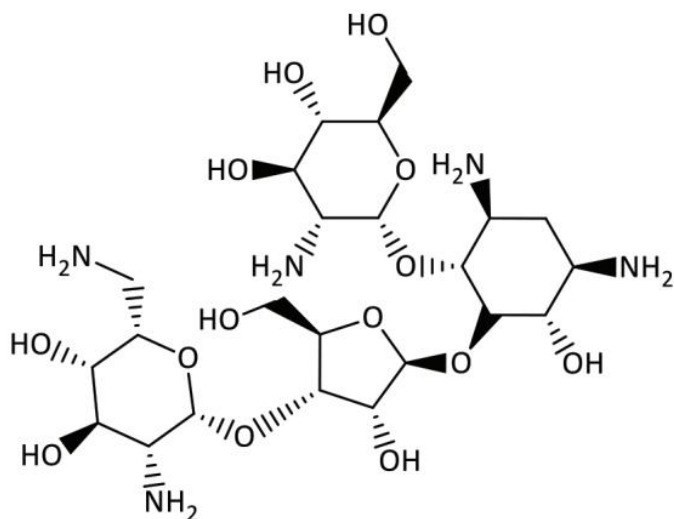


Figura 8: Estrutura molecular da paromomicina. Fonte: Drug Bank, 2018.

1.6.5. Pentamidina

Derivada sintética da amidina, a pentamidina foi amplamente utilizada nos casos de leishmaniose visceral refratários, na Índia, durante a década de 80, porém seus efeitos adversos (diabetes mellitus insulino dependente, dor e abscessos nos locais de injeção, náusea, vômito, mialgias, enxaqueca, tontura, hipotensão, síncope, hiperglicemia e hipoglicemia transitórios) acabaram por limitar extensivamente o seu emprego (Jha et al, 1991). No entanto, este fármaco permanece sendo recomendado atualmente para profilaxia secundária em pacientes portadores da coinfeção LV-HIV, conforme relatado por Diro e colaboradores (2015), os quais descreveram probabilidade de sobrevida livre de recidivas de aproximadamente 79% até 6 meses, e 71% até 1 ano, em estudo conduzido na Etiópia. A estrutura molecular da pentamidina se encontra na **Figura 9**.

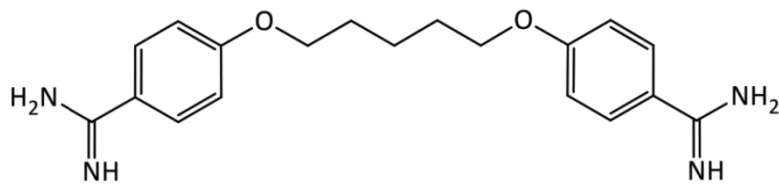


Figura 9: Estrutura molecular da Pentamidina. Drug Bank, 2018.

1.7. Controle e tratamento da leishmaniose visceral canina

Considerando-se a gravidade desta enfermidade no que se refere à saúde pública, especialmente pelo seu caráter zoonótico, diversos protocolos têm sido extensamente debatidos ao longo das últimas décadas no que tange o controle da doença, com destaque aos reservatórios caninos e insetos vetores. A eutanásia dos cães infectados, como medida de controle para a doença humana, caracteriza-se por estratégia adotada em alguns países endêmicos, a exemplo do que se observa no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil, e programas semelhantes encontrados nos países da Ásia Central. No entanto, resultados frequentemente inefetivos têm sido observados em diversas publicações científicas, a exemplo do trabalho de Gonzalez e colaboradores (2015), os quais não relataram efeitos diretos desta prática na doença humana, apesar da redução na soroconversão observada no período de estudo. Adicionalmente, trabalhos científicos envolvendo modelos matemáticos também não suportaram a efetividade da eutanásia dos cães no controle da doença humana, fato este agravado pela eliminação de reservatórios sadios, apenas reagentes sorologicamente, poder ocorrer de maneira superestimada quando testes com baixa especificidade são empregados (Costa et al, 2013). Neste contexto, o tratamento antiparasitário sistêmico dos cães, associadamente às outras medidas de controle debatidas no início deste tópico, se destaca como ferramenta adicional na diminuição da infectividade dos reservatórios aos seres humanos, conforme já relatado em literatura (Guarga et al, 2002). Na Europa, por exemplo, o

tratamento da leishmaniose visceral canina baseia-se quase que exclusivamente no emprego do antimoniato de meglumina, sob a dose de 30 a 50 mg/kg, subcutâneo, a cada 12 horas e por 4 a 6 semanas, com grande melhora clínica porém sem que haja a cura parasitológica (Solano-Gallego et al, 2009). Em 2007, o laboratório Virbac® passou a comercializar a miltefosina exclusivamente de uso médico-veterinário, para o tratamento da leishmaniose visceral canina, uma vez que resultados científicos preliminares já haviam demonstrado grande efetividade deste fármaco, principalmente quando associado ao alopurinol, fato certamente justificado pela sua contribuição através do efeito leishmaniostático (Miró et al, 2009). Adicionalmente, em 2019, Nogueira e colaboradores conduziram estudo com o emprego da miltefosina em 35 cães com leishmaniose visceral, tendo avaliado parâmetros clínicos, laboratoriais e de infectividade pós-terapêutica. Tais autores observaram importante redução dos escores clínicos e sintomatologia de maneira geral (94,2% dos animais), além da carga parasitária (98,7%) e da infectividade aos vetores flebotomíneos.

Barreiras entomológicas físicas (como redes de malha fina em janelas e canis) e químicas (repelentes), além do manejo ambiental (eliminação de material orgânico peridomiciliar) vêm sendo empregadas no controle dos vetores, porém medidas relacionadas aos reservatórios caninos se apresentam fundamentais no controle da doença humana, seja por meio do controle ectoparasiticida (inseticidas de superfície corpórea), pelo estímulo individual à resposta imune adaptativa contra *Leishmania* spp. (imunoprofilaxia), ou ainda pelo tratamento antiparasitário sistêmico, ainda bastante discutido atualmente no Brasil. A proteção dos cães (infectados ou não) contra os insetos vetores envolve piretróides sintéticos, como deltametrina, permetrina, flumetrina e fipronil, encontrando-se disponíveis sob as formas *spot-on* ou impregnação em coleiras, com períodos de proteção variando na dependência de cada formulação, porém girando em torno de 2 a 4 semanas, ou ainda 4 a 8 meses, respectivamente (Davoust et al, 2013; Otranto et al, 2010; Brianti et al, 2014). As vacinas atualmente disponíveis contra a leishmaniose visceral canina representam eficácia

protetiva relativamente baixa, variando entre 68 e 71%, portanto recomenda-se sempre sua utilização junto a outras medidas profiláticas nos reservatórios, como a utilização de coleiras impregnadas ou inseticidas tópicos, como anteriormente referido (Fernandes et al, 2014).

Outras modalidades terapêuticas vêm sendo empregadas concomitantemente à terapia leishmanicida nos cães, a exemplo de imunomodulação. A imunoterapia com domperidona e P-MAPA (agregado proteico de fosfolinoleato de amônio e magnésio e anidrido palmitoleato), já demonstrou eficácia na redução da carga parasitária e na infectividade dos reservatórios, mediante a potencialização da resposta imunológica (Gómez-Ochoa et al, 2009; Sabaté et al, 2014). A associação de alopurinol no tratamento dos cães infectados, junto a um fármaco leishmanicida ou após o seu término (durante 6 a 12 meses), também revelou importante efeito leishmaniostático e manutenção da remissão clínica a longo prazo (Miró et al, 2008).

1.8. Descoberta de fármacos

Várias são as justificativas que trazem à tona a necessidade da descoberta de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, tanto nos seres humanos como nos reservatórios, com especial destaque para o fato do Brasil contribuir com aproximadamente 96% dos casos diagnosticados na América Latina. No entanto, a descoberta de novos fármacos representa processo longo e bastante custoso do ponto de vista financeiro, com período estimado entre 10 e 17 anos, custo em aproximadamente 1,8 bilhões de dólares, além de taxa de sucesso estimada em 10% (Paul et al, 2010). Neste contexto, o reposicionamento de fármacos se caracteriza por importante estratégia, uma vez que envolvem baixo custo (comparativamente ao descobrimento de novos fármacos) e reduzem o tempo para disponibilização terapêutica, a exemplo do que ocorreu com a anfotericina B e a miltefosina na história da leishmaniose visceral. O

reposicionamento de fármacos traz vantagens principalmente no que se refere ao conhecimento prévio das informações sobre farmacocinética (PK), farmacodinâmica (PD) e segurança dos compostos químicos, já disponibilizados pregressamente aos pesquisadores, apesar do desafio existente no estabelecimento da indicação de uso do fármaco (já utilizado para outras finalidades terapêuticas) em novos alvos patológicos (Klug et al, 2016).

A seletividade e a segurança dos compostos candidatos com ação anti-*Leishmania*, adicionalmente, se apresentam como essenciais na descoberta de novos fármacos, situação esta, inclusive, já descrita previamente por Katsuno e colaboradores (2015). Tais autores estabeleceram critérios para avaliação dos compostos candidatos a serem empregados no tratamento de algumas doenças negligenciadas, incluindo na própria leishmaniose visceral. O critério de inclusão inicial na triagem de compostos se trata da potência, porém a seleção de tais moléculas segue sendo dividida, posteriormente, em duas categorias: o perfil biológico do composto (que inclui, além da potência, sua seletividade e especificidade), e suas propriedades físico-químicas, como comportamento farmacológico e toxicológico (ADMET) (Balaña-Fouce et al, 2019).

Subsequentemente à triagem farmacológica, toxicológica e físico-química, os compostos promissores podem ser empregados em estudos *in silico* e *in vitro*, para a eventual obtenção de informações que precedam experimentos *in vivo*, ou seja, caracterizando um “filtro bioquímico” de três etapas: predições ADMET-PK *in silico*, caracterização experimental *in vitro*, e finalmente, estudos PK-PD *in vivo* (Lombardo et al, 2017).

1.8.1. Compostos naturais com potencial anti-*Leishmania*

O cenário atual das leishmanioses a nível global, especialmente no que tange o grave problema de saúde pública, o ganho crescente de espaço

dos reservatórios canídeos no ambiente intradomiciliar humano, a limitação terapêutica, a resistência parasitária aos fármacos convencionais observada nas últimas décadas, e a ausência de vacinas disponíveis para a imunoprofilaxia da doença humana, como ressaltado anteriormente, acaba por trazer à tona a necessidade de novas estratégias terapêuticas para controle desta enfermidade. Seguindo-se o objetivo de eliminar as doenças negligenciadas tropicais até 2030, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu, para controle das leishmanioses, estratégias como o desenvolvimento de vacinas (para imunoprofilaxia da doença humana) e terapias com maior efetividade e menor toxicidade, para ambas as formas clínicas da doença (cutânea e visceral) (WHO, 2020). Neste contexto, a descoberta de compostos naturais com atividade anti-*Leishmania* pode contribuir expressivamente no desenvolvimento de novas e efetivas abordagens terapêuticas, eventualmente tanto para os reservatórios caninos quanto aos seres humanos, favorecendo o controle da doença em escala mundial (Passero et al, 2018).

Historicamente, os compostos naturais representam grande benefício, contribuindo com diversas moléculas para a terapia de moléstias infecciosas. Um clássico exemplo é a quinina, um alcaloide derivado da planta *Chinchona officinalis* e utilizado pioneiramente no tratamento da malária (Sullivan, 2012). Neste contexto, com destaque para os compostos naturais com ação anti-*Leishmania*, as Américas contribuem expressivamente com publicações científicas, fato certamente relacionado à extensa biodiversidade vegetal presente nesta região (Silva et al, 2018).

No que se refere aos compostos com atividade anti-*Leishmania* propriamente dita, diversos extratos e óleos essenciais vêm sendo investigados nas últimas décadas, seja por sua atividade direta sobre o parasita, ou ainda indiretamente potencializando a resposta imunológica do indivíduo infectado, configurando efeito imunomodulatório. O estímulo ou bloqueio de determinadas citocinas, neste contexto, justifica alterações na progressão da doença, muitas vezes sem representar toxicidade e

consequente destruição tecidual. Popularmente conhecida como “Evanta”, *Angostura longi* se trata de uma planta largamente utilizada para o tratamento da leishmaniose na Bolívia, apresentando efeito antiparasitário direto sobre *Leishmania braziliensis* e, em humanos e modelos murinos, interferindo diretamente na ativação dos linfócitos T, além de reduzir a expressão de INF- γ em células esplênicas e mononucleares do sangue periférico (tais efeitos se devem principalmente ao 2-fenilquinolina, um composto isolado do extrato rico em alcaloides do referido vegetal) (Calla-Magarinos et al, 2009). A planta *Xylopia discreta* já demonstrou atividade anti-*Leishmania* e imunomodulatória (estímulo na produção da proteína quimioatrativa de monócitos, ou MCP-1), por meio de seu extrato metanólico e óleo essencial extraído das folhas (Lopez et al, 2009). Os extratos das folhas e sementes de *Azadirachta indica* (particularmente a fração acetato de etila), do ponto de vista experimental, uma resposta de citocinas para o fenótipo TH-1, com altos níveis de TNF- α , IL-8 e IL-1 β , e concomitante supressão das citocinas TH-2 (Daykar et al, 2015). Já a espécie vegetal *Laennecia confusa*, por meio dos extratos aquoso e em clorofórmio, apresentou efeito antiparasitário sobre *L. donovani*, porém sem concomitante efeito imunomodulatório (Ruiz et al, 2012). A espécie *Galium mexicanum* foi submetida à extração e isolamento de flavonóides, glicosídeos iridóides, ácidos iridóides, saponinas triterpenos e antraquinonas, com as frações de hexano, tendo demonstrado atividade sobre promastigotas, e a fração em metanol, reduzido a produção de IL-6 por macrófagos ativados por LPS (Bolivar et al, 2011). As frações de hexano, em metanol e o extrato em clorofórmio de *Lopezia racemosa*, inibiram o crescimento de *L. donovani*, além de terem suprimido a secreção de IL-6 por macrófagos (Paredes et al, 2013). O extrato do caule e das folhas de *Croton caudatus* permitiu o isolamento de terpenos como a crotoncaudina, isocrotoncaudina, crotoncaudatina e crocaudatol, sendo que a fração em hexano, inibiu a proliferação de promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, além de ter estimulado a produção de citocinas proinflamatórias (IL-12 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) (Dey et al, 2015).

Yamamoto e colaboradores, em 2015 (Yamamoto et al, 2014), através da fração rica em triterpenos de *Bacchari sincinella*, demonstraram a indução da resposta TH-1 (com altos níveis de IL-12 e INF- γ) em modelo murino.

Seguindo-se nesta compilação de publicações acerca de pesquisas com produtos naturais exercendo efeito anti-*Leishmania*, podemos ainda citar o trabalho de Islamuddin e colaboradores (2015) com a *Artemisia annua*, os quais, utilizando suas folhas e sementes, demonstraram o estímulo à produção de INF- α (resposta TH-1) e a concomitante supressão de IL-4 e IL-10 (resposta TH-2), além do aumento no número de células CD⁴⁺ e CD⁸⁺, linfoproliferação, regulação na expressão de CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos, e elevação dos níveis de óxido nítrico. Adicionalmente, o extrato de *Lophanthera lactescens*, em trabalho desenvolvido por Danelli e colaboradores (2009), apresentou grande potência contra amastigotas intracelulares (CE₅₀ de 0,41 μ g/ml), com ausência de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos. Já com relação à investigação de *Piper nigrum*, seu principal alcaloide piperina e o análogo fenilamida foram empregados sobre promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, tendo-se apresentado ativos e sinérgicos, elevando o potencial leishmanicida (Ferreira et al, 2011). Semelhantemente, o extrato hexano dos galhos de *Nectandra leucanta*, apresentaram-se ativos contra promastigotas de *L. donovani*, além de seus dímeros fenilpropanóides terem atuado sobre a supressão das citocinas IL-6 e IL-10, ambas envolvidas na resposta TH2 (Costa-Silva et al, 2015). Os compostos ativos extraídos das plantas acima descritas apresentam suas estruturas moleculares ilustradas na **Figura 10**.

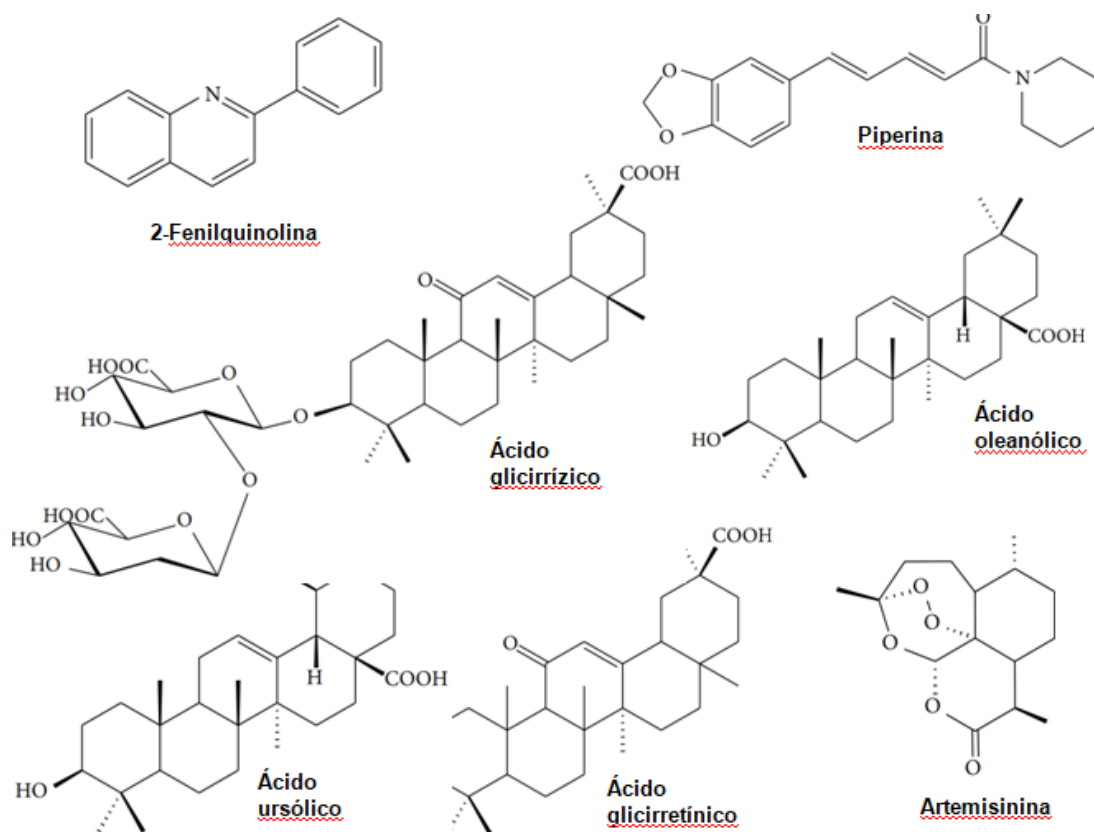


Figura 10: Estruturas moleculares dos compostos ativos com atividade anti-*Leishmania* e imunomoduladora, extraídos de produtos naturais. Fonte: Rodrigues et al, 2015.

1.8.2. Compostos derivados do gibilimbol com efeito antiparasitário

A descoberta de compostos com ação antiparasitária possui extenso e promissor campo de investigação nas moléculas derivadas de produtos naturais, especialmente quando se trata de enfermidades negligenciadas. Neste contexto, destaca-se a família botânica *Piperaceae*, com os gêneros de maior abundância sendo representados por *Piper* e *Peperomia*, os quais apresentam, respectivamente, aproximadamente 700 e 600 espécies (Jaramilo et al, 2004). Estudos prévios já isolaram diversos compostos bioativos de espécies de *Piper* spp., dos quais são incluídos lignanas, alcaloides, cromenos, amidas e ácidos benzoicos, alguns deles, inclusive, com atividade tripanocida e anti-*Leishmania* (Lago et al, 2009; Batista et al 2011).

Popularmente conhecida como “Pariparoba-murta”, a espécie *P. malacophyllum*, de ocorrência restrita às regiões sudoeste e sul do Brasil, vem sendo amplamente estudada nas últimas décadas, especialmente no que se refere ao isolamento dos referidos compostos bioativos, como os piperólidos extraídos de folhas com ação antifúngica contra *Cladosporium* sp., e ainda os compostos fenólicos denominados gibbilimbol A e B (**Figura 11**), bioativos contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (De Oliveira et al, 2012). Subsequentemente, algumas séries de análogos derivados da estrutura molecular simples dos referidos compostos fenólicos foram estudadas, a exemplo do estudo realizado por Varela et al, em 2016, os quais analisaram análogos com diferentes grupos funcionais (ésteres, amidas, iminas, cetonas α,β -insaturadas e seu correspondente álcool) na cadeia correspondente ao anel fenólico, e observaram melhora na atividade biológica, porém com aumento na toxicidade às células de mamífero. Consequentemente, estudos posteriores foram conduzidos excluindo-se o grupo fenólico, tendo demonstrado manutenção da atividade antiparasitária com menor perfil de citotoxicidade, fato que trouxe à tona a possibilidade da referida toxicidade se relacionar com a hidroxila fenólica (Varela 2017). Desta maneira, devido ao extenso campo de pesquisa acerca do efeito antiparasitário dos compostos isolados de produtos naturais, diversos estudos continuam sendo desenvolvidos inclusive com análogos destas moléculas, com o intuito de aperfeiçoamento em sua potência antiparasitária e diminuição da citotoxicidade às células de mamíferos, para que alguns candidatos atuem, posteriormente, como protótipos para fármacos.

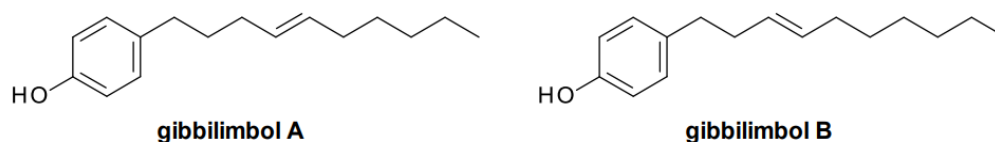


Figura 11: Estrutura molecular dos compostos fenólicos gibbilimbol A e B, isolados de *Piper malacophyllum*. Fonte: Varela et al, 2016.

1.9. Justificativa

O grave problema de saúde pública envolvendo a doença humana e os reservatórios caninos, associado à resistência parasitária aos tratamentos convencionais e ao fato das estratégias de controle terem apresentado efetividade limitada até o presente momento (especialmente a eutanásia dos animais infectados), representam os principais fatores que reforçam a necessidade de novos estudos acerca de fármacos com efeito anti-*Leishmania*. Os protótipos naturais, conforme já debatido, justificam grande fonte de pesquisa na terapêutica desta enfermidade, uma vez que diversas publicações nos últimos anos já identificaram moléculas promissoras em ensaios *in vitro*, a exemplo das moléculas semissintéticas e/ou sintéticas derivadas do gibilimbol. Por este motivo, optamos, pelo presente estudo, por dar continuidade aos ensaios com tais moléculas, a fim de se obter candidatos naturais a protótipos farmacêuticos com elevada potência contra *Leishmania (L.) infantum*, auxiliando, eventualmente, o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas na doença canina.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro*, a atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* dos compostos sintéticos derivados do gibilimbol, e de acordo com os resultados, empregar os compostos mais ativos em estudos de mecanismo de ação.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀), *in vitro*, dos compostos sintéticos sobre as formas amastigotas (intracelulares) e promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

2. Determinar a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀), *in vitro*, dos compostos sintéticos em células de mamífero

3. Estudar os possíveis mecanismos de ação dos compostos mais promissores, avaliando: (I) a permeabilidade da membrana plasmática; (II) o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$); (III) níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS); (IV) níveis de cálcio intracelular (Ca²⁺); e (V) alterações dos acidocalcissomos.

4. Estudar *in silico*, as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos compostos promissores.

5. Analisar, por meio de espectrometria de massas relacionada à técnica MALDI-TOF, eventuais alterações no perfil protéico de *Leishmania (L.) infantum* incubadas com os compostos mais ativos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes Sytox® Green, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1), laranja de acridina e fluo-4 AM foram adquiridos da Molecular Probes® (Invitrogen™). Soro fetal bovino (SFB), por sua vez, foi obtido da Gibco® (Thermo Fisher Scientific™), sulfato de gentamicina da Hipolabor Farmacêutica®, e outros eventuais reagentes utilizados não citados neste tópico foram obtidos da Sigma-Aldrich™. O espectrofluorímetro FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices™) e o citômetro de fluxo Atunne NxT (Thermo Fisher Scientific™) foram utilizados para a leitura de fluorescência luminescência e absorbância.

3.2. Modelos experimentais

Os animais utilizados para experimentação caracterizaram-se por Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c, fêmeas, obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) e mantidos em ambiente controlado (caixas esterilizadas), com a oferta de água e alimento *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados com os referidos animais foram previamente avaliados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Adolfo Lutz (Projeto CTC 72-J / 2017) (Anexo 1).

3.3. Células de mamíferos

As culturas de células de mamíferos foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com NaHCO₃ (24 mM), sulfato de gentamicina (20 µg/ml) e soro fetal bovino (10%), além de submetidas a temperatura de 37°C, concentração de CO₂ de 5%, e pH 7,2. Fibroblastos originados de tecido conjuntivo de camundongos, NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™), foram fornecidos pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, e macrófagos peritoneais foram obtidos por meio da lavagem peritoneal de camundongos BALB/c com RPMI-1640 adicionado de NaHCO₃ (24 mM), sulfato de gentamicina (20 µg/ml) e soro fetal bovino (10%) sob pH 7,2.

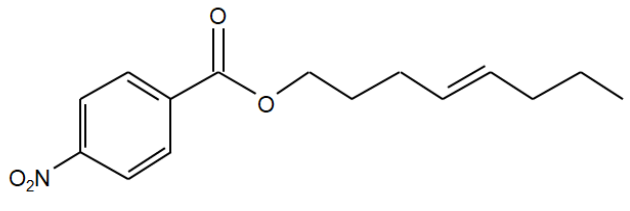
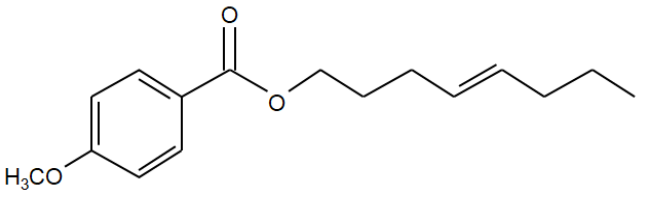
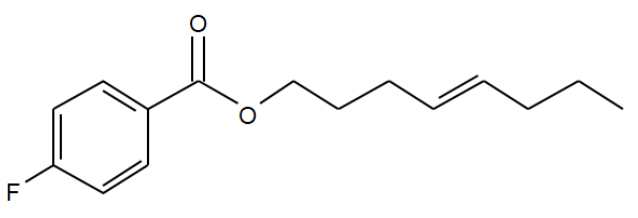
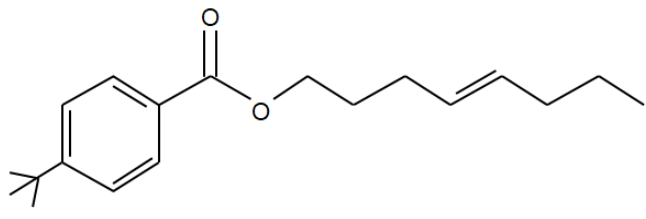
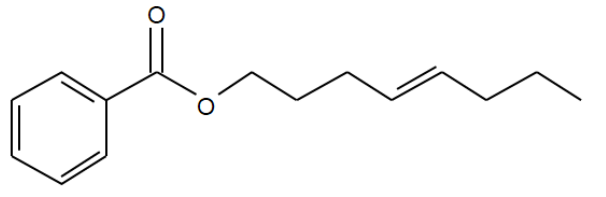
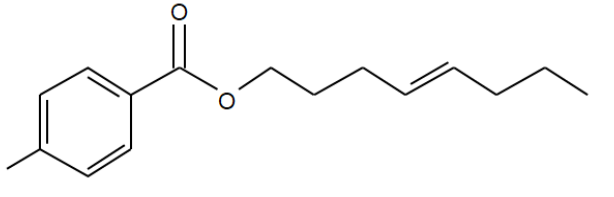
3.4. Parasitas

As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio 199 suplementado com NaHCO₃ (26 mM), L-glutamina (2 mM), sulfato de gentamicina (20 µg/ml), soro fetal bovino (10%), hemina (0,25%) e urina humana (5%) a 24°C e pH 7,2. Já as formas amastigotas foram obtidas pela centrifugação diferencial esplênica de hamsters dourados entre 60 e 70 dias após a infecção, e o número de parasitas, determinado pelo método de Stauber e colaboradores (1958). A cepa em questão foi submetida à manutenção por meio da infecção mensal de hamsters dourados (1×10^8 amastigotas por animal).

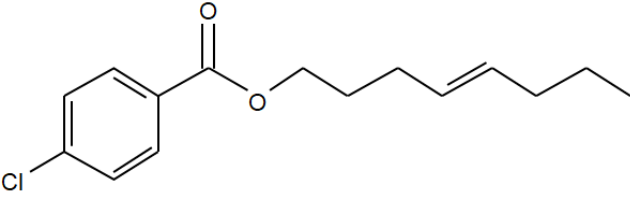
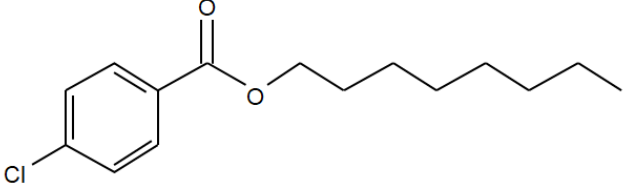
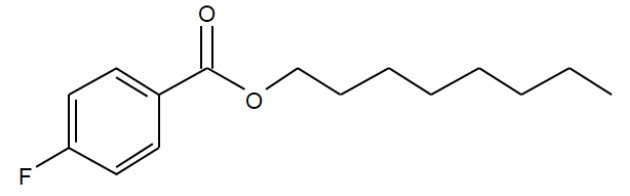
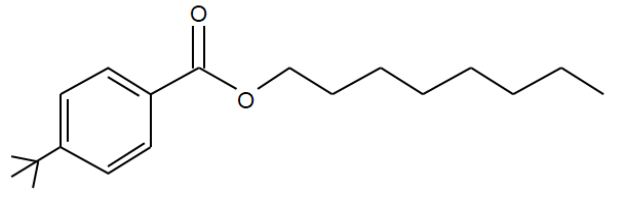
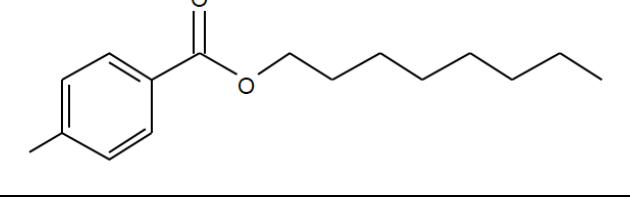
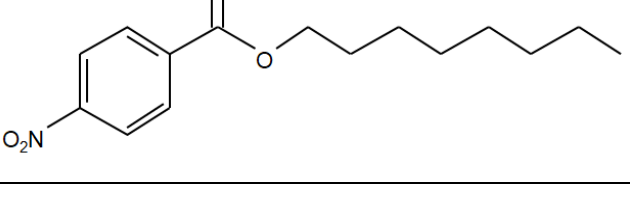
3.5. Derivados do gibilimbol avaliados

Com base em resultados preliminares do grupo em relação à atividade anti-*Leishmania infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados do gibilimbol B (Varela et al, 2016; Varela et al, 2017; Varela et al, 2018; De Oliveira et al, 2012), realizamos uma nova série para explorar a diversidade eletrônica dos grupos aromáticos, mantendo o comprimento da cadeia alifática lateral, visando fazer um balanço da polaridade dos compostos. Adicionalmente, foram sintetizados derivados contendo ligações duplas na cadeia lateral. A síntese e caracterização estrutural destes derivados éster e amidas foram realizadas pelo grupo do Prof. Dr. João Henrique G. Lago, da Universidade Federal do ABC. A análise espectroscópica foi realizada utilizando-se ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , bem como espectrometria de massas de alta resolução. As estruturas químicas encontram-se na **Tabela 1**.

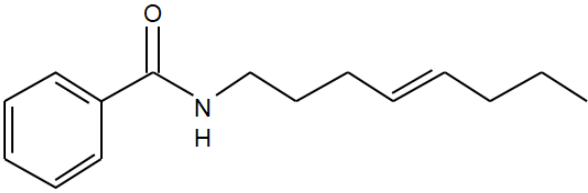
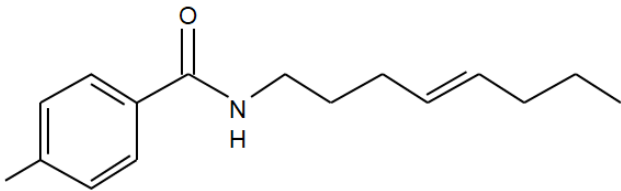
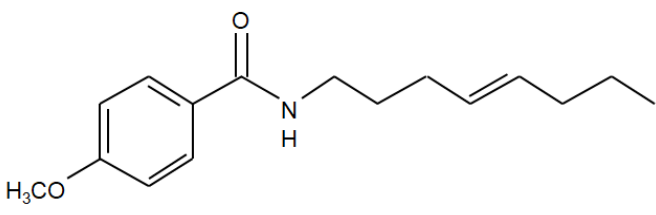
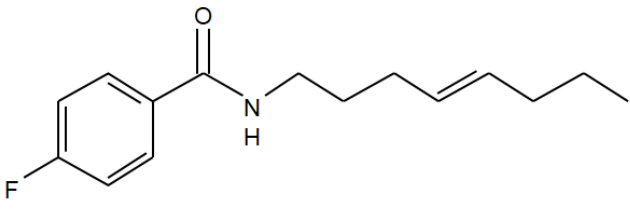
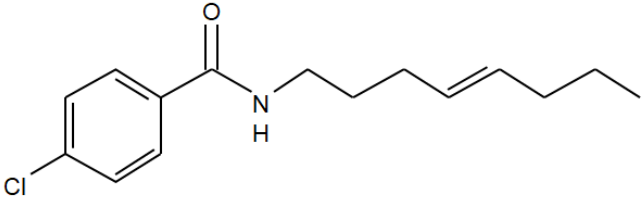
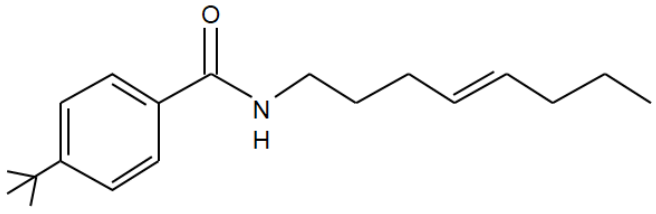
Tabela 1: Estrutura química e massa molecular dos 25 compostos derivados do gibilimbol testados sobre *Leishmania (L.) infantum*.

Composto	Estrutura molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
LPM-1		277,31
LPM-2		262,34
LPM-3		250,3
LPM-4		288,42
LPM-5		232,31
LPM-6		246,34

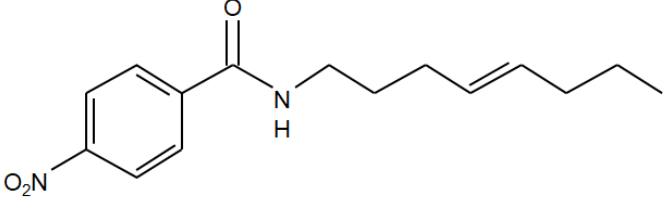
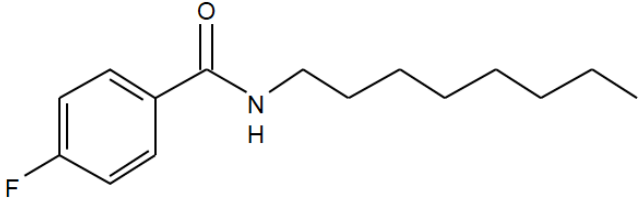
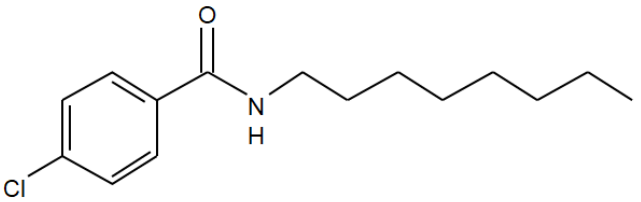
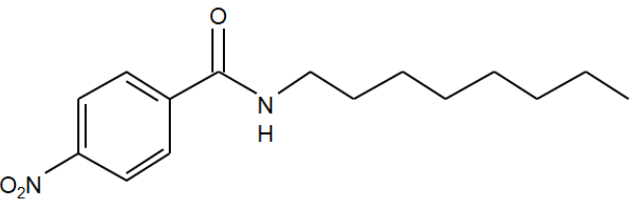
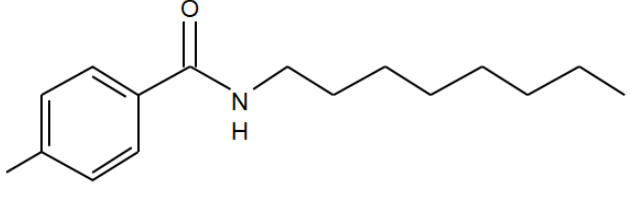
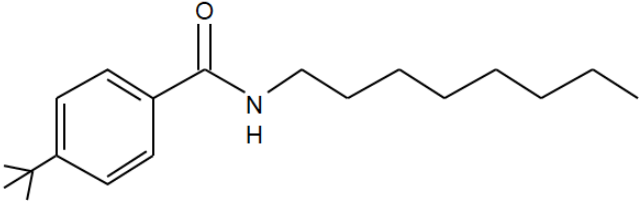
Continuação tabela 2

Composto	Estrutura molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
LPM-7		266,76
LPM-8		268,77
LPM-9		252,32
LPM-10		290,44
LPM-11		248,36
LPM-12		279,33

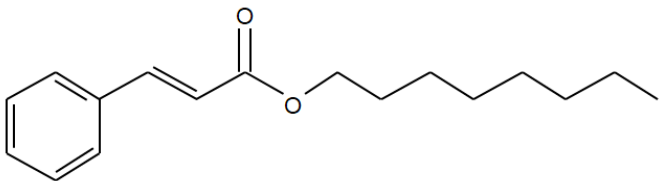
Continuação tabela 2

Composto	Estrutura molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
LPM-13		231,33
LPM-14		245,35
LPM-15		261,35
LPM-16		249,32
LPM-17		265,77
LPM-18		287,43

Continuação tabela 2

Composto	Estrutura molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
LPM-19		276,33
LPM-20		251,33
LPM-21		267,79
LPM-22		278,34
LPM-23		247,37
LPM-24		289,45

Continuação tabela 2

Composto	Estrutura molecular	Massa molar (g.mol ⁻¹)
LPM-25		260,37

3.6. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀)

Foram utilizadas placas NUNC de 16 poços para a incubação de macrófagos peritoneais (1×10^5 células por poço) murinos, realizada sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂. A infecção destas células foi procedida com a proporção de 10 amastigotas para cada macrófago, e após 24 horas, as placas foram tratadas com os compostos acima descritos durante 96 horas (sob as mesmas condições acima citadas), os quais foram diluídos serialmente em base 2, com início em 60 µM e término em 3 µM. O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão, e o controle negativo se caracterizou pelas células não tratadas (100% de viabilidade). Ao final, a fixação celular foi realizada com metanol, a coloração com Giemsa, e a avaliação microscópica em microscópio óptico, de acordo com metodologia descrita por Tempone e colaboradores (2007). A concentração efetiva 50% (CE₅₀) foi obtida por meio da contagem diferencial de 200 macrófagos por poço, através da determinação do índice de infecção (IF), de acordo com Chang e colaboradores (1986).

$$IF = \frac{\text{macrófagos infectados x amastigotas intracelulares}}{\text{macrófagos totais}}$$

3.7. Determinação *in vitro* da concentração citotóxica 50% (CC₅₀)

Placas de 96 poços foram utilizadas para a incubação de células NCTC, sob a proporção de 6×10^4 células por poço, temperatura de 37°C, 5% de CO₂ e durante 96 horas. Os compostos foram empregados sob diluição seriada em base 2, com início na concentração de 200 µM e término em 1,6 µM, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Subsequentemente, a fim de se verificar a viabilidade celular, o teste do MTT foi empregado (20 µL por poço) mediante a incubação por 24 horas e posterior interrupção da reação com duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (80 µL por poço). Após 24 horas, a placa foi submetida à leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (Tada et al, 1986). Novamente a miltefosina foi utilizada como fármaco padrão, e as células não tratadas como controle negativo (100% de viabilidade). Com o intuito de se observar possíveis interferências na leitura, foram adicionados controles contendo apenas os compostos e MTT.

3.8. Determinação do índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade dos compostos, por sua vez, foi determinado por meio da seguinte equação:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em células de mamíferos}}{CE_{50} \text{ em amastigotas intracelulares}}$$

3.9. Determinação dos parâmetros físico-químicos, ADMET e PAINS (in silico)

Com o intuito de se avaliar precocemente os parâmetros farmacocinéticos relacionados aos compostos com maior atividade, mediante dados obtidos nos experimentos anteriores, a ferramenta virtual SwissADME foi empregada para a predição *in silico*, de acordo com Daiana e colaboradores (2017). Tal metodologia permite, dentre outras análises, a avaliação da estrutura química e previsão de biodisponibilidade (incluindo propriedades físico-químicas como lipofilidade, tamanho molecular, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação), massa e refratividade moleculares, solubilidade aquosa, absorção gastrointestinal, permeabilidade pela barreira hematoencefálica e afinidade pela glicoproteína P, potenciais interações com a superfamília enzimática citocromo P450, perfil farmacocinético para o potencial de administração oral da molécula (frequentemente definido como drug-likeness), e a identificação de moléculas PAINS (ou Pan Assay Interference Compounds, moléculas contendo estruturas que desempenham potentes respostas *in vitro* não seletivas às proteínas-alvo). Neste contexto, esta plataforma retorna alertas estruturais, que consistem em uma lista de 105 fragmentos químicos (descrita por Brenk e colaboradores, em 2008) potencialmente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou possuindo propriedades que os caracterizam como falhos, do ponto de vista farmacocinético.

3.10. Determinação do mecanismo de ação em promastigotas

Considerando-se a potência e seletividade dos compostos, obtidos nos ensaios com amastigotas intracelulares e sobre as células de mamíferos, bem como sua disponibilidade para os ensaios subsequentes, foram selecionados os compostos **LPM-21** e **LPM-22** para os estudos *in vitro* de mecanismo de ação, realizados com promastigotas de *Leishmania (L.)*

infantum em fase exponencial tardia e meio HBSS suplementado com NaHCO₃ (4,2 mM) e D-glicose (10 mM). Previamente, objetivando-se adequar as condições experimentais de concentração e tempo, foi procedido um ensaio de CE₅₀ com promastigotas mediante o emprego de 2x10⁶ parasitas por poço em placas de 96 poços, bem como os compostos **LMP-21** e **LPM-22**, diluídos seriadamente em base 2 (concentração inicial de 200 µM e final de 1,6 µM), incubados sob temperatura de 24°C. As avaliações foram realizadas durante as 4 primeiras horas, e após a incubação, a viabilidade celular foi determinada por meio do método MTT descrito previamente. A leitura da placa foi procedida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm, e as células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

3.10.1. Permeabilização da membrana plasmática

O fluoróforo Sytox® Green apresenta afinidade por ácidos nucleicos, sendo impermeável às células com viabilidade preservada. Logo, células necróticas ou sob apoptose tardia permitem a penetração desta molécula, com a fluorescência se relacionando diretamente à quantidade de fluoróforo internalizada pela célula, fato que justifica o seu emprego na avaliação da viabilidade celular (Johnson e Spence, 2010). Este marcador fluorescente, sob a concentração de 1µM, foi incubado junto à promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase exponencial tardia, utilizando-se placas pretas de 96 poços com 2x10⁶ parasitas por poço, em meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific Inc®, MA, USA) suplementado com bicarbonato de sódio (concentração de 4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 24°C durante 15 minutos. Subsequentemente, a placa foi submetida à leitura basal de fluorescência, com a adição posterior dos compostos **LPM-21** (141,5 µM) e **LPM-22** (110,1 µM) e a determinação da fluorescência a cada 20 minutos durante 4 horas. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro FilterMax® F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular

Devices, CA, USA) com filtros de excitação de 485 nm, e emissão de 520 nm, segundo metodologia de Chicharro e colaboradores (2001). Os parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (membranas celulares com 100% de integridade), e a permeabilização máxima foi obtida mediante o emprego de Triton X-100, sob concentração de 0,5%. Os ensaios foram realizados em triplicata, e controles envolvendo apenas os compostos e o referido fluoróforo foram adicionados em todos os experimentos, para a avaliação de eventuais interferências nos resultados de fluorescência.

3.10.2. Estudo dos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS)

O diacetato de diclorodihidrofluoresceína, também conhecido como diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) foi utilizado como marcador (permeável às membranas celulares) para a detecção das espécies reativas do oxigênio (ROS). Esta sonda inicialmente não apresenta fluorescência, porém após a clivagem e oxidação dos grupos acetato pelas esterases intracelulares, é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), uma molécula com grande fluorescência (Johnson e Spence, 2010). Placas pretas de 96 poços foram utilizadas para a incubação de promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase exponencial tardia (2×10^6 parasitas por poço) junto aos compostos **LPM-21** e **LPM-22** (141,5 μM e 110,1 μM , respectivamente), em meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific Inc®, MA, USA) suplementado com bicarbonato de sódio (concentração de 4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 24°C e durante 4 horas. Subsequentemente, o diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), sob concentração de 5 μM foi adicionado e incubado durante 15 minutos, com posterior medição da fluorescência em espectrofluorímetro FilterMax® F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA) com filtros de excitação de 485 nm, e emissão de 520 nm (Mukherjee et al, 2002). Parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo (com 100% de integridade), e os níveis

máximos de ROS foram determinados na presença de peróxido de hidrogênio, sob concentração de 400 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata, e controles envolvendo apenas os compostos e o fluoróforo em questão foram novamente adicionados aos experimentos, a fim de se verificar interferências nos valores de fluorescência.

3.10.3. Estudo dos níveis de cálcio intracelular (Ca²⁺)

A determinação dos níveis de cálcio intracelular foi realizada por meio do emprego do marcador Fura-2 AM, o qual é composto por sais de sódio e potássio, bem como ésteres acetoximetil (AM). Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, em fase exponencial tardia e sob a concentração de 2x10⁶ parasitas/poço, foram pré-tratadas com o marcador Fura-2 AM (concentração de 5 µM) em PBS a 24°C durante 40 minutos, e após duas lavagens, permaneceram dispostas em placas pretas de 96 poços e submetidas a uma leitura basal. Posteriormente, os compostos **LPM-21** (141,5 µM) e **LPM-22** (110,1 µM) foram adicionados aos referidos poços, com a fluorescência tendo sido determinada em 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240 minutos, por meio de espectrofluorímetro FilterMax® F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA) com filtros de excitação de 485 nm, e emissão de 535 nm (Corral et al, 2016). Níveis máximos de cálcio foram obtidos na presença de Triton X-100 (concentração de 0,5%), e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo, representando 100% de viabilidade a níveis basais.

3.10.4. Alterações nos acidocalcissomos

Os acidocalcissomos são organelas responsáveis pelo armazenamento de cálcio e se encontram presentes em uma grande diversidade de organismos, tendo sido reconhecidos inicialmente em bactérias. Após pré-

tratamento com laranja de acridina (concentração de 4 μ M) em PBS durante 5 minutos e 24°C, as promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, sob concentração de 2x10⁶ parasitas por poço, foram então lavadas e dispostas em placas de 96 poços. Subsequentemente, foi procedida a leitura basal de fluorescência, e os compostos **LPM-21** (141,5 μ M) e **LPM-22** (110,1 μ M) foram adicionados, com a fluorescência tendo sido monitorada nos tempo 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 182, 200, 220 e 240 minutos, em espectrofluorímetro FilterMax® F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA) com filtros de excitação de 485 nm, e emissão de 535 nm (Serrano-Martin et al., 2009). Níveis máximos de alcalinização foram obtidos na presença de nigericina sob concentração de 4%, e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo, representando 100% de viabilidade a níveis basais. Os ensaios foram realizados em triplicata, e controles envolvendo apenas os compostos e o fluoróforo em questão foram adicionados aos experimentos, a fim de se verificar interferências nos valores de fluorescência.

3.10.5. Estudo do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

A sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- iodeto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), sob baixas concentrações ou baixo potencial de membrana, se encontra na forma de monômeros (fluorescência verde). Já quando em altas concentrações (soluções aquosas acima de 0,1 μ M) ou sob altos potenciais, o JC-1 dá origem a "J-agregados" vermelho fluorescentes, com espectro de emissão variando entre 530 (coloração verde) e 590 nm (coloração vermelha). Desta maneira, a despolarização da membrana mitocondrial pode ser determinada pela razão entre a fluorescência vermelha e a verde, uma vez que a formação dos referidos "J-agregados" (Johnson e Spence, 2010).

Os compostos **LPM-21** (141,5 μ M) e **LPM-22** (110,1 μ M) foram incubados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* em fase

exponencial tardia, na quantidade de 2×10^6 parasitas por poço, em meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Thermo Fisher Scientific Inc®, MA, USA) suplementado com bicarbonato de sódio (concentração de 4,2 mM) e D-glicose (10 mM), a 24°C, por 2 horas, e após uma lavagem, a sonda JC-1 foi adicionada sob a concentração de 10 μ M. Sequencialmente, procedeu-se nova incubação por 20 minutos sob a mesma temperatura acima registrada, e a fluorescência foi determinada em citômetro de fluxo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific Inc®, MA, USA) com filtro de excitação de 488 nm, e emissão de 530 nm (BL-1) e 574 nm (BL-2). A razão entre BL-2 (vermelha) e BL-1 (verde) caracterizou o potencial de membrana mitocondrial (Mukherjee et al, 2002), com a despolarização máxima tendo sido obtida na presença de carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP). Parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo, representando 100% de viabilidade e potencial de membrana mitocondrial preservado.

3.11. Caracterização do perfil espectral proteico parasitário (MALDI-TOF MS)

A técnica MALDI-TOF/MS (*matrix-assisted laser desorption ionization – time of light*), foi empregada para a avaliação das alterações proteicas em *Leishmania infantum*, especialmente no que se refere ao espectro de massas de tais proteínas. Para tanto, foi procedida a incubação por 24 horas a 24°C, de promastigotas em fase estacionária (1×10^7) em meio M199 (caracterizando o controle), com os compostos **LPM-21** (141,5 μ M) e **LPM-22** (110,1 μ M), e com o fármaco padrão (miltefosina), após prévia lavagem em PBS. Subsequentemente, tais culturas foram centrifugadas (em tubo Falcon) a 3000 x g durante 10 minutos, sob temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, e o pellet originado foi submetido à lavagem com 1 mL de água estéril por 2 vezes, sendo posteriormente centrifugado a 3000 x g ainda sob temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspenso em 0,3 mL de água estéril, e posteriormente em 0,9 mL de etanol absoluto. Esta solução foi agitada durante 30 segundos, e

centrifugada a 10.000 x g durante por 5 minutos, sob temperatura ambiente, com o *pellet* residual tendo sido submetido à ressuspensão em 20 µL de ácido fórmico a 70% (v/v), e posteriormente ao mesmo volume de acetonitrila P.A. A suspensão foi novamente agitada durante 30 segundos, e centrifugada a 10.000 x g durante 5 minutos (temperatura ambiente), e 1 µL de sobrenadante foi disposto sobre a placa de aço (em duplicatas), com secagem à temperatura ambiente (Mouri et al, 2014). Por fim, 1 µL da solução matriz do MALDI-TOF/MS (ácido α-ciano-4-hidroxi- cinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético) foi disposta sobre as amostras já secas. O teste bacteriológico padrão para extração proteica (DH5-alfa *Escherichia coli*) foi adicionado na referida placa para calibração externa (Peng et al, 2019), e a análise foi realizada no espectrômetro de massas BrukerAutoflex III MALDI-TOF/MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha), com o laser de nitrogênio disposto a 337 nm. A faixa de massas foi calibrada entre 2.000 e 20.000 m/z. Um total de 500 disparos aleatórios de laser, para cada espectro, foi coletado. Os dados foram automaticamente extraídos pelo software AutoXecute of the Flex Control 3.3, e posteriormente direcionados ao software MaldiBiotyper 3.1 (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemanha). Apenas picos com uma razão sinal/ruído maior que 3 foram considerados (Mouri et al, 2014).

3.12. Análises estatísticas

Os resultados de concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e concentração efetiva 50% (CE₅₀) foram obtidos por meio de curvas sigmóides dose-resposta, e a significância estatística entre as amostras foi determinada com os valores de P pelo método One-Way ANOVA, utilizando-se o teste Tukey's Multiple Comparison. Adicionalmente, o software Graph Pad Prism® 5 (Graph Pad Software, CA, USA) foi empregado em todas as análises, as quais, do ponto de vista experimental, foram realizadas em triplicata, tendo-se reproduzido minimamente duas vezes cada ensaio (os resultados a

serem apresentados se referem aos ensaios de maior representatividade) . A significância estatística foi considerada mediante valores de p abaixo de 0,05 (95% de intervalo de confiança), para todos os experimentos.

4. Resultados

4.1. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀), concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e índice de seletividade (IS)

Dentre os 25 compostos testados, 4 apresentaram atividade sobre as formas amastigotas intracelulares, com o CE₅₀ variando entre 5,1 e 13,5 µM (**Tabela 2**). Ainda, o composto **LPM-24** apresentou-se como o mais potente neste estudo, com o valor de CE₅₀ de 5,1 µM, similar ao do fármaco padrão miltefosina (6,5 µM). No que se refere à citotoxicidade em células de mamífero (fibroblastos murinos), todos os compostos foram avaliados, e nenhum dos 4 compostos ativos contra *Leishmania (L.) infantum* revelou citotoxicidade. A miltefosina apresentou um valor de CC₅₀ de 119,7 µM. Os demais compostos não apresentaram citotoxicidade até a concentração máxima testada, ou seja, 200 µM.

O índice de seletividade (IS) dos compostos, definido pela razão entre sua citotoxicidade em células de mamíferos e atividade anti-*Leishmania* sobre amastigotas intracelulares, revelou valores maiores que 14,8.

Tabela 2: Avaliação atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* em promastigotas e amastigotas, citotoxicidade em células NCTC e índice de seletividade dos compostos inseridos neste estudo (incluindo o fármaco padrão miltefosina).

Composto	CE₅₀ Promastigotas (μM) \pm DP	CE₅₀ Amastigotas (μM) \pm DP	CC₅₀ (μM) \pm DP	IS
LPM 01	99,6 \pm 1,4	NA	> 200	ND
LPM 02	> 150	NA	> 200	ND
LPM 03	> 150	NA	> 200	ND
LPM 04	> 150	NA	> 200	ND
LPM 05	> 150	NA	> 200	ND
LPM 06	115,9 \pm 2,4	NA	> 200	ND
LPM 07	> 150	NA	> 200	ND
LPM 08	> 150	NA	> 200	ND
LPM 09	> 150	NA	> 200	ND
LPM 10	> 150	NA	> 200	ND
LPM 11	> 150	NA	> 200	ND
LPM 12	28,2 \pm 4,0	13,5 \pm 13,6	> 200	> 14,8
LPM 13	> 150	NA	> 200	ND
LPM 14	66,9 \pm 6,4	NA	> 200	ND
LPM 15	> 150	NA	> 200	ND
LPM 16	67,4 \pm 1,3	NA	> 200	ND
LPM 17	73,3 \pm 4,3	NA	> 200	ND
LPM 18	66,0 \pm 1,0	NA	> 200	ND
LPM 19	49,8 \pm 4,0	NA	158,2 \pm 37,3	ND
LPM 20	64,1 \pm 3,5	NA	156,8 \pm 1,0	ND
LPM 21	41,9 \pm 2,1	12,7 \pm 4,9	> 200	> 15,7
LPM 22	44,3 \pm 0,4	12,2 \pm 7,2	> 200	> 16,4
LPM 23	66,3 \pm 6,0	NA	> 200	ND
LPM 24	> 150	5,1 \pm 1,9	> 200	>39,2
LPM 25	> 150	NA	> 200	ND
Miltefosina	5,1 \pm 0,6	6,5 \pm 3,0	119,7 \pm 4,2	18,4

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; IS: Índice de Seletividade; DP: Desvio Padrão.

4.2. Predições *in silico*

Os compostos **LPM-21** e **LPM-22** foram selecionados para as avaliações *in silico* e estudos de mecanismo de ação (a serem debatidos a seguir), de acordo com sua potência, seletividade e disponibilidade. A predição *in silico* foi realizada pela plataforma SwissADME, especialmente com relação a presença de moléculas interferência (*PAINS*), propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (**Tabela 3**). A capacidade de penetração celular, determinada pela caracterização quantitativa da lipofilicidade dos compostos candidatos a futuros fármacos, foi representada, neste estudo, pelo coeficiente de partição (log P), o qual demonstrou maior lipofilicidade de **LPM-21** (4,38) comparativamente ao **LPM-22** (2,84). A solubilidade em água (log S) demonstrou ambos os compostos revelando valores relativamente próximos (-4,37 e -3,42), encontrando-se na faixa que configura razoável solubilidade aquosa (entre -1 e -5). Adicionalmente, ambas as moléculas apresentaram alta absorção gastrointestinal e se mostraram permeáveis à barreira hematoencefálica, além de não representarem substratos para a glicoproteína P. Já no que se refere à metabolização dos compostos sobre as isoformas da enzima P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), observa-se que o composto **LPM-21** inibiu 4 das 5 isoformas, enquanto que **LPM-22** não provocou nenhuma inibição enzimática.

O perfil *drug-likeness* incluiu cinco filtros distintos: Lipinski (Pfizer®), Ghose (Amgen®), Veber (GSK®), Egan (Pharmacia®), e Muegge (Bayer®). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, o composto **LPM-21** revelou resultado satisfatório em quatro dos cinco filtros, tendo sido reprovado apenas pelo filtro de Muegge. Em contrapartida, o composto **LPM-22** foi aprovado nos cinco filtros. No que se refere à eventual detecção de moléculas *PAINS*, nenhum dos compostos aqui estudados apresentou fragmentos potencialmente problemáticos.

Tabela 3: Estudo *in silico* dos parâmetros físico-químicos, estruturais e ADMET dos compostos **LPM-21** e **LPM-22**.

Propriedades	LPM 21	LPM 22
Fração de carbonos sp ³	0,53	0,53
Nº de ligações rotativas	9	10
Nº aceptores de ligação H	1	3
Nº doadores de ligação H	1	3
TPSA (Å ²)	29,10	72,80
Log P	4,38	2,84
Log S	-4,37	-3,42
Classe de solubilidade	Moderada	Solúvel
Absorção gastrointestinal	Alta	Alta
Permeabilidade na barreira hematoencefálica	✓	✓
Substrato P-gp	×	×
Inibidor CYP1A2	✓	×
Inibidor CYP2C19	✓	×
Inibidor CYP2C9	✓	×
Inibidor CYP2D6	✓	×
Inibidor CYP3A4	×	×
Lipinski	✓	✓
Ghose	✓	✓
Veber	✓	✓
Egan	✓	✓
Muegge	×	✓
PAINS	0	0

TPSA: área de superfície polar topológica; P-gp: glicoproteína de permeabilidade; CYP: citocromo P450 (e suas respectivas isoformas); *PAINS*: *pan-assay interference compounds*; ✓: sim; ×: não.

Os resultados do radar de biodisponibilidade de ambos os compostos se encontram disponíveis na **Figura 12**. Os parâmetros físico-

químicos referentes ao composto **LPM-21** se adequam aos limites estabelecidos para fármacos aprovados de administração oral. Já o composto **LPM-22** excedeu os limites de flexibilidade (número de ligações rotativas maior que nove), apesar de se enquadrar nos demais eixos referentes aos critérios físico-químicos.

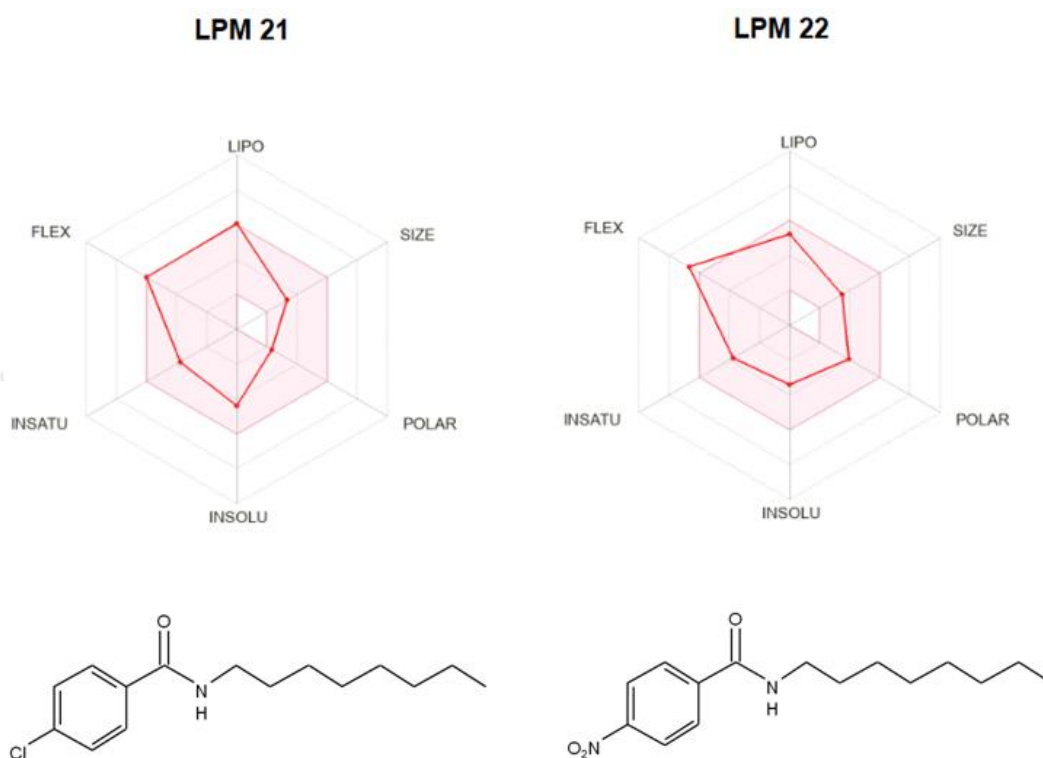


Figura 12: Radares de biodisponibilidade disponibilizados pela ferramenta virtual SwissADME, e sua aplicação sobre os compostos LPM-21 e LPM-22. A área rosa representa os valores *drug-likeness* de cada propriedade: lipofilicidade ($\log P$ entre 0,7 e 5,0), tamanho (MM entre 150 e 500 g/mol), polaridade (TPSA entre 20 e 130 Å²), solubilidade ($\log S < -6$), flexibilidade (número de ligações rotativas < 9) e saturação (fração de carbonos com hibridação sp³ entre 0,25 e 1).

4.3. Determinação do mecanismo de ação em promastigotas

Conforme citado anteriormente, os compostos **LPM-21** e **LPM-22** foram selecionados para os estudos de mecanismo de ação, os quais foram precedidos por um ensaio para a determinação da Concentração Efetiva

50% em tempos curtos de incubação. A observação ao microscópio óptico na maior concentração testada revelou que o composto **LPM-21** induziu a morte dos parasitas no tempo de 4 horas, e o **LPM-22**, em 3 horas. Sendo assim, os resultados obtidos com a sonda MTT demonstraram valores de CE_{50} de 141,5 μ M e 110,1 μ M, respectivamente. Tais resultados foram extrapolados para a realização dos ensaios de mecanismo de ação, a serem apresentados a seguir.

4.3.1. Permeabilidade da membrana plasmática

O marcador fluorescente Sytox® Green foi empregado para a avaliação de permeabilidade da membrana celular de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, uma vez que possui afinidade pelos ácidos nucleicos, de maneira que, por ser impermeável às células íntegras, a magnitude da fluorescência se apresenta diretamente proporcional à sua penetração celular e, conseqüentemente, a eventuais danos na membrana plasmática. O surfactante não-iônico Triton® X-100 (0,5% v/v) foi utilizado para a permeabilização máxima das membranas plasmáticas parasitárias, ou seja, como controle positivo, bem como parasitas não tratados permaneceram como controle negativo, como se observa na **Figura 13**. No que se refere ao composto **LPM-21**, comparativamente ao controle negativo, a permeabilização da membrana plasmática celular passa a ocorrer e se mostrar estatisticamente relevante ($p < 0,001$) a partir de 220 minutos. O Triton®-X 100 apresenta relevância estatística ($p < 0,001$) desde o primeiro dos tempos (20 minutos).

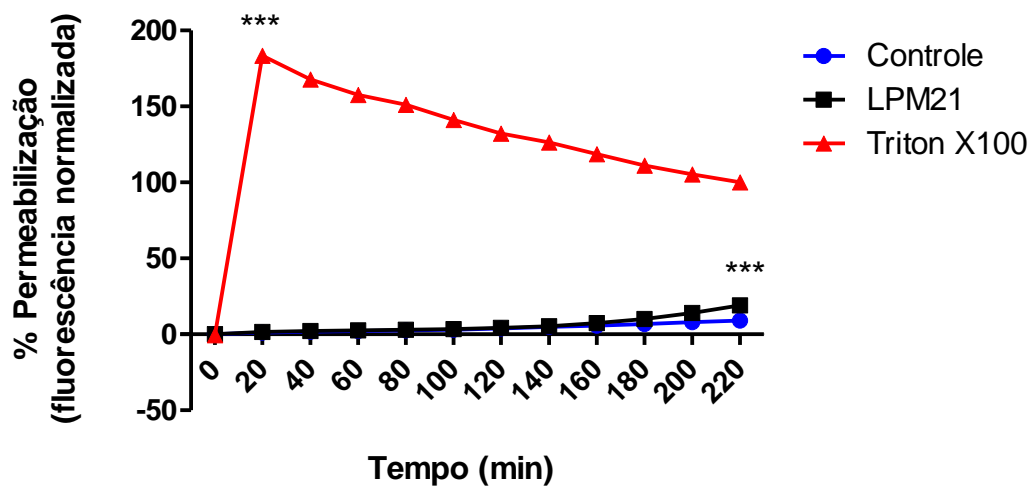


Figura 13: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de *L. (L.) infantum* após 4h de tratamento com **LPM-21** (141,5 µM), com o emprego do marcador fluorescente Sytox Green. Observa-se a permeabilização tendo início a partir de 220 minutos, bem como a permeabilização máxima com Triton®-X 100 (controle positivo) desde 20 minutos, e a ausência de permeabilização nos parasitas não tratados (controle negativo), todos estatisticamente relevantes ($p < 0,0001$).

Em contrapartida, o composto **LPM-22** (110,1 µM) não induziu a permeabilização plasmática mesmo nos maiores tempos de incubação, como demonstrado na **Figura 14**. Adicionalmente, neste ensaio, a exemplo do anterior realizado com o composto anterior, o controle positivo (Triton®-X 100) demonstrou o máximo de permeabilização desde o primeiro dos tempos analisados (20 minutos), comparativamente aos parasitas não tratados ($p < 0,0001$).

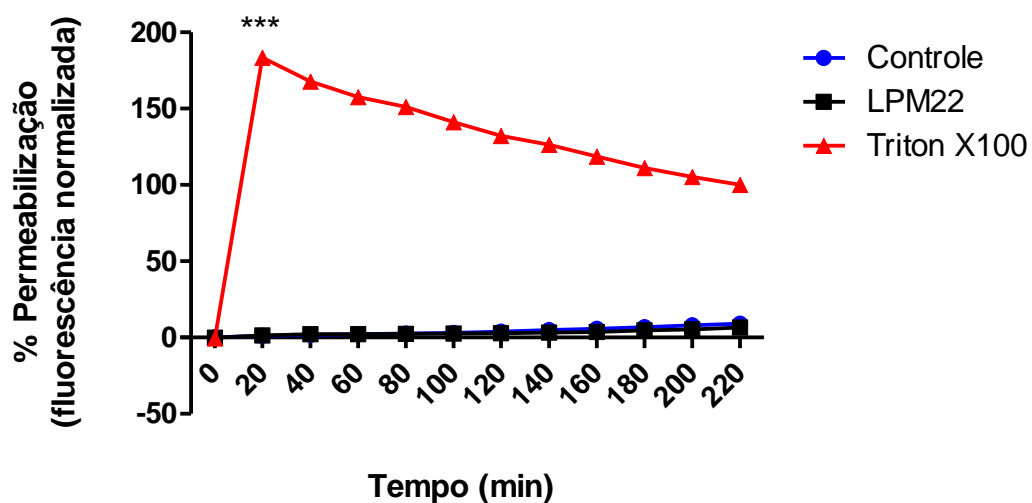


Figura 14: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* após 4h de tratamento com **LPM-22** (110,1 μM), com o emprego do marcador fluorescente Sytox Green. Observa-se a preservação da permeabilidade plasmática dos parasitas após o tratamento com o referido composto, similarmente ao controle negativo, além da permeabilização máxima com Triton® X-100 ($p < 0,0001$).

4.3.2. Estudo dos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS)

O acetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) se apresenta permeável às membranas celulares, fato que permite sua internalização sobre os parasitas aqui estudados. Nesta etapa, o referido marcador ainda não se caracteriza como fluorescente, porém após seus grupos acetatos sofrerem oxidação pelas esterases intracelulares, há a geração de DCF (molécula fluorescente) com contribuição indireta do oxigênio singlete, permitindo, desta maneira, a detecção de radicais livres (a elevação ou diminuição da oxidação de H_2DCFDA atua diretamente no aumento ou diminuição da fluorescência). Este marcador foi empregado sobre promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, com o sal incolor azida sódica (NaN_3), sob concentração final de 10 mM, tendo sido utilizado como controle positivo, no sentido de representar o máximo de produção de ROS, e parasitas não tratados como controle negativo. Como se observa na **Figura 15**, tanto **LPM-21** (a 141,5 μM), quanto **LPM-22** (a 110,1 μM), reduzem de

maneira considerável os níveis de espécies reativas do oxigênio, comparativamente ao controle negativo (parasitas não tratados) até o final deste estudo (240 minutos), com relevância estatística de $< 0,0001$ para ambos. O controle positivo (azida sódica) também apresentou significância estatística na produção máxima de ROS, com $p < 0,0001$ ao final de 4 horas.

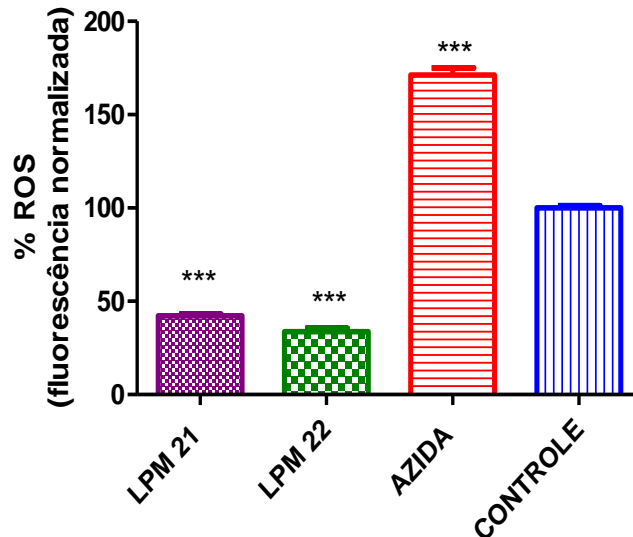


Figura 15: Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* ao final de 240 minutos de tratamento com LPM-21 (141,5 μM) e LPM-22 (110,1 μM), mediante o emprego do marcador acetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), sob excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. Parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo, e azida sódica (NaN_3) como controle positivo. A fluorescência é dada mediante percentual referente aos parasitas não tratados (100%). Significância estatística: *** $p < 0,0001$.

4.3.3. Estudos dos níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+})

Os níveis de cálcio intracelular foram determinados a partir do emprego do marcador Fura-2 AM em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Este marcador é composto por sais de sódio e potássio, bem como ésteres acetoximetil (AM). Os referidos sais se apresentam impermeáveis às células, sendo internalizados apenas por microinjeções ou por meio de

reagentes de influxo específicos. Em contrapartida, os ésteres acetoximetil atravessam passivamente as membranas celulares, sendo posteriormente clivados por esterases e convertidos em Fura-2, uma molécula com grande afinidade pelos íons Ca^{2+} , originando complexos intracelulares fluorescentes. Sendo assim, o aumento na fluorescência ocorre de maneira diretamente proporcional à elevação dos níveis de cálcio intracelular (Johnson e Spence, 2010). A **Figura 16** demonstra os resultados obtidos com o composto **LPM-21**, e a **Figura 17**, com **LPM-22**. Na primeira, observamos importante elevação dos níveis de cálcio intracelulares na presença do composto **LPM-21**. Foi observada uma diferença estatística significativa entre o composto **LPM-21** e o controle negativo (parasitas não tratados), assim como em relação ao controle positivo (Triton X-100) ($p < 0,0001$) em todos os tempos monitorados.

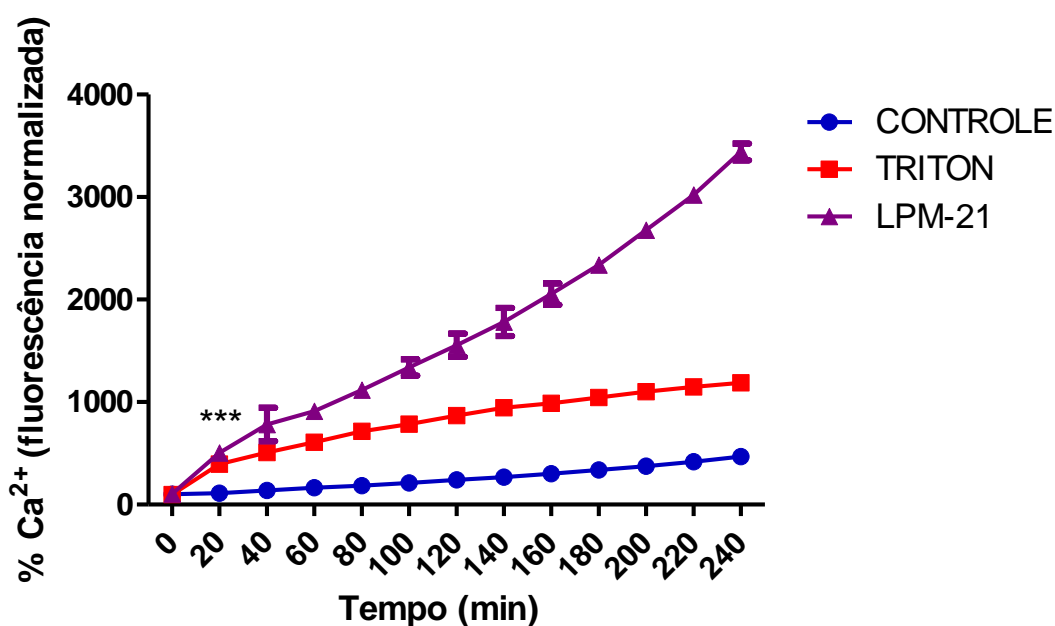


Figura 16: Determinação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* monitorada durante 240 minutos de tratamento com o composto LPM-21 (141,5 μM), mediante o emprego do marcador Fura-2 AM (excitação 485 nm e emissão 535 nm). O surfactante não iônico Triton X-100 (0,5%) foi utilizado como controle positivo, e parasitas não tratados, como controle negativo. O percentual de fluorescência mínimo e máximo são referentes aos parasitas não tratados em 0 minutos (0%) e tratados com Triton X-100 (100%) após normalização, respectivamente. *** $p < 0,0001$.

Semelhantemente, o composto **LPM-22** induziu a elevação dos níveis de cálcio intracelulares, de forma contínua em todos os tempos de análise. A análise comparativa entre **LPM-21** e **LPM-22** demonstrou que o primeiro elevou o cálcio aos níveis observados no controle positivo (Triton X-100) em apenas 20 minutos, sendo que **LPM-22** atingiu estes níveis máximos após 200 minutos de incubação. Foi observada significância estatística em todos os tempos estudados, tanto na análise comparativa entre **LPM-22** e o controle positivo ($p=0,0003$), e o controle negativo ($P<0,05$) (**Figura 15**).

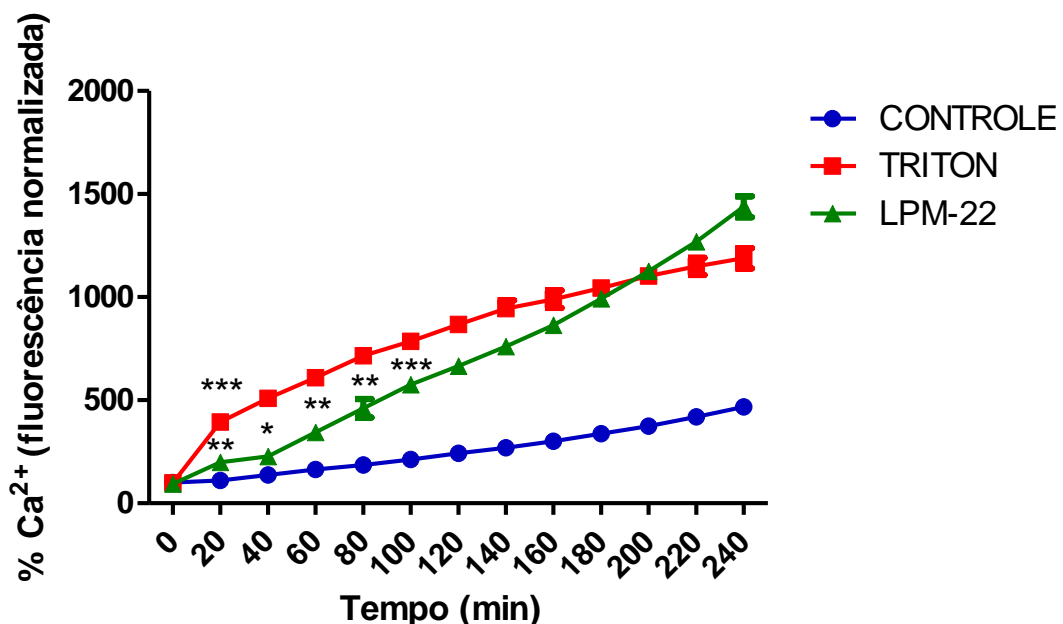


Figura 17: Determinação dos níveis de cálcio intracelular em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* monitorada durante 4 horas de tratamento com o composto LPM-22 (110,1 μM), mediante o emprego do marcador Fura-2 AM (excitação 485 nm e emissão 535 nm). O surfactante não iônico Triton X-100 (0,5%) foi utilizado como controle positivo, e parasitas não tratados, como controle negativo. O percentual de fluorescência mínimo e máximo são referentes aos parasitas não tratados em 0 minutos (0%) e tratados com Triton X-100 (100%) após normalização, respectivamente. *** $p=0,0003$.

4.3.4. Alterações nos acidocalcissomos

O marcador fluorescente laranja de acridina foi empregado neste estudo para a observação de possíveis alterações nos acidocalcissomos de promastigotas de *Leshmania (L.) infantum*, uma vez que possui afinidade por regiões ácidas do ambiente intracelular, como ácidos nucleicos, acidocalcissomos, entre outras. Desta maneira, a alcalinização dos acidocalcissomos resulta na liberação do referido fluoróforo deste compartimento, justificando aumento na fluorescência. A nigericina foi utilizada como controle positivo (níveis máximos de alcalinização), e parasitas não tratados, como controle negativo. Na **Figura 18**, é possível observar, já no primeiro dos tempos monitorados (20 minutos), considerável alcalinização induzida pelo composto **LPM-21** (141,5 μM), com diferença estatística significativa ($p=0,002$) em relação ao controle positivo e negativo. Tal padrão de alcalinização do composto aqui apresentado permanece durante todos os demais tempos monitorados, até o final do ensaio. Já o composto **LPM-22** (110,1 μM) (**Figura 19**) revela um padrão oposto ao **LPM-21**, acidificando progressivamente a organela nos tempos estudados. A partir de 60 minutos é observada diferença estatística em relação ao controle negativo. A alcalinização induzida pelo controle positivo (nigericina) já apresenta significância estatística a partir de 20 minutos ($p=0,002$). A acidificação observada no composto **LPM-22** permanece progressiva durante os demais períodos.

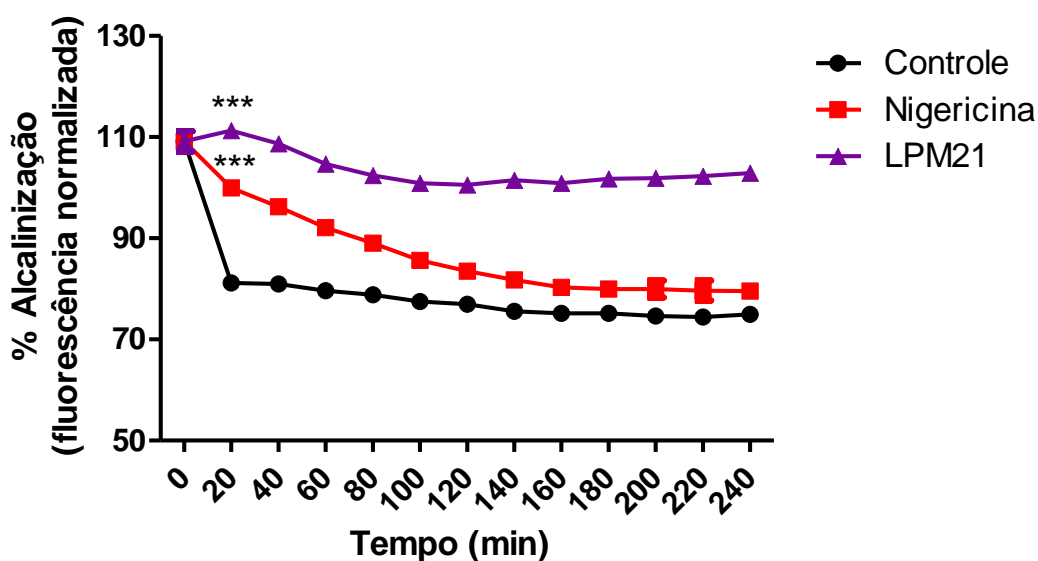


Figura 18: Alteração do pH dos acidocalcissomos em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratados com LPM-21 (141,5 μ M), utilizando a sonda laranja de acridina. Excitação foi realizada à 485 nm e emissão à 535 nm. Parasitas tratados com nigericina foram utilizados como controle positivo (4 μ M), e parasitas não tratados, como controle negativo. *** $p=0,003$ em relação ao controle negativo.

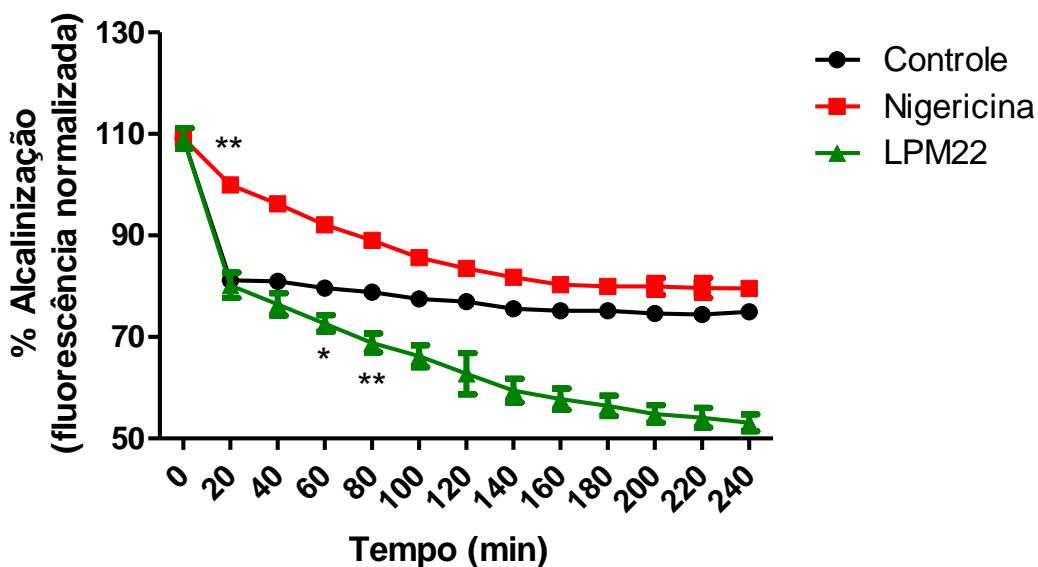


Figura 19: Alteração do pH dos acidocalcissomos em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* tratados com LPM-22 (110,1 μ M), utilizando a sonda laranja de acridina. Excitação foi realizada à 485 nm e emissão à 535 nm. Parasitas tratados com nigericina foram utilizados como controle positivo (4 μ M), e parasitas não tratados, como controle negativo. ** $p=0,0021$ em relação ao controle negativo.

4.3.5. Estudo do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foi observado mediante o emprego do marcador fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-iodeto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) em citometria de fluxo. A despolarização máxima, caracterizada aqui como controle positivo, foi obtida por meio de carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP), e o controle negativo através de parasitas não tratados. Na **Figura 20**, podemos observar, ao final de 4 horas de tratamento com o composto **LPM-21**, a despolarização do potencial da membrana mitocondrial do parasita ($p=0,001$) quando comparado ao controle negativo. Em contrapartida, não se observou a despolarização mitocondrial parasitária no emprego do composto **LPM-22**, com níveis de fluorescência compatíveis com o controle negativo. O CCCP foi utilizado como controle positivo para induzir a despolarização, e parasitas não tratados foram utilizados como controle negativo.

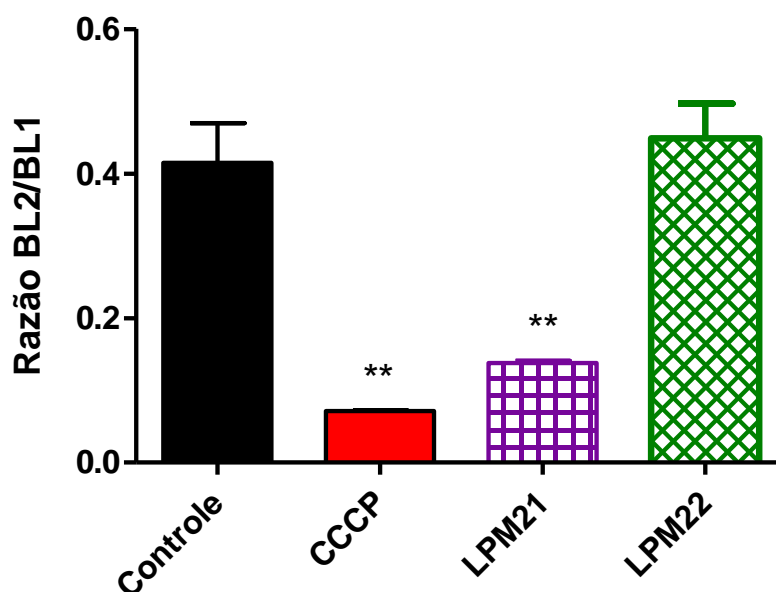


Figura 20: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* após 4 horas de tratamento com os compostos **LPM-21** (141,5 μM) e **LPM-22** (110,1 μM), por meio da sonda JC-1 (excitação 488 nm e emissão 530/574 nm). O controle negativo foi representado pelos parasitas não tratados, e o controle positivo, pelo desacoplador de fosforilação oxidativa CCCP (100 μM). A fluorescência é representada pela razão entre BL-2 (574 nm) e BL-1 (530 nm) ** p=0,0001 em relação ao controle.

4.4. Avaliação do perfil espectral proteico por MALDI-TOF/MS

Seguindo-se a proposta metodológica inicial e tendo em vista a potência dos compostos **LPM-21** e **LPM-22** observada anteriormente, tais moléculas foram incubadas junto à promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* para o estudo do espectro de massas das proteínas parasitárias, sob os valores de CE_{50} obtidos anteriormente. O controle positivo foi dado pela incubação de promastigotas com miltefosina, assim como o controle negativo, por parasitas não tratados. O perfil espectral proteico foi obtido entre 2.000 e 16.000 m/z (relação massa/carga), e os picos de 6153 m/z e 7187 m/z observados em todos os grupos foram utilizados para identificação do subgênero *Leishmania* (**Figura 21**)

Os picos obtidos na faixa entre 2.000 e 13.000 m/z foram utilizados para identificarmos diferenças nos parasitas não tratados, no controle positivo (tratamento com miltefosina) e nos grupos tratados com **LPM-21** e **LPM-22**. De maneira geral, a incubação de promastigotas com **LPM-21** e **LPM-22** ocasionou aumento na intensidade relativa dos picos, quando comparados com o controle negativo, especialmente em 3.081, 5.542 e 11.079 m/z , conforme se observa na **Figura 21**. O aumento da intensidade dos picos observada com o composto **LPM-21** se apresentou mais expressivo entre a faixa de 2000 e 7.200 m/z . Alguns picos se apresentaram consideravelmente maiores nos promastigotas tratados, a exemplo de 3.082, 5.541 e 10.271 m/z quando comparados ao grupo controle. Diferentemente, a incubação com o composto **LPM-22** ocasionou variações de intensidade menos expressivas do que com **LPM-21**, com ligeiro aumento na faixa entre 2000 e 4000 m/z . Alguns picos também se apresentaram consideravelmente maiores nos promastigotas incubados com **LPM-22**, a exemplo de 3.082, 5.116, 5.542, 5.657 e 6.481 m/z , em relação ao grupo controle. Em geral, o fármaco padrão miltefosina resultou em diminuição do perfil espectral das proteínas dos promastigotas tratados, porém em uma faixa muito mais ampla, entre 2000 e 13.000 m/z . A **Figura 22** representa uma análise comparativa entre os espectros brutos com picos mais significativos, com relação sinal/ruído menor que 3, bem como o gel virtual disponibilizado pelo programa Biotyper 3.1, para cada grupo. Aqui se torna possível observar as diferenças no perfil de proteínas de promastigotas não tratadas e incubadas com **LPM-21**, **LPM-22** e miltefosina.

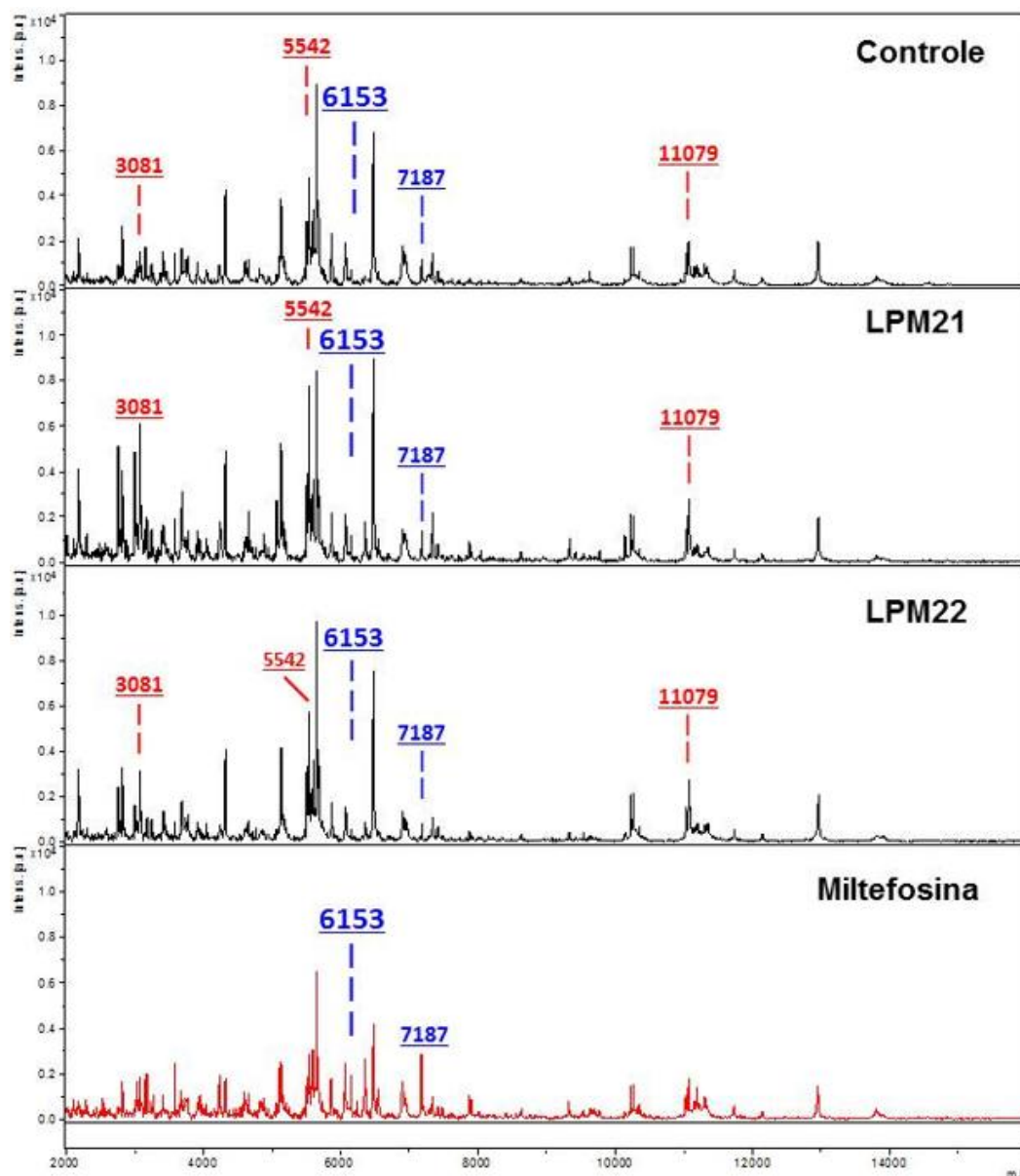


Figura 21: Espectros de massas de promastigotas de *Leishmania*. (*L.*) *infantum* obtidos por MALDI-TOF/MS. O grupo controle representa os parasitas não tratados, e os demais, promastigotas submetidas à incubação com **LPM 21**, **LPM 22** e miltefosina. As intensidades relativas dos íons se encontram no eixo Y, e o eixo X representa a relação massa/carga (m/z) entre 2.000 e 16.000. Os picos obtidos em 6.153 e 7.187 m/z (azul) permitem a identificação do subgênero *Leishmania*. O aumento na intensidade dos picos observado na incubação de promastigotas com **LPM-21** e **LPM-22** pode ser observado em 3.081, 5.542 e 11.079 m/z (vermelho).

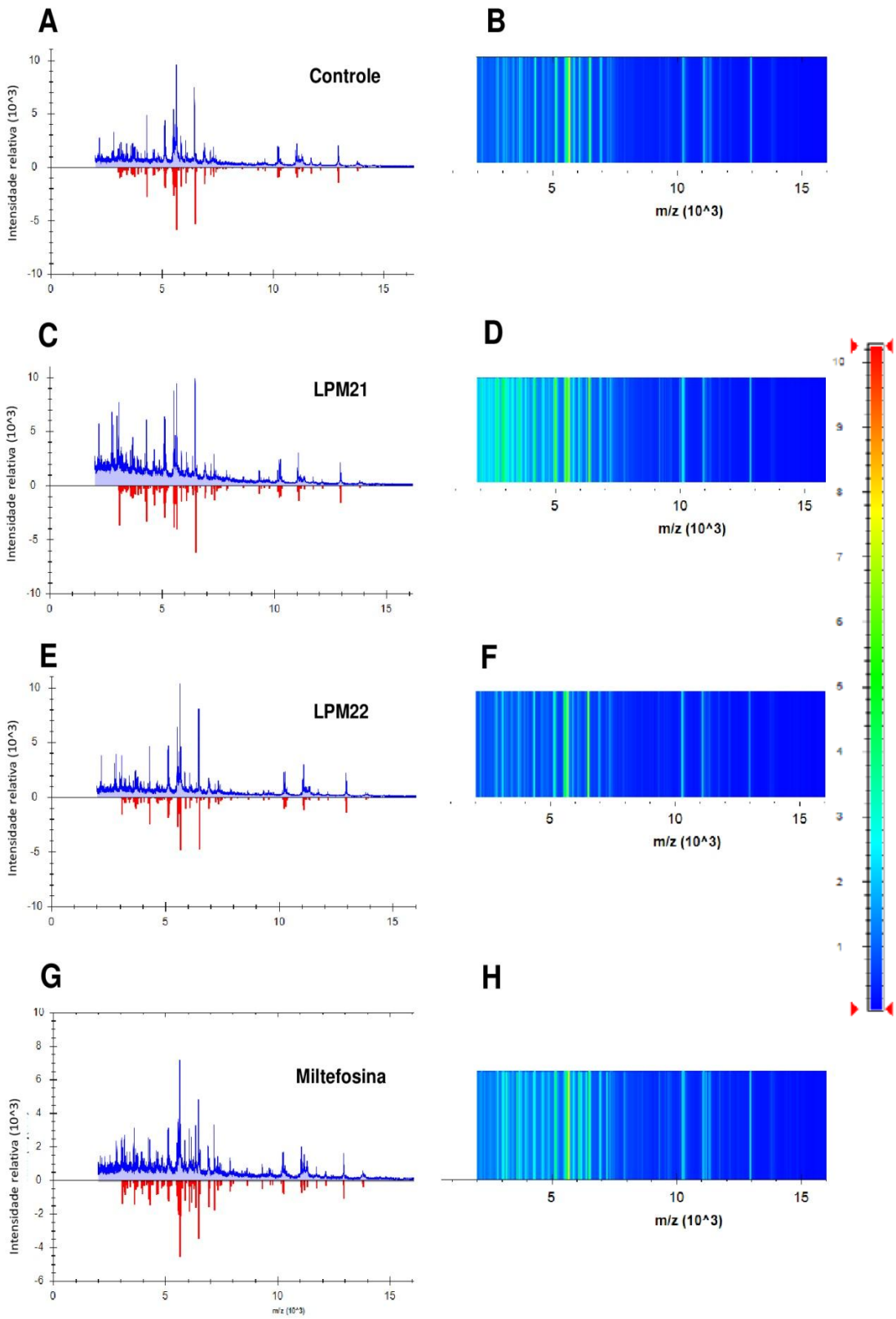


Figura 22: Espectros de massas de promastigotas de *Leishmania. (L.) infantum*. **(A, C, E, G)** Os espectros brutos se encontram representados em azul, e os espectros gerados após normalização, suavização e subtração da linha de base se encontram em vermelho. **(B, D, F, H)** Representação do gel virtual dos espectros brutos. As intensidades relativas dos íons se encontram no eixo Y, e o eixo X representa a relação massa/carga (m/z) entre 2.000 e 16.000. As figuras A e B se referem à promastigotas não tratadas, C e D à promastigotas incubadas com LPM21, E e F à promastigotas incubadas com LPM22, e G e H à promastigotas incubadas com miltefosina.

5. Discussão

Fatores como a toxicidade e a eficácia limitada dos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da LV, associados às diversas publicações científicas demonstrando a ineficácia da eutanásia dos reservatórios, agravam o problema de saúde pública relacionado à leishmaniose. Além disso, a exclusividade dos fármacos humanos e sua impossibilidade de emprego na doença canina acabam por limitar o tratamento nesta espécie apenas à miltefosina, fato que contribui para o surgimento de cepas de *Leishmania* spp. resistentes a este quimioterápico. Logo, a busca por novos compostos com atividade anti-*Leishmania* se mostra urgente, especialmente no que se refere ao tratamento dos reservatórios caninos, com o intuito de se disponibilizar novos fármacos e, conseqüentemente, diminuir a incidência desta enfermidade em seres humanos.

Nosso grupo vem explorando de forma promissora muitos compostos naturais como protótipos farmacêuticos. Dentre eles, o gibilimbol, isolado inicialmente da planta *Piper malacophyllum*, demonstrou atividade contra formas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, com valor de CE_{50} de 95 μ M. No entanto, este composto apresentou citotoxicidade contra células de mamífero, com um valor de CC_{50} de 254 μ M, fato que resultou em um baixo IS (2,6). Varela e colaboradores (2016), por sua vez, observaram com a primeira série de análogos do gibilimbol, oito dos compostos tendo

demonstrado potente atividade contra *Leishmania (L.) infantum*, sendo um deles bastante potente *in vitro*, revelando CE₅₀ de 1,8 µM, e IS de 13. Tais resultados demonstraram que o gibilimbol poderia ser otimizado por meio de síntese orgânica.

Considerando estes ensaios preliminares, observou-se que a citotoxicidade do grupo fenólico, presente nos análogos anteriores, ainda se caracterizava como um fator a ser melhorado. Além disso, a busca pelo grupo de átomos responsável pela atividade antiparasitária do composto, denominado grupo farmacofórico, seria de extrema importância. Sendo assim, Varela e colaboradores (2017) estudaram outro análogo do gibilimbol, o 5-[(3-*E*)-oct-3-en-1-il]-1,3-benzodioxol, e a partir deste novo protótipo, cinco derivados com substituições na posição 4 do anel aromático foram desenvolvidos. Com isto, observou-se que o derivado quatro, apesar de ter apresentado menor potência (CE₅₀ de 16,7 µM) nas formas amastigotas, reduziu em 3,2 vezes a citotoxicidade para as células de mamífero, tendo revelado CC₅₀ de 73,5 µM, e IS de 4,4 sobre as formas amastigotas. Logo, a hipótese de elevação da citotoxicidade sobre células de mamífero, gerada pela presença da hidroxila fenólica, foi reforçada nesta publicação e justificou a síntese dos 25 compostos testados no presente estudo, sem o referido grupo molecular. Aqui, vale ressaltar, que a presença do grupo fenólico na estrutura molecular do composto, além de elevar a citotoxicidade, pode eventualmente incluí-lo na classificação de *PAINS*, moléculas consideradas de interferência, apresentando fluorescência, degradação em meio líquido, e podendo se ligar indiscriminadamente a quaisquer proteínas, sendo indesejáveis em projetos de *Drug Discovery* (Baell e Walters, 2014). Adicionalmente, segundo observações de Varela e colaboradores (2017), com relação aos compostos empregados em seu estudo, é possível hipotetizar que a hidroxila não se apresenta como essencial para a manutenção da atividade antiparasitária, apesar de sua inegável contribuição no aumento da potência.

Em nosso trabalho, dentre os 25 compostos sintéticos avaliados, quatro (16%), apresentaram atividade contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Nesta série sintética, observamos que todos estes compostos ativos nos amastigotas não apresentaram citotoxicidade nas células de mamífero, com manutenção da atividade antiparasitária.

Segundo os critérios do “*Drugs for Neglected Diseases initiative*” (DNDi), preconiza-se que novos compostos candidatos (*hit compounds*) anti-*Leishmania* tenham valores de CE₅₀ menores que 10 µM nos amastigotas intracelulares, e índice de seletividade >10. Em nosso estudo, levando-se em conta o desvio padrão, os compostos ativos atenderam aos critérios propostos pelo DNDi. Observamos, adicionalmente, que o composto **LPM-24** apresentou potência similar ao fármaco padrão miltefosina, porém com um I.S. bastante superior.

Ainda segundo o DNDi, após os primeiros estudos para a caracterização do perfil biológico do composto testado (potência e seletividade), a próxima etapa trata da avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas da molécula, assim como da avaliação do perfil farmacocinético e farmacodinâmico (ADME) (Don e Loset, 2014). De acordo com Balaña-Fouce e colaboradores (2019), esta avaliação *in silico* complementa a decisão de escolha dos compostos que devem seguir para a fase de otimização (*lead optimization*). Considerando a necessidade de se avaliar os possíveis mecanismos de ação, dois compostos foram selecionados em nosso trabalho (**LMP-21** e **LPM-22**), escolha esta realizada em função de sua potência, seletividade, e ainda por apresentarem atividade contra as formas promastigotas, as quais são utilizadas para os estudos de mecanismo, por se apresentarem extracelulares.

A predição *in silico* realizada por meio da plataforma SwissADME, com relação às características físico-químicas, revelou que ambos os compostos apresentam um perfil de lipofilicidade, sendo o **LPM 21** mais lipofílico. Tais valores estão de acordo com o perfil descrito na literatura (< que 5) para candidatos a fármacos que tenham a via oral como via

preferencial de administração. Compostos que apresentem valores de log P elevados (>5) podem ter sua biodisponibilidade comprometida pela baixa solubilidade em água, além poderem se acumular em tecidos adiposos, fato este que poderia resultar em elevação da toxicidade (Hansch et al, 1987). No que se refere à solubilidade em água (Log S), os resultados também se apresentaram dentro dos limites estabelecidos na literatura, ou seja, entre -1 e -5 (Hansch et al, 1987). Ambas as análises sugeriram que os dois compostos devem apresentar alta absorção gastrointestinal, possibilitando uma futura inclusão em formas farmacêuticas para administração oral.

O coeficiente de partição sugerido pela plataforma ADME, ao predizer a lipofilicidade dos compostos, os classificou como permeáveis à barreira hematoencefálica. Tal característica pode se refletir em toxicidade ao sistema nervoso central, porém futuros estudos in vivo devem ser realizados para confirmar esta hipótese. Apesar de não ser amplamente reportada a presença do parasita no SNC, Zobba e colaboradores (2017), demonstraram positividade no PCR do LCR de um cão infectado com *Leishmania* spp. Neste caso, a penetração de um fármaco na barreira hematoencefálica poderia representar uma vantagem. Ainda neste contexto, Melo e colaboradores (2015) descreveram o comprometimento da barreira hematoencefálica e subsequente neuroinflamação em cães com LV naturalmente infectados. Apesar de não avaliado neste estudo, caso os compostos **LPM 21** e/ou **LPM-22** induzam imunorregulação, modulando eventual resposta inflamatória exacerbada, esta característica de permeação hematoencefálica poderia também ser vantajosa.

A glicoproteína-P, do ponto de vista fisiológico, se encontra na membrana citoplasmática celular e pertence à família de transportadores ABC, tendo como principal função a expulsão de toxinas e xenobióticos ao ambiente extracelular (principalmente células epiteliais) (Sharom, 2011). Esta glicoproteína encontra-se em maior abundância nas células do cólon, intestino delgado, hepatócitos, ductos pancreáticos, ductos biliares, túbulos contorcidos proximais (renais) e glândulas adrenais (Amin, 2013). Os

compostos **LPM-21** e **LPM-22** não se apresentam como potenciais substratos para a glicoproteína P, portanto, possuem potencial para maior biodistribuição *in vivo*.

Os dados em relação à metabolização dos compostos **LPM-21** e **LPM-22** pela superfamília enzimática citocromo P450 (CYP) sugeriram que o **LPM-21** tenha a capacidade de inibir quatro das cinco principais isoformas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4). A inibição enzimática representa característica importante para candidatos a fármacos, à medida que o fármaco e metabólitos secundários se acumulam nos tecidos, desta maneira favorecendo, inclusive, efeitos adversos indesejáveis (Huang et al, 2008). Considerando-se que aproximadamente 90% dos fármacos aprovados para uso humano são substratos destas cinco isoformas enzimáticas (Di 2014), tal característica promíscua do **LPM-21** poderia dificultar sua associação terapêutica a outros fármacos anti-*Leishmania*.

A avaliação “*drug likeness*”, que caracteriza moléculas com potencial para futuros fármacos orais (especialmente biodisponibilidade), também foi realizada pela plataforma SwissADME, por meio de cinco filtros desenvolvidos por grandes indústrias farmacêuticas, visando refinar a qualidade da triagem de novas moléculas (Daiana et al, 2017). O composto o **LPM-21** foi reprovado apenas pelo filtro de Muegge, enquanto que o **LPM-22** foi aprovado em todos os filtros (Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge). Complementarmente, ambos os compostos não revelaram características compatíveis com *PAINS* (*pan assay interference compounds*), visto que o grupamento fenólico se encontra ausente em suas estruturas químicas. A predição de moléculas como futuros candidatos a fármacos, pelo delineamento do perfil “*drug likeness*”, vem sendo amplamente empregada na triagem de moléculas em larga escala nas últimas décadas, a fim de excluir compostos com propriedades físicoquímicas e farmacocinéticas indesejáveis. Os cinco filtros utilizados nesta predição incluem diferentes regras, e suas estimativas, quando associadas, aumentam a confiabilidade na seleção de candidatos a fármacos (Daiana et al, 2017).

O radar de biodisponibilidade, por sua vez, também foi utilizado através do servidor SwissADME, no qual características físico-químicas como peso e refratividade molecular, área de superfície polar e contagem de tipos específicos de átomos são avaliados, com o intuito de prever precocemente alguns parâmetros ADME, principalmente relacionados à capacidade de atravessar barreiras biológicas, a exemplo da barreira hematoencefálica. Esta ferramenta virtual se caracteriza por uma avaliação mutiparamétrica que se relaciona com seis propriedades essenciais no desenvolvimento de novos compostos: polaridade (área de superfície polar topológica entre 20 e 130 Å²), solubilidade (logS < - 6), saturação (fração de carbonos com hibridação sp³ entre 0,25 e 1), flexibilidade (número de ligações rotativas menor que 9), tamanho (massa molecular entre 150 e 500 Da) e lipofilicidade (logP entre 0,7 e 5,0). O composto **LPM-22** extrapolou o limite de flexibilidade, fato que sugere um possível comprometimento de sua biodisponibilidade, caso seja administrado pela via oral. Diferentemente, o **LPM-21** apresentou adequado enquadramento no radar virtual, podendo ser considerado um *hit compound*.

Assim como já registrado por Fumarola e colaboradores (2004), os estudos *in vitro* para avaliação da atividade anti-*Leishmania* e da toxicidade de novos compostos se apresenta essencial, fato que inclui a determinação de seu mecanismo de ação. Logo, na presente pesquisa foram realizados ensaios de mecanismo de ação com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, utilizando-se os compostos **LPM-21** e **LPM-22**.

Alterações na membrana plasmática de *Leishmania* podem caracterizar situações letais, uma vez que permitem a formação de poros, falhas no controle do pH, e déficit no transporte iônico de metabólitos e nutrientes, além da possibilidade de eventual extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüente morte celular. Logo, a membrana plasmática se caracteriza como essencial para a manutenção da homeostase celular. Em nosso estudo, demonstramos que o mecanismo de ação dos compostos **LPM-21** e **LPM-22** em *Leishmania (L.) infantum* não se relaciona com a

permeabilização da membrana plasmática. Em tempos tardios de incubação (220 minutos), verificamos que o composto **LPM-21** apresentou uma tendência de elevar a permeabilização da membrana plasmática do parasita, fato este que pode estar relacionado a danos intracitoplasmáticos prejudiciais à homeostasia. Figarella e colaboradores (2015) demonstraram que compostos que induzem o aumento de *ROS* resultam em efeitos tóxicos para as proteínas e lipídios celulares, alterando tardiamente a membrana celular de *Leishmania* spp. Considerando as similaridades entre a membrana plasmática de *Leishmania* e das células de mamífero, compostos que alterem a permeabilidade no parasita podem ser simultaneamente tóxicos, resultando em baixa seletividade antiparasitária, fato este observado nos estudos iniciais com o gibilimbol (De Oliveira et al, 2012).

As espécies reativas do oxigênio (*ROS*) desempenham papel fundamental em diversos eventos fisiológicos, participando, inclusive, de processos metabólicos relacionados aos mecanismos de morte celular, fato este observado similarmente nos tripanossomatídeos (Ribeiro et al, 2013). Além disso, é conhecido que a mitocôndria representa o principal sítio de produção de *ROS* nas células por meio da fosforilação oxidativa (Jastroch et al, 2010). Em nosso estudo, observamos redução dos níveis de *ROS* nos parasitas após a incubação com **LPM-21** e **LPM-22**, sugerindo possíveis alterações na cadeia respiratória. Sendo assim, iniciamos um estudo das mitocôndrias.

A mitocôndria se apresenta fundamental na manutenção da homeostasia celular, desempenhando diversas funções primordiais e, atualmente, sendo considerada alvo para os candidatos a novos fármacos com atividade anti-*Leishmania*. Tais organelas são constituídas por duas membranas, uma externa e outra interna, as quais permanecem interligadas no espaço intermembranas e na matriz mitocondrial (Boguszewska et al, 2020). Dentre suas funções mais importantes, destacam-se a síntese de ATP, indução de apoptose, proliferação celular, termogênese, biossíntese e reciclagem de diversos compostos (como aminoácidos, ácidos graxos,

esteroides e nucleotídeos), e participação no metabolismo do cálcio, uma vez que, junto ao retículo endoplasmático e à membrana plasmática, regula os níveis de Ca^{2+} intracelulares (Devine e Kittler, 2018).

No que se refere à *Leishmania*, apenas uma mitocôndria é encontrada, ocupando aproximadamente 12% das dimensões do parasita (Benaim e Garcia, 2018). O transporte de prótons para o espaço intermembranas ocasiona um gradiente elétrico (a matriz mitocondrial se encontra mais negativa do que o espaço intermembranas), e químico (a matriz mitocondrial se encontra mais alcalina comparativamente ao espaço intermembranas), sendo que a soma destes dois fatores caracteriza o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Zorova et al, 2018). Prolongadas alterações (hiperpolarização / despolarização) no $\Delta\psi_m$ podem, semelhantemente, resultar em danos celulares irreversíveis (Perry et al, 2011).

Neste estudo empregamos a sonda JC-1, a qual, em baixas concentrações, se mantém em sua forma monomérica (fluorescência verde / BL-1), enquanto que, em altas concentrações, dá origem aos J-agregados (fluorescência vermelha / BL-2). Logo, com a despolarização da membrana mitocondrial, há menor penetração do marcador fluorescente na mitocôndria e, subsequentemente, menor concentração de J-agregados e acúmulo de monômeros. A razão entre BL-2 (J-agregados) e BL-1 (monômeros) acaba por prever a despolarização (diminuição na razão) ou hiperpolarização (aumento na razão) da membrana mitocondrial. O composto **LPM-21** induziu considerável despolarização da membrana mitocondrial, diferentemente do composto **LPM-22**, o qual demonstrou uma tendência biológica de hiperpolarização, apesar deste dado não ter apresentado diferença estatística em relação ao grupo controle. Logo, ambas as alterações devem ter contribuído para falhas no funcionamento desta organela no parasita, justificando a redução dos níveis de ROS observados.

A busca por novos alvos terapêuticos anti-*Leishmania*, assim como a descoberta de novos compostos, inclui moléculas que atuem sobre a

homeostase do Ca^{2+} intracelular nestes parasitas, uma vez que muitos fármacos, sabidamente, induzem alterações nos mecanismos de transporte relacionados à regulação deste íon nos tripanossomatídeos (Benaim et al, 2014). Nestes parasitas, a regulação do Ca^{2+} envolve algumas organelas distintas: o retículo endoplasmático, a mitocôndria (especialmente por meio do transporte de Ca^{2+} para o interior desta organela através do $\Delta\psi_m$ criado pela translocação de íons hidrogênio pela cadeia de citocromos), e os acidocalcissomos, compartimentos intracelulares ácidos capazes de acumular grandes quantidades do referido íon (Benaim et al, 2020; García-García et al, 2016).

Em nosso trabalho, ambos os compostos induziram a elevação na concentração de Ca^{2+} em *Leishmania (L.) infantum*, porém sob intensidades e tempos distintos. A elevação do Ca^{2+} , induzida por **LPM-21**, ocorreu de maneira mais intensa e rápida, comparativamente ao **LPM-22**. Logo, torna-se possível aventar que a elevação do Ca^{2+} intracelular resultou em alterações no funcionamento mitocondrial, uma vez que a manutenção da homeostase do cálcio se mostra essencial para a preservação do desempenho desta organela (Corral et al, 2016). Em contrapartida, alterações importantes no potencial de membrana mitocondrial, eventualmente induzidas pelos compostos **LPM-21** e **LPM-22**, podem ter contribuído para o acúmulo intracelular de Ca^{2+} .

Os mecanismos de transporte deste íon no tripanossomatídeos e nas células eucariotas se relacionam, principalmente, com o uniportador de cálcio mitocondrial (MCU), com o canal aniônico voltagem-dependente (VDAC1), e com o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CHX), sendo que o VDAC1, presente na membrana mitocondrial externa, favorece o influxo de Ca^{2+} ao espaço intermembranas mitocondrial, e o MCU (localizado na membrana mitocondrial interna), por sua vez, permite o transporte deste íon ao ambiente intramitocondrial (Scarpelli et al, 2021). Este transporte de íon cálcio ao interior da mitocôndria depende diretamente da preservação do potencial de membrana mitocondrial, portanto, moléculas que atuam sobre tal potencial de membrana (resultando em despolarização ou

hiperpolarização), podem ocasionar o extravasamento do Ca^{2+} da mitocôndria para o citoplasma (Velásquez et al, 2022). Ainda, em *Leishmania* spp., a elevação do cálcio intracelular pode desencadear eventos que resultem na morte do parasita por *apoptose-like* (Naderer et al, 2011).

Os acidocalcissomos caracterizam-se por organelas com diversas funções, presentes em uma grande variedade de organismos (desde bactérias a seres humanos), e as bombas de prótons e cálcio encontradas em sua estrutura justificam a característica ácida e a grande concentração de Ca^{2+} . Nos protistas, são ricos em ortofosfato e grânulos de polifosfato associados a cátions (sódio, potássio, magnésio, cálcio, zinco e ferro), além de determinados aminoácidos (Docampo et al, 2005). Nos tripanossomatídeos, apresentam-se ricos em polifosfatos de cadeia curta, descritos como poly P3, poly P4 e poly P5, sendo que tais organelas ocupam 1 a 2% do volume celular total (Do Campo e Moreno, 2011). A importância dos acidocalcissomos nos tripanossomatídeos se destaca pela captação e armazenamento de cálcio em grandes concentrações, essencial para o seu funcionamento, fato que se justifica nas evidências científicas obtidas por Luo e colaboradores (2004), os quais observaram que a queda dos níveis da enzima Ca^{2+} -ATPase nesta organela se relacionou diretamente com a redução do cálcio mobilizável destes estoques. Logo, sequencialmente aos ensaios anteriores, a avaliação de possíveis alterações nos acidocalcissomos foi realizada para complementar nossos estudos, especialmente no que se refere ao Ca^{2+} intracelular. Os resultados revelaram importante alcalinização desta organela no tratamento com o composto **LPM-21**, alteração esta que permaneceu até o final do ensaio. Em contrapartida, o tratamento com o composto **LPM-22** ocasionou acidificação progressiva dos acidocalcissomos. Portanto, é possível inferir que a alcalinização desta organela, induzida pelo tratamento com o composto **LPM-21**, justificou a elevação do Ca^{2+} observada no ensaio anterior, especialmente pelo extravasamento deste íon ao citoplasma. Já a elevação do Ca^{2+} intracelular observada no tratamento com o composto **LPM-22**, por

ter ocorrido de maneira mais lenta, menos intensa e sem a alcalinização concomitante dos acidocalcissomos, de fato pode ter sido resultado de déficits no funcionamento mitocondrial, vindo de encontro aos baixos níveis de ROS.

Tradicionalmente, a espectrometria de massas por meio da técnica MALDI-TOF vem sendo amplamente empregada como valiosa ferramenta na identificação de microorganismos, especialmente bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Neste contexto, o espectro proteico característico de um agente, também descrito em literatura como a “perfil espectral”, é comparado a uma base de dados com espectros de referência, permitindo a identificação de maneira rápida, prática e utilizando-se diversos tipos de amostras biológicas (Marinach-Patrice et al, 2009). Em 2014, Mouri e colaboradores demonstraram a possibilidade de identificação de protozoários do gênero *Leishmania* por meio de MALDI-TOF/MS, incluindo o nível de espécie. Tais autores observaram que os picos em 6.153 m/z (+/- 3) e 7187 m/z (+/- 5) foram encontrados em todas as amostras nas quais o subgênero *Leishmania* foi isolado, fato corroborado neste trabalho, no qual tais picos estiveram presentes em todos os grupos estudados.

A impressão digital peptídica obtida entre 2.000 e 20.000 m/z se relaciona, principalmente, com proteínas ribossomais e estruturais de *Leishmania (L.) infantum*. Neste trabalho, observamos que ambos os compostos estudados (**LPM-21** e **LPM-22**) ocasionaram aumento na intensidade dos picos quando comparados com o grupo controle. Este fato, associado aos resultados dos ensaios de mecanismo de ação anteriormente debatidos, reforça a tese de que tais compostos atuam a nível proteico, diretamente ou indiretamente, ocasionando alterações no metabolismo de proteínas. Já a elevação de alguns picos encontrados nas promastigotas incubadas com os compostos (3.082, 5.541 e 10.271 m/z com **LPM-21**, e 3.082, 5.116, 5.542, 5.657 e 6.481 m/z com **LPM-22**) e miltefosina, comparativamente àqueles obtidos nos promastigotas não tratados, sugerem mecanismos de ação distintos. As variações no perfil espectral dos parasitas incubados com os compostos **LPM-21** e **LPM-22**, bem como os resultados

dos estudos de mecanismo de ação, demonstram claramente diferentes ações destas moléculas a nível celular. Além disso, as diferenças no perfil espectral dos parasitas incubados com os compostos (com ênfase no **LPM-21**) e com o fármaco padrão miltefosina, sugerem também mecanismos distintos. Tais dados nos permitem sugerir que o composto **LPM-21** seja explorado no futuro como candidato a fármaco, até mesmo sendo empregado em estudos de associação terapêutica com a miltefosina. Em suma, tais resultados ilustram a importância do emprego da espectrometria de massas por meio da técnica MALDI-TOF no conhecimento da suscetibilidade *in vitro* de *Leishmania* a compostos e fármacos, especialmente no contexto da resistência parasitária observada atualmente.

Com base na compilação dos resultados de mecanismo de ação acima descritos, torna-se possível hipotetizar os possíveis alvos parasitários relacionados aos compostos **LPM-21** e **LPM-22**. A alcalinização dos acidocalcissomos observada na incubação de *Leishmania infantum* com **LPM-21** sugere esta organela como primeiro sítio de atuação deste composto, justificando o extravasamento de cálcio ao ambiente intracelular. A consequência desta elevação intracelular de cálcio se caracterizou pelo dano (secundário) à mitocôndria parasitária, fato observado por meio da despolarização da membrana mitocondrial e queda nos níveis de espécies reativas do oxigênio. Em contrapartida, a proposta de atuação do composto **LPM-22**, a nível parasitário, se relaciona primariamente com o dano mitocondrial, uma vez que a elevação do cálcio intracelular ocorreu de maneira mais lenta, progressiva, e com a concomitante acidificação dos acidocalcissomos (fato que não justificaria o extravasamento de cálcio desta organela). Logo, o referido dano à mitocôndria explicaria, por sua vez, o extravasamento de cálcio desta organela, a tendência à hiperpolarização da membrana mitocondrial, e finalmente, a queda nos níveis de espécies reativas do oxigênio.

6. Conclusões

1. Dentre os 25 compostos testados, quatro (**LPM-12**, **LPM-21**, **LPM-22** e **LPM-24**) apresentaram atividade sobre as formas amastigotas intracelulares *Leishmania (L.) infantum* e não foram significativamente citotóxicos.
2. Dentre os quatro compostos ativos sobre as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, o **LPM-21** e o **LPM-22** foram selecionados para as análises ADME, perfil *drug-likeness* e ensaios de mecanismo de ação.
- 3- O estudo *in silico* demonstrou que os compostos **LPM-21** e **LPM-22** apresentam alta absorção gastrointestinal, permeabilidade à barreira hematoencefálica, solubilidade moderada e alta (respectivamente), e perfil *drug-likeness* favorável para futuras otimizações moleculares. Além disso, ambos não representam substratos à glicoproteína P e não configuram *PAINS*, apesar do composto **LPM-22** ter extrapolado os limites de flexibilidade no radar de biodisponibilidade.
- 4- Os ensaios de mecanismo de ação realizados em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* revelaram que o composto **LPM-21** ocasionou a despolarização da membrana mitocondrial, redução nos níveis de ROS, alcalinização dos acidocalcissomos e importante elevação do Ca^{2+} intracelular. Logo, o mecanismo de ação proposto para este composto possivelmente se relaciona com a alcalinização dos acidocalcissomos, seguida de elevação do Ca^{2+} intracelular (liberado desta organela) e subsequente despolarização da membrana mitocondrial. O envolvimento mitocondrial pode ter resultado na queda dos níveis de ROS, e a compilação destas alterações homeostáticas, por fim, ocasionou, de maneira tardia, a permeabilização da membrana plasmática.

- 5- O mecanismo de ação proposto para o composto **LPM-22** sobre promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* se assemelha parcialmente àquele hipotetizado para o **LPM-21**, uma vez que a elevação do Ca^{2+} intracelular ocorreu de maneira mais lenta, menos intensa e com a acidificação dos acidocalcissomos, fato que não justificaria o extravasamento de cálcio desta organela. Portanto, a elevação no cálcio intracelular pode ter ocorrido secundariamente à hiperpolarização da membrana mitocondrial, já que se observou concomitante queda nos níveis de ROS, fato eventualmente relacionado a danos na mitocôndria parasitária.
- 6- A espectrometria de massas, realizada sob a técnica MALDI-TOF, revelou alterações importantes no perfil espectral de promastigotas incubados com **LPM-21** e **LPM-22**. Além disso, as diferenças observadas entre os compostos corroboram os resultados dos estudos de mecanismo de ação, sugerindo diferentes ações a nível celular parasitário.
- 7- Em suma, os resultados concretizam o potencial anti-*Leishmania* dos derivados sintéticos do gibilimbol, em especial os compostos **LPM-21** e **LPM-22**, os colocando como futuros candidatos para estudos de efetividade *in vivo*.

7. Referências bibliográficas

Alexandre-Pires G, Brito MT, Alguero C, Martins C, Rodrigues OR, Fonseca IP et al. Canine leishmaniasis. immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010; 137: 275-283.

Almeida BF, Narciso LG, Bosco AM, Pereira PP, Braga ET, Avanco SV et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2013; 196: 6-12.

Amato VS, Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Tropica* 2003; 85(1): 39-49.

Amin L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Targets Insights* 2013; 7: 27-34.

Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2018; 64(3): 281-289.

Baell J, Walters MA. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* 2014; 513(7519): 481-483.

Balaña-Fouce R, Pertejo MYP, Domínguez-Asenjo B, Gutiérrez-Corbo C, Reguera RM. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 2019; 24(5): 1209-1216.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 2007; 37(10): 1097-1106.

Batista JM, Batista ANL, Rinaldo D, Vilegas W, Ambrosio DL, Cicarelli RMB et al. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. *Journal of Natural Products* 2011; 74: 1154–1160.

Benaim G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Parra-Gimenez S, Plaza-Rojas N et al. Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58(4): 2295-2303.

Benaim G, Garcia CRS. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Tropical Biomedicine* 2011; 28(3): 471–481.

Benaim G, Paniz-Mondolfi AE, Sordillo EM, Martinez Sotillo N. Disruption of Intracellular Calcium Homeostasis as a Therapeutic Target Against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020; 10: 46.

Bhattacharya P, Ali N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2013; 46(2): 128-134.

Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gummy A, Egeter O, Sakrauski AK et al. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nature Immunology* 2001; 2(11): 1054-1060.

Boguszewska K, Szewczuk M, Kazmierczak-Baranska J, Karwowski BT. The similarities between human mitochondria and bacteria in the context of structure, genome, and base excision repair system. *Molecules* 2020; 25(12): 2857-2887.

Bolivar P, Cruz-Paredes C, Hernandez LR, Juárez ZN, Sánchez-Arreola E, Av-Gay Y et al., Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137(1): 141–147.

Brianti E, Gaglio G, Napoli E. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%) / flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2014; 7: 327.

Burza S, Nabi E, Mahajan R, Mitra G, Lima MA. One-year follow-up of immunocompetent male patients treated with miltefosine for primary visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Clinical Infectious Diseases* 2013; 57(9): 1363–1364.

Burza S, Sinha PK, Mahajan R, Lima MA, Mitra G, Verma N et al. Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014b; 8(1): e2603.

Calla-Magarinos J, Gimenez A, Troye-Blomberg M, Fernandez C. "An alkaloid extract of evanta, traditionally used as anti-leishmania agent in bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009; 69(3): 251–258.

Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; 128: 67-70.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites. Leishmaniasis. [acesso em 08 de Agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: *in vitro* systems and their applications. *Methods in Enzymology* 1986; 132: 603-626.

Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible-resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One* 2011; 6(10): e26660.

Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 2441-2449.

Corral MJ, Benito-Peña E, Jiménez-Antón MD, Cuevas L, Moreno-Bondi MC, Alunda JM. Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in *Leishmania*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10: e0004525.

Corral MJ, Benito-Peña E, Jiménez-Antón MD, Cuevas L, Moreno-Bondi MC, Alunda JM. Allicin induces calcium and mitochondrial dysregulation causing necrotic death in *Leishmania*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10: e0004525.

Costa DN, Codeco CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013; 7: e2355.

Costa-Silva TAD, Grecco SS, De Sousa FS, Lago JHG, Martins EGA, Terrazas CA et al. Immunomodulatory and antileishmanial activity of phenylpropanoid dimers isolated from *Nectandra leucantha*. *Journal of Natural Products* 2015; 78(4): 653–657.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 2017; 7: 1-13.

Davoust B, Roqueplo C, Parzy D, Watier-Grillot S, and Marie J-L. A twenty-year follow-up of canine leishmaniosis in three military kennels in southeastern France. *Parasites & Vectors* 2013; 6(1): 323.

Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Sundar S, Maurya R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. *Experimental Parasitology* 2015; 53: 45– 54.

De Carvalho IPSF, Peixoto HM, Romero GAS, Oliveira, MRF. Treatment for human visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis for Brazil. *Tropical Medicine and International Health* 2019; 24(9): 1064-1077.

De Menezes JP, Saraiva EM, Rocha-Azevedo B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors* 2016; 9: 264.

De Oliveira A, Mesquita JT, Tempone AG, Lago JHG , Guimarães EF , Kato MJ. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Experimental Parasitology* 2012; 132: 383–387.

Devine M, Kittler J. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2018; 19(2): 63-80.

Dey S, Mukherjee D, Chakraborty S, Mllick S, Dutta A, Ghosh J et al. Protective effect of *Croton caudatus* Geisel leaf extract against experimental visceral leishmaniasis induces proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology* 2015; (151-152): 84– 95.

Di L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2014; 10: 379–393.

Diro E, Ritmeijer K, Boelaert M, Alves F, Mohammed R, Abongomera C et al. Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2015; 2(10): e0004087.

Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3: 251–261.

Docampo R, Moreno SNJ. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* 2011; 50(2): 113–119.

Don R, Loset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 2014;141(1): 140-146.

Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67(11): 2576–2579.

Dos-Santos AL, Carvalho-Kelly LF, Dick CF, Meyer-Fernandes JR. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Experimental Parasitology* 2016; 167: 67-75.

Fernandes CB, Junior JTM, C. De Jesus C, Souza BMPS, Laranjeira DF, Fraga DBM et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine* 2014; 32(11): 1287-1295.

Ferreira C, Soares DC, Barreto-Junior CB, Nascimento MT, Freire-de-Lima L, Delorenzi JC et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry* 2011; 72 (17): 2155–2164.

Figarella K, Marsiccobetre S, Arocha I, Colina W, Hasegawa M, Rodriguez M et al. Ergosterone-coupled triazol molecules trigger mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and acidocalcisomal Ca²⁺ release in *Leishmania mexicana* promastigotes. *Microbial Cell* 2015; 3(1): 14-28.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology* 2004; 155: 224–230.

García-García V, Oldfield E, Benaim G. Inhibition of *Leishmania mexicana* Growth by the Tuberculosis Drug SQ109. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016; 60(10): 6386-6389.

Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *The Veterinary Journal* 2009; 179: 259–263.

Gonzalez U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015; 8: CD0087.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Castillo JA. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002; 88: 13–20.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2015; 73(6): 897-908.

Hansch C, Björkrot JP, Leo A. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1987; 76: 663-687.

Hoare CA, Wallace FC. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 1966; 212:1358-996.

Holm A, Tejle K, Gunnarsson T, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 302(4): 653-658.

Huang SM, Strong JM, Zhang L, Reynolds KS, Nallani S, Temple R et al. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. *Journal of Clinical Pharmacology* 2008; 48: 662–670.

Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, F. Afrin F. Th1-Biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2015; 9(1): e3321.

Jaramillo MA, Manos OS, Zimmer EA. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Sciences* 2004; 165(3): 403–416.

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry* 2010; 47: 53–67.

Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *The Journal of the Association of Physicians of India* 1991; 39: 314–316.

Johnson I, Spence MTZ. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11^o ed. Carlsbad: Life Technologies; 2010.

Jones NG, Catta-Preta CMC, Lima APCA, Mottram JC. Genetically validated drug targets in *Leishmania*: current knowledge and future prospects. *ACS Infectious Diseases* 2018; 4: 467–477.

Junior AB, Pasquali AKS, Leandro AS, Pozzolo EM, Navarro IT, Chiyo L et al. *Manual Técnico - Leishmanioses Caninas*. Paraná (Londrina); 2015.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Van Huijsduijnen RH, Kaneko T, Kita K et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015; 14: 751–758.

Kaye PM, Cruz I, Picado A, Bocxlaer KV, Croft SL. Leishmaniasis immunopathology — impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Seminars in Immunopathology* 2020, 42: 247-264.

Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology* 2007; 37(10): 1087-1096.

Klug DM, Gelb MH, Pollastri MP. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016; 26: 2569–2576.

Lago JHG, Chen A, Young MCM, Guimarães EF, Oliveira A, Kato MJ. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* 2009; 2: 96–98.

Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and

Sergentomyia schwetzi (Diptera: Psychodidae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1990; 43 (1): 31-43.

Lombardo F, Desai PV, Arimoto R, Desino KE, Fischer H, Keefer CE et al. In silico absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetics (ADME-PK): utility and best practices. An industry perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. Journal of Medicinal Chemistry 2017; 60: 9097–9113.

Longoni SS, Sanchez-Moreno M, Lopez JE, Marin C. *Leishmania infantum* secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of Canine Leishmaniasis. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 2013; 36: 499-506.

Lopez R, Cuca LE, Delgado G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiia discreta*. Parasite Immunology 2009; 31(10): 623–630.

Luo S, Rohloff P, Cox J, Uyemura SA, Docampo R. *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca²⁺-ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca²⁺ homeostasis and growth. Journal of Biological Chemistry 2004; 279: 14427–14439.

Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gene J, F Symoens et al. Use of mass spectrometry to identify clinical Fusarium isolates. Clinical Microbiology and Infection 2009; 15: 634–642.

Melo GD, Grano FG, Silva JES, Kremer BE, Lima FM, Machado GF. Blood–brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunology 2015; 37: 635–645.

Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014. 9ª edição. Brasília (DF); 2015.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. Volume único. 2º edição. Brasília (DF); 2017.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology* 2008; 24: 371–377.

Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 397–404.

Montserrat-Sangra S, Alborch L, Ordeix L, Solano-Gallego L. TLR-2 and TLR-4 transcriptions in unstimulated blood from dogs with leishmaniosis due to *Leishmania infantum* at the time of diagnosis and during follow-up treatment. *Veterinary Parasitology* 2016; 228: 172-179.

Mouri O, Morizot G, Der Auwera GV, Ravel C, Passet M, Chartrel N et al. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8(6): e2841.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 24717-24727.

Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R et al. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2012; 6: e1674.

Naderer T, Dandash O, McConville M J. Calcineurin is required for *Leishmania* major stress response pathways and for virulence in the mammalian host. *Molecular Microbiology* 2011; 80: 471–480.

Nicolato RC, Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Carvalho M et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One* 2013; 8(12): e82947.

Nogueira FS , Avino VC , Galvis-Ovallos F , Pereira-Chioccola VL , Moreira MAB , Romariz APPL et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors* 2019; 12(1):79.

Nylen S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 2007; 28(9): 378-384.

Otranto D, De Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G et al. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary Parasitology* 2010; 172(3-4): 323–332.

Paredes CC, Balbas PB, Gómez-Velasco A, Juaréz ZN, Arreola ES, Hernández LR et al. Antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Lopezia racemosa*. *The Scientific World Journal*; 2013: ID 237438.

Passero LFD, Cruz LA, Santos-Gomes G, Rodrigues E, Laurenti MD, Lago JHG. Conventional versus natural alternative treatments for leishmaniasis: a review. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2018; 18(15): 1275–1286.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg ST et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9: 203–214.

Peng Y, Zhang Q, Xu C, Shi W. MALDI-TOF MS for the rapid identification and drug susceptibility testing of filamentous fungi. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2019; 18(6): 4865-4873.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* 2011; 50(2): 98–115.

Pigott DM, Golding N, Messina JP, Battle KE, Duda KA, Balard Y et al. Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960-2012. *Scientific Data* 2014; 1: 140036.

Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2017; 11(12): e0006052.

Regli IB, Passelli K, Hurrell BP, Tacchini-Cottier F. Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. *Frontiers in Immunology* 2017; 8: 1558.

Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 2007; 7(9): 581-596.

Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, Da-Silva SAG, Canto-Cavalheiro MM, Da Silva AJM et al. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68(4): 789–799.

Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43(3): 357–364.

Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral CF, Silva JRA et al. Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. *Mediators of Inflammation*; 2015: ID 835910.

Ruiz MGM, Richard-Greenblatt M, Juarez ZN, Av-Gay Y, Bach H, Hernandez LR. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Laennecia confusa*. *The Scientific World Journal*; 2012: ID 263572.

Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive veterinary medicine* 2014; 115: 56–63.

Salih NA, Van Griensven J, Chappuis F, Antierens A, Mumina A, Hammam O et al. Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kala-azar) in eastern Sudan: how effective is treatment for this neglected disease? *Tropical Medicine & International Health* 2014; 19(2): 146-152.

Scarpelli PH, Pecenin MF, Garcia CRS. Intracellular Ca²⁺ signaling in protozoan parasites: an overview with a focus on mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22: 469.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(6): 1296.

Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 2016; 16(9): 581-592.

Serrano-Martín X, Garcia-Marchán Y, Fernandez A, Rodriguez N, Rojas H, Visbal G et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 1403-1410.

Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry* 2011; 50(1): 161-78.

Silva CG, Silva RMM, Diniz VA, Côrte-real S. Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA F, ALVES CR. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 53-67.

Silva BJM, Hage AAP, Silva EO, Rodrigues APD. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. *Journal of Integrative Medicine* 2018; 16(4): 211–222.

Silveira FT, Lainson R, Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 2009; 31(8): 423-431.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2009; 165: 1–18.

Solano-Gallego L, Montserrat-Sangra S, Ordeix L, Martinez-Orellana P. *Leishmania infantum* specific production of IFN-gamma and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2016; 9: 317.

Stager S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, Smith DF et al. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T cell responses. *Nature Medicine* 2003; 9(10): 1287-1292.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. *Journal of Protozoology* 1958; 5: 269-273.

Sullivan DJ. Cinchona alkaloids: quinine and quinidine. In: Treatment and prevention of malaria - antimalarial drug chemistry, action and use. Basel: Springer; 2012. p. 45–68.

Sundar S, Agarwal D. Visceral leishmaniasis – Optimum treatment options in children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2018; 37(5): 492–494.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362: 504–12.

Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2015b: 1–16.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine* 2007; 356: 2571–2581.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31: 1104–1107.

Sundar S, Singh A, Tiwari A, Shukla S, Chakravarty J, Rai M. Efficacy and Safety of Paromomycin in Treatment of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *ISRN Parasitology* 2014; 2014: 1-4.

Sundar S, Singh A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. *Parasitology* 2018; 145(4): 481-489.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods* 1986; 93:157-165.

Tempone AG, Melhem MSC, Prado FO, Motoie G, Hiramoto RH, Antoniazzi MM et al. Amphibian secretins for drug discovery studies: a search for a new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design & Discovery* 2007; 4: 67-73.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000 Research* 2017; 6:750.

Varela MT, Dias RZ, Martins LF, Ferreira DD, Tempone AG, Ueno AK et al.. Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents: Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016; 26: 1180-1183.

Varela MT, Lima ML, Galuppo MK, Tempone AG, De Oliveira A, Lago JHG et al. New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. *Chemical Biology & Drug Design* 2017; 90: 1007-1011.

Varela MT, Romaneli MM, Lima ML, Borborema SET, Tempone AG, Fernandes JPS. Antiparasitic activity of new gibbilimbol analogues and SAR analysis through efficiency and statistical methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018; 122: 31-41.

Vargas-Martínez F, Torres-Guerrero E, Arenas R, Quintanilla-Cedillo MR. Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana* 2011, 39(4): 163-183.

Velásquez AMA, Bartlett PJ, Linares IAP, Passalacqua TG, Teodoro DDL, Imamura KB et al. New insights into the mechanism of action of the cyclopalladated complex (CP2) in *Leishmania*: calcium dysregulation, mitochondrial dysfunction, and cell death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2022; 66(1): e00767-21.

Vida B, Toepp A, Schaut RG, Esch KJ, Juelsgaard R, Shimak RM et al. Immunologic progression of canine leishmaniosis following vertical transmission in United States dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2016; 169: 34-38.

Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Nadaes NR, Nascimento MT, Roatt BM, Reis AB et al. Neutrophil properties in healthy and *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *Scientific Reports* 2019; 9: 6247.

World Health Organization (WHO). Ending the neglect to attain the sustainable development goals – a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: 2020.

World Health Organization (WHO). Technical Report Series. Control of the leishmaniasis. Geneva: 2010.

Yamamoto ES, Campos BLS, Laurenti MD, Lago JHG, Grecco SS, Corbett CEP et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitology Research* 2014; 113(1): 333–339.

Zhang X, Shengying L. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Natural Product Reports* 2017; 34: 1061–1089.

Zobba R, Evangelisti MA, Manunta ML, Alberti A. A case of canine neurological leishmaniasis. *Veterinaria Italiana* 2017; 53(4): 321-326.

Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry* 2018; 552: 50-59.

ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



ANEXO E

São Paulo, 27 de setembro de 2018.

Protocolo 05/2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Seleção e Otimização de Novos Candidatos a Fármacos para Leishmaniose e Doença de Chagas**”, sob a responsabilidade da **Dr. André Gustavo Tempone Cardoso**, funcionário do Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **82a** reunião realizada em **25/09/2018**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	Balb/c
Nº de animais	112
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	20 a 25 gr
Sexo	56 fêmeas e 56 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/10/2021
Espécie	Hamster
Linhagem	Dourado
Nº de animais	30
Idade	30 dias - recém desmamados
Peso	60 gr
Sexo	30 machos
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

ANEXO 2: Aprovação no Conselho Técnico Científico (CTC-IAL)



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 03 de Outubro de 2018

Projeto: **CTC 72-J / 2017**

“Seleção e otimização de novos candidatos a fármacos para Leishmaniose e Doença de Chagas”

Coordenação: André Gustavo Tempone Cardoso

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto **CTC-IAL 72-J/2017** foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz – CEUA/IAL (Protocolo 05/2018).

Atenciosamente,

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador
2ª Via: Diretor de Núcleo
3ª Via: Diretor de Centro
4ª Via: CTC