



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VIVIANE SILVA LIMA

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS
SOBRE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

JOÃO PESSOA – PB
MARÇO - 2020

VIVIANE SILVA LIMA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS
SOBRE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia.**

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA – PB

MARÇO - 2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732e Lima, Viviane Silva.

ESTUDO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS SOBRE
LEISHMANIA AMAZONENSIS / Viviane Silva Lima. - João
Pessoa, 2020.
73 f. : il.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Leishmaniose. 2. Atividade anti-Leishmania. 3.
Leishmania. I. Título

UFPB/BC

VIVIANE SILVA LIMA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS
SOBRE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em 19 / março / 2020

BANCA EXAMINADORA

Tatjana Keesen de Souza Lima

Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Daniele Idalino Janebro Ximenes

Prof.^a Dr.^a Daniele Idalino Janebro Ximenes
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

Fernanda Silva Almeida

Ms. Fernanda Silva Almeida
Universidade Federal da Paraíba- UFPB

**Aos meus pais Maria da Penha e Sérgio que
foram os principais responsáveis por me fazerem
chegar até aqui, por toda doação e exemplo.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos concedidas, por me dar forças e coragem para lutar pelo que eu acredito, por me permitir viver meus sonhos todos os dias.

Aos meus pais, Maria da Penha e Sérgio, por serem meus exemplos de dignidade e luta, por serem o reflexo do amor de Deus na minha casa, pelo incentivo em minhas escolhas, pela compreensão nos momentos que eu precisei estar ausente e seu infinito amor.

A minha irmã, Maria Niédja, pelo companheirismo e amizade, por ser um exemplo, pela compreensão, incentivo e amor.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Pablo Luiz, por ser um porto seguro nos meus momentos de dúvida, por todo amor, carinho, paciência no decorrer dessa jornada. Obrigada pelo companheirismo e compreensão.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Tatjana Keesen, por ter me concedido a oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos, pelos anos de orientação, por ser um exemplo de profissional.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunologia de Doenças Infeciosas (LABIDIC), pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados, pessoas admiro e tenho um enorme carinho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), que ao longo da minha caminhada no curso, compartilharam não apenas seus conhecimentos técnicos, mas lições que ultrapassam os conteúdos da sala de aula, sobre ética, integridade e competência, que nos auxiliam no crescimento profissional e pessoal.

A Universidade Federal da Paraíba e demais profissionais vinculados ao curso de farmácia e campos de estágio, pelo exemplo, apoio e ensinamentos sobre a profissão, pelo compartilhamento de informações que nos auxilia no crescimento profissional.

Aos meus amigos (Aline Matilde, Ana Caroline Meneses, David Henrique, Jessielly Tuarne e Maria do Socorro) por estarem sempre presentes durante esta trajetória, dividindo cada momento bom ou ruim, tornando os dias mais fáceis e os problemas menos pesados, obrigada pelo amor e pela cumplicidade.

Aos meus amigos Caroline Targino e Gabriel Brandão, pois apesar da distância, sei que tenho o amor e o apoio de vocês, obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos e colegas de curso por todos os momentos, pelas risadas compartilhadas e ensinamentos, sem vocês a caminhada seria mais árdua, todos nós evoluímos e aprendemos a conviver uns com os outros criando nossos laços de amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho como base para conquista desse sonho.

Agradeço enfim a todos os que durante este tempo estiveram presente e se tornaram base para a conquista desse sonho.

Estudo *in vitro* da atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos derivados espiro-acridínicos sobre *Leishmania amazonensis*

Viviane Silva Lima

Coordenação do Curso de Farmácia

Trabalho de Conclusão de Curso

CCS/UFPB

2020

As leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por flebotomíneos fêmeas durante o repasto sanguíneo. Esse conjunto de doenças causa grande mortalidade e morbidade no ser humano e ao longo dos anos vem sendo negligenciada devido aos poucos recursos aplicados em diagnóstico, tratamento e controle. A doença é endêmica em mais de 98 países, dentre eles o Brasil, que apresenta o maior número de casos entre os países das Américas. Atualmente, são classificadas mais de 50 espécies, sendo mais de 20 patogênicas aos humanos, que causam uma variedade de manifestações clínicas, como a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar, sendo esta última a mais comum. A única opção de tratamento são os medicamentos, como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, as pentamidinas, a miltefosina e a pentoxifilina além de outras terapias que são utilizadas como adjuvantes. Os medicamentos apresentam diversas limitações, como os efeitos colaterais e a elevada toxicidade. Esses fatores são determinantes para a busca por novos agentes terapêuticos no enfrentamento à Leishmaniose. Diante disso, avaliamos a atividade anti-*Leishmania* de derivados espiro-acridínicos e do fármaco de referência contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e a sua citotoxicidade frente a eritrócitos humanos. A atividade dos compostos sobre as formas promastigotas e eritrócitos humanos foram avaliadas pelo teste colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Os resultados demonstraram que os derivados espiro-acridínicos (AMTAC 10 e AMTAC 13) e o fármaco de referência apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, com CI_{50} de $2,91 \pm 1,664 \mu\text{g/mL}$, $6,37 \pm 2,035 \mu\text{g/mL}$ e $0,82 \pm 0,03882 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O fármaco de referência apresentou maior citotoxicidade frente a eritrócitos humanos em comparação aos derivados espiro-acridínicos. O índice de seletividade revelou que os derivados espiro-acridínicos possuem maior seletividade aos parasitas do que as células sanguíneas quando comparado ao fármaco de referência. Dessa forma, observamos que os derivados espiro-acridínicos possuem atividade anti-leishmania efetiva contra as formas promastigotas e não apresentam toxicidade para as células sanguíneas humanas. Novos testes devem ser realizados para a descoberta de mecanismo de ação para serem usados no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; Atividade anti-*Leishmania*; *Leishmania*.

**In vitro study of the anti-*Leishmania* activity of synthetic compounds
derived from spiro-acridines on *Leishmania amazonensis***

Viviane Silva Lima
CCS/UFPB
2020

Leishmaniasis are anthroponoses caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by female sandflies during blood meal. This set of diseases causes great mortality and morbidity in the human being and over the years it has been neglected due to the few resources applied in diagnosis, treatment and control. The disease is endemic in more than 98 countries, including Brazil, which has the highest number of cases among countries in the Americas. Currently, more than 50 species are classified, more than 20 are pathogenic to humans, which cause a variety of clinical manifestations, such as visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis, the latter being the most common. The only treatment options are medications, such as pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidines, miltefosine and pentoxifylline in addition to other therapies that are used as adjuvants. The medications have several limitations, such as side effects and high toxicity. These factors are decisive for the search for new therapeutic agents in the fight against Leishmaniasis. Therefore, we evaluated the anti-*Leishmania* activity of spiro-acridine derivatives and the reference drug against promastigote forms of *L. amazonensis* and its cytotoxicity against human erythrocytes. The activity of the compounds on the promastigote forms and human erythrocytes were evaluated by the MTT colorimetric test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The results showed that the spiro-acridine derivatives (AMTAC 10 and AMTAC 13) and the reference drug showed activity against *L. amazonensis* promastigotes, with an IC_{50} of $2.91 \pm 1.664 \mu\text{g/mL}$, $6.37 \pm 2.035 \mu\text{g/mL}$ and $0.82 \pm 0.03882 \mu\text{g/mL}$, respectively. The reference drug showed greater cytotoxicity against human erythrocytes compared to spiro-acridine derivatives. The selectivity index revealed that the spiro-acridine derivatives have greater selectivity for parasites than blood cells when compared to the reference drug. Thus, we observed that the spiro-acridine derivatives have an effective anti-leishmania activity against promastigote forms and do not present toxicity to human blood cells. New tests must be carried out to discover the mechanism of action to be used in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Anti-*Leishmania* activity; *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	20
Figura 2	Formas evolutivas do parasita <i>Leishmania</i>	21
Figura 3	Insetos vetores da Leishmaniose.....	22
Figura 4	Reservatórios do parasita <i>Leishmania</i>	24
Figura 5	Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	26
Figura 6	Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no mundo...	28
Figura 7	Distribuição de casos de Leishmaniose visceral no mundo...	29
Figura 8	Lesões provocadas em decorrência da Leishmaniose tegumentar.....	32
Figura 9	Lesões provocadas em decorrência da Leishmaniose visceral.....	33
Figura 10	Fórmula estrutural do antimoniato-N-metilglucamina.....	35
Figura 11	Fórmula estrutural do anfotericina B.....	37
Figura 12	Fórmula estrutural do isetionato de pentamidina.....	38
Figura 13	Fórmula estrutural da miltefosina.....	39
Figura 13	Estrutura química da acridina.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Compostos químicos testes e suas especificações.....	47
Tabela 2	Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI ₅₀) de <i>L. amazonensis</i> após 72 h de incubação com os compostos AMTAC 10 e AMTAC 13.....	53
Tabela 3	Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI ₅₀) de <i>L. amazonensis</i> após 72 h de incubação com os fármacos de referência.	54
Tabela 4	Concentração capaz de causar hemólise em 50% das hemácias (CH ₅₀) dos compostos teste e os fármacos de referência após 1 h de incubação.....	55
Tabela 5	Atividade anti- <i>Leishmania</i> , efeitos citotóxicos contra eritrócitos humanos e índice de seletividade dos compostos teste e do fármaco de referência anfotericina B.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Citotoxicidade em formas promastigotas de *L. amazonensis*
na presença do composto químico AMTAC 10 e AMTAC 13.. 52
- Gráfico 2** Citotoxicidade em formas promastigotas de *L. amazonensis*
na presença do fármaco de referência anfotericina B..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB – Anfotericina B

BRA – Brasil

CBiotec – Centro de Biotecnologia

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas

CH₅₀ – Concentração hemolítica sobre 50% dos eritrócitos

DATASUS – Departamento de informação do SUS

DBO – Demanda biológica de oxigênio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FDA - Food and Drug Administration

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IS – Índice de Seletividade

LABIDIC – Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) -2,5-difeniltetrazolio

SFB – Soro fetal bovino

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

LV – Leishmaniose visceral

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LD – Leishmaniose disseminada

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCPC - Leishmaniose cutânea pós-calazar

LMC - Leishmaniose mucocutânea

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

WHO/OMS – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Agente etiológico	19
2.2 Insetos vetores e transmissão da doença	21
2.3 Reservatórios	23
2.4 Ciclo biológico.....	24
2.5 Epidemiologia.....	27
2.6 Formas clínicas	29
2.7 Diagnóstico.....	33
2.8 Terapêutica da leishmaniose	34
2.9 Derivado acridínicos	39
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 Local da pesquisa	46
4.2 Parasitos e manutenção das culturas in vitro	46
4.3 Compostos químicos avaliados.....	46
4.3.1 Fármaco de referência	46
4.3.2 Compostos sintéticos derivados espiro-acridínicos.....	47
4.4 Atividade anti-<i>Leishmania</i> pelo método do MTT	48
4.5 Obtenção de células sanguíneas.....	49
4.6 Avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos	49
4.7 Determinação do índice de seletividade	50

4.8	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	52
5.1	Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> pelo método do MTT	52
5.2	Avaliação da citotoxicidade dos compostos AMTAC 10 e AMTAC 13 e do fármaco de referência sobre eritrócitos humanos	54
5.3	Determinação do índice de seletividade	55
6.	DISCUSSÃO	58
7.	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por protozoários sempre representaram um sério problema para a saúde pública no mundo. Neste grupo, encontram-se as leishmanioses, uma antroponose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses são doenças que provocam grande mortalidade e morbidade no ser humano e que ao longo dos anos vem sendo negligenciada devido aos poucos recursos aplicados em diagnóstico, tratamento e controle (CONTEH et al., 2010; BRASIL, 2010).

O agente etiológico da leishmaniose pertence ao gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae* e da ordem *Kinetoplastida*. Atualmente existem cerca de 50 espécies classificadas e mais de 20 espécies patogênicas a humanos, sendo que a variedade de espécies pertencentes a este gênero está relacionada as diferentes formas clínicas, que o paciente pode apresentar (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Tais parasitas apresentam um ciclo de vida heteroxênico, com um hospedeiro definitivo vertebrado e um inseto vetor invertebrado (AKHOUNDI et al., 2016).

A doença é endêmica em mais de 98 países, dentre eles o Brasil, e sua transmissão acontece quando fêmeas infectadas de flebotômíneos fazem o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero. Os flebotômíneos pertencem ao gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África, enquanto no Brasil o principal vetor é do gênero *Lutzomyia* (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

A leishmaniose apresenta uma variedade de manifestações clínicas, como a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar, essa sendo subdividida em quatro subtipos: a leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose disseminada (GOTO; LINDOSO, 2012). A forma visceral ocorre quando os parasitas invadem as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e animais, sendo assim considerada uma infecção crônica grave, que acomete principalmente as vísceras, e quando não tratada pode evoluir para óbito. A forma tegumentar acomete a derme do hospedeiro vertebrado, podendo causar desfiguração grave para os pacientes, incluindo a pele ulcerosa, lesões e a destruição das membranas das mucosas do nariz, boca e garganta, podendo levar a desfiguração permanente (BARBOSA et al., 2011).

Atualmente não existe vacina e os medicamentos são o único método de tratamento para as leishmanioses. Os medicamentos começaram a ser introduzidos a partir de 1945, sendo os antimoniais pentavalentes a base da terapia e primeira escolha no tratamento da leishmaniose (BARBOSA et al., 2011). A anfotericina B, as pentamidinas, a miltefosina e a pentoxifilina também são utilizadas no tratamento da leishmaniose, além de outras terapias que são utilizadas como adjuvantes (CARVALHO et al., 2019; DORLO et al., 2012; MARTINEZ, 2006; TIUMAN et al., 2011).

Os fármacos utilizados na terapia da leishmaniose apresentam diversas limitações, tais como: efeitos colaterais, a elevada toxicidade, alto custo, aparecimento de resistência às drogas. Esses fatores são determinantes para a busca por novos agentes terapêuticos no enfrentamento à Leishmaniose.

Diante disso, um dos grandes desafios para alavancar o surgimento de novas alternativas terapêuticas é o de propiciar compostos que tenham menos efeitos colaterais, baixa toxicidade e baixo custo, a fim de permitir uma maior adesão e melhor qualidade de vida aos pacientes durante o tratamento. Compostos derivados da acridina já demonstraram diversas atividades biológicas como a antitumoral (LISBOA et al., 2019), antimalárica (SILVA et al., 2018) e até mesmo anti-*Leishmania*. Dentro desta linha de pesquisa, alguns trabalhos já testaram compostos derivados da acridina (MESA et al., 2002; SERAFIM et al., 2018), os quais demonstraram eficácia sob formas promastigotas de *L. amazonensis*, associada a forma tegumentar e de *L. donovani*, responsável pela forma visceral.

A atividade promissora de outros derivados acridínicos já foi comprovada em trabalhos anteriores (FANG et al., 2008; MAY et al., 2006; MENEZES et al., 2019; PATEL et al., 2006; SONGHI et al., 2010). Assim, partindo dessa informação, o presente estudo avaliou a atividade de derivados espiroacridínicos, contribuindo para o surgimento de novas drogas a serem utilizadas na terapia da leishmaniose. A avaliação compreende a atividade biológica contra promastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade frente a eritrócitos humanos.

Referencial teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agente etiológico

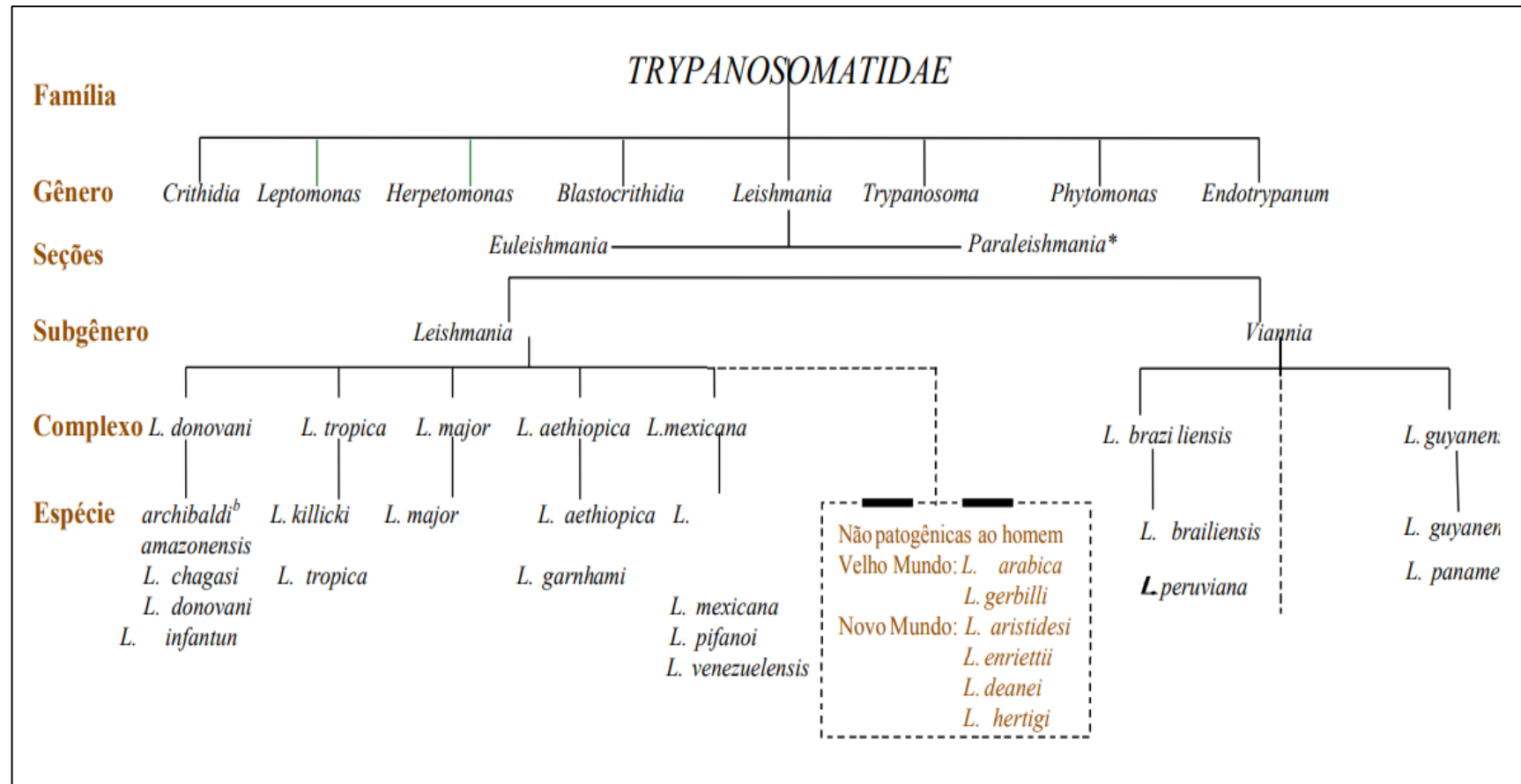
Os parasitas responsáveis pela leishmaniose pertencem ao Reino Protista, a classe Kinetoplastea, a subclasse Metakinetoplastina, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). O gênero é dividido em duas seções, a *Euleishmania* e *Paraleishmania* (que não infectam o homem), sendo cada uma subdividida em uma série de subclades representando os subgêneros (Figura 1) (MOMEN; CUPOLILLO, 2000; BRASIL, 2017; KLATT et al., 2019).

A seção *Euleishmania* é subdividida em dois subgêneros: o *Leishmania* e o *Viannia*, que por sua vez são divididos em complexos. A classificação das espécies nos subgêneros é de acordo com a localização que o parasita se desenvolve no intestino do vetor e por análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA. Os parasitas agrupados no subgênero *L. (Viannia)* são restritos principalmente ao neotrópico, ao passo que os parasitas do subgênero *L. (Leishmania)* ocorrem no Novo e Velho Mundo (GEORGIADOU et al., 2015; KLATT et al., 2019).

Atualmente, o gênero inclui mais de 50 espécies do parasita, dentre as quais, apenas 20 possuem importância médica por sua capacidade de causar doença aos humanos (KLATT et al., 2019). No Brasil, são reconhecidas oito espécies de *Leishmania* que causam a leishmaniose, sendo seis do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania* (LAISON, 2010; BRASIL, 2010).

Na Ásia, África e Europa, podem ser encontradas variadas espécies, como a *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) aethiopica*, *L. (Leishmania) killicki* e a *L. (Leishmania)*. No novo mundo, principalmente na América Latina, podem ser encontradas a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) pifanoi*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, *L. (Leishmania) garnhami*, *L. (Viannia) lainsoni* e *L. (Viannia) colombiensis* (GOTO; LINDOSO, 2010; REITHINGER et al., 2007).

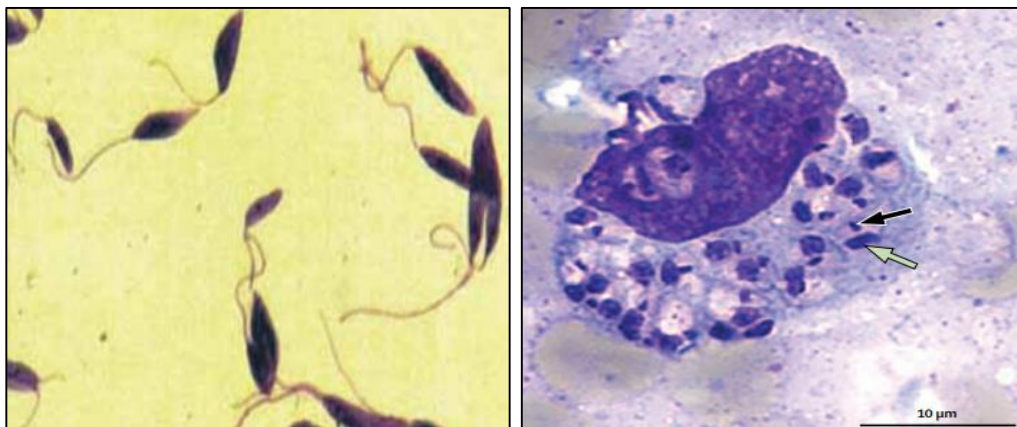
Figura 1 - Taxonomia do gênero *Leishmania*.



Fonte: BRASIL, 2017.

Durante o ciclo de vida, o parasita passa por dois hospedeiros e apresenta formas que são morfológica e bioquimicamente diferentes. No hospedeiro invertebrado, o parasita apresenta a forma promastigota, enquanto no hospedeiro vertebrado, a amastigota (KAMHAWI, 2006). A forma promastigota é a sua fase extracelular infectante, são móveis, exibem um flagelo anexado a uma organela do tipo mitocondrial, chamada cinetoplasto e vivem dentro do intestino do inseto vetor (DOUGALL et al., 2011). As promastigotas possuem um corpo em forma de fuso, medindo 1,5 a 3,5 μm na parte mais larga. As amastigotas são intracelulares obrigatórias, de formato ovalado e sem flagelo exteriorizado (Figura 2).

Figura 2 – Formas evolutivas do parasita *Leishmania*.



A) Forma promastigota; B) Exame microscópico de luz de uma amostra de medula óssea corada de um paciente com leishmaniose visceral - mostrando um macrófago. Fonte: A) BRASIL, 2007; B) BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018.

2.2 Insetos vetores e transmissão da doença

Os flebotomíneos representam grande relevância médica e veterinária, pois são vetores de várias doenças virais e de parasitas do gênero *Leishmania*, agentes causadores das leishmanioses, que são um grupo de doenças que afetam milhares de pessoas em todo o mundo. Os parasitas são transmitidos principalmente através de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo realizado por fêmea infectada com os parasitas (TORRES et al., 2010).

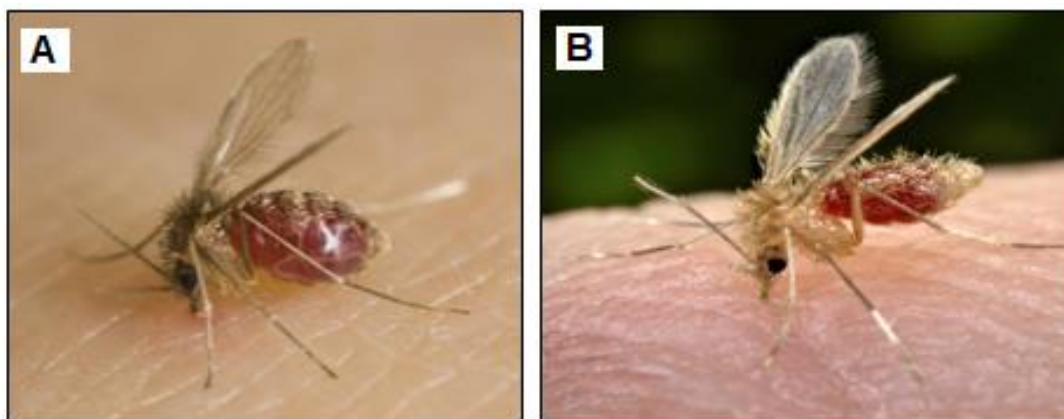
Os flebotomíneos pertencem à ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. Atualmente existem classificadas mais de 800 espécies de flebotomíneos, aproximadamente 464

espécies são encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo. Entre essas espécies, apenas 98 dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são atualmente comprovadas ou suspeitas de serem vetores da leishmaniose humana, sendo as espécies do gênero *Lutzomyia* responsáveis pela transmissão nas Américas (novo mundo) e as espécies do gênero *Phlebotomus* no resto do mundo (velho mundo) (MAROLI et al., 2013; GEORGIADOU et al., 2015).

Durante o seu ciclo de vida, os flebotomíneos passam por quatro estágios de desenvolvimento: o ovo, postos por fêmeas adultas em um habitat adequado, rico em conteúdo orgânico, o que fornece às larvas recém-emergidas abrigo, nutrição e umidade; após a eclosão do ovo é gerado a larva, em seguida a pupa e por fim o flebótomo adulto (MAROLI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016).

Os adultos são pequenos e raramente excedem 3,5 mm de comprimento, possuem pernas longas, são cobertos de pelos densos, variam de coloração, e suas asas possuem forma de 'V' característica sobre as costas quando em repouso. A alimentação dos machos acontece através da ingestão de seiva e néctar de plantas, além de frutas maduras. Já as fêmeas são hematófagas e possuem um hábito alimentar eclético, ingerindo sangue de seres humanos, cães, gatos e outros mamíferos. Os vetores possuem hábitos noturnos e seu alcance de voo é curto, cerca de 300 metros, portanto as atividades dos vetores adultos geralmente são restritas à vizinhança dos locais de reprodução das larvas (Figura 3a e 3b) (MARCONDES; ROSSI, 2013; MAROLI et al., 2013; GEORGIADOU et al., 2015).

Figura 3 – Insetos vetores da Leishmaniose.



Insetos vetores da Leishmaniose. A) *Lutzomyia longipalpis* e B) *Phlebotomus papatasi*, fêmea, alimentando-se de um ser humano. Fonte: A) BRASIL, 2010; B) MUNSTERMANN, 2019.

Em relação a distribuição geográfica dos vetores, os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* são os principais responsáveis pela transmissão dos parasitas na Europa, Norte da África, Oriente Médio e Ásia, enquanto os do gênero *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão dos EUA até o norte da Argentina. No Brasil, o principal vetor da leishmaniose é o *Lutzomyia longipalpis*, contudo, outras espécies contribuem para a transmissão (REITHINGER et al., 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A Transmissão não vetorial, através de infecção laboratorial acidental, transfusão de sangue e transplante de órgãos são raros. Na Espanha, a transmissão direta de *L. infantum* foi observada em usuários de drogas co-infectados pelo HIV através do compartilhamento de agulhas (REITHINGER et al., 2007).

2.3 Reservatórios

O ciclo de transmissão da leishmaniose varia de acordo com a região geográfica e envolve uma diversidade de espécies de parasitas, vetores, reservatórios e hospedeiros. A transmissão, anteriormente estava relacionada ao ambiente silvestre, entretanto, nas últimas décadas, a transmissão ocorre no ambiente peridoméstico e estão se espalhando para áreas que não eram endêmicas, como resultado da urbanização e desmatamento (REITHINGER et al., 2007).

Dentre os reservatórios, existem várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Os reservatórios silvestres incluem diversas espécies de roedores, marsupiais, edentados, quirópteros e canídeos silvestres. Já os animais domésticos, como os cães e gatos, são considerados hospedeiros acidentais, tendo em vista que eles podem apresentar manifestações em resposta a infecção semelhantes as humanas (Figura 4) (BRASIL, 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Figura 4 – Reservatórios do parasita *Leishmania*.



A) Marsupial didelfídeo: reservatório silvestre da *Leishmania chagasi*. B) Cão com Cão com lesão de focinho e lábios, considerado reservatório doméstico. Fonte: A) BRASIL, 2010; B) BRASIL, 2017.

2.4 Ciclo biológico

Leishmania é um gênero de eucariotos cinetoplastídeos, cujo seu ciclo de vida depende da transferência contínua entre um hospedeiro mamífero e um vetor de inseto. Esses protozoários têm um estilo de vida digenético, passando por mudanças morfológicas e bioquímicas para garantir adaptação e sobrevivência em ambos os hospedeiros (RODRIGUES et al., 2016).

O complexo processo de desenvolvimento acontece dentro do trato digestivo do vetor, onde a localização precisa no trato digestivo difere entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Viannia*, entra no intestino grosso antes de migrar para o intestino médio e, portanto, é chamado de parasita peripilariano. No entanto, a maioria das espécies de *Leishmania* (subgênero *Leishmania*) são parasitas suprapilares, pois seu desenvolvimento é restrito ao intestino médio. Os artifícios envolvidos na diferenciação ainda não foram bem estabelecidos, mas provavelmente são uma combinação da mudança de temperatura e pH semelhante a outros parasitas (DOSTÁLOVÁ; PETR, 2012; SUNTER; GULL, 2017).

O ciclo de vida (Figura 5) inicia-se quando os vetores fêmeas, se alimentam ingerindo pequenas quantidades de sangue, linfa e macrófagos parasitados de um hospedeiro mamífero infectado (por exemplo, caninos, marsupiais, edentados e roedores) (MURRAY et al., 2005). Os parasitas, na forma amastigota livres ou presentes no interior de macrófagos, são absorvidos pelos flebotomíneos, estes geralmente não são encontrados na circulação

periférica, mas estão presentes na pele do hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos fêmeas inserem as peças bucais em forma de serra na pele e as agitam para produzir uma pequena ferida na qual o sangue flui dos capilares superficiais. É esse dano tecidual associado à criação da ferida que libera macrófagos da pele e recrutam amastigotas livres, permitindo a posterior captação pelos vetores (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007).

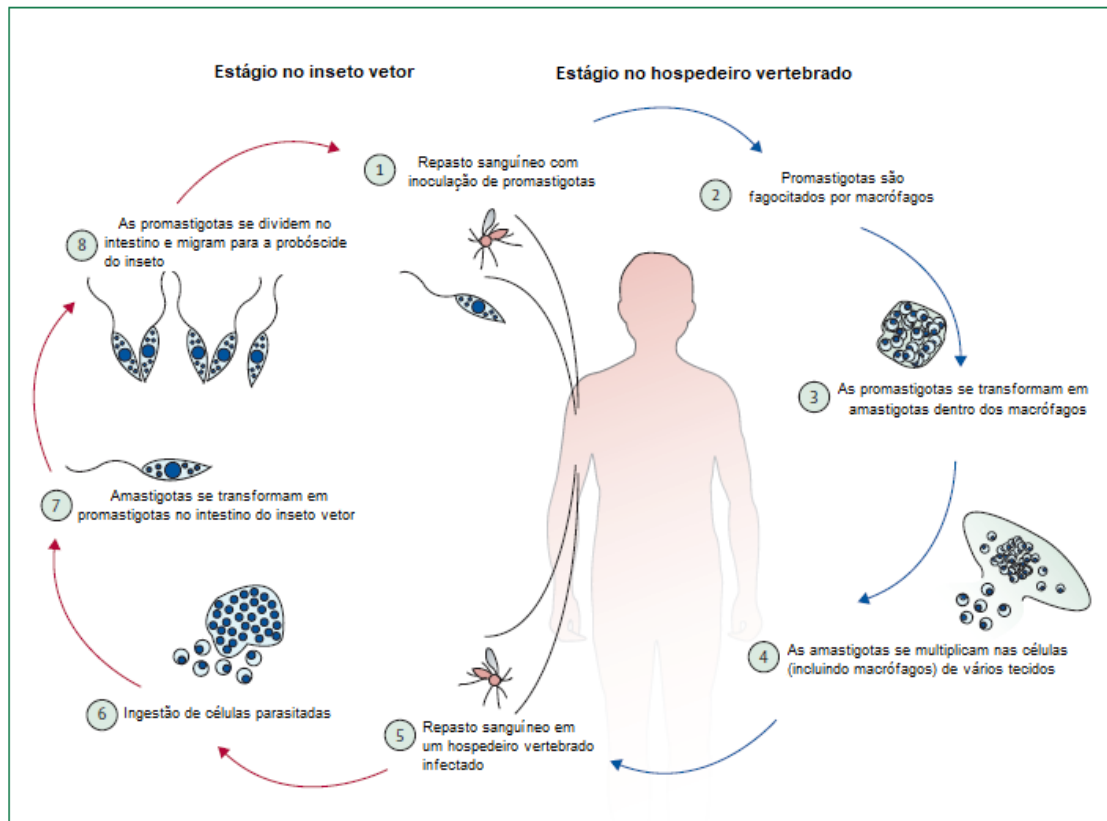
As amastigotas são liberadas dos macrófagos na extremidade posterior do intestino médio do inseto vetor, ficando confinadas por uma matriz peritrófica, uma membrana de quitina e proteína que é secretada pelo epitélio do intestino médio. Na extremidade posterior do intestino médio começam a se diferenciar e multiplicar por divisão binária, em promastigotas, móveis e com flagelos na extremidade anterior. Nessa primeira diferenciação é formada o que chamamos de promastigota procíclica, caracterizada por ser uma forma com elevada taxa de replicação e fracamente móvel que se multiplica no sangue (BATES, 2007; SUNTER; GULL, 2017).

Após alguns dias, os parasitas começam a se diferenciar de promastigotas procíclicas em promastigotas nectomonadas, que possuem menor taxa de replicação, são mais alongadas e fortemente móveis. Estas são formas migratórias que se acumulam na extremidade anterior do intestino e conseguem romper a matriz peritrófica, pela ação de uma quitinase secretora de parasitas e provavelmente pela ação da quitinase endógena do flebotomíneos. Esse rompimento permite a migração para a porção do intestino anterior, até atingir a válvula estomodeal onde acontece a transformação em promastigotas leptomonadas (BATES, 2007).

As promastigotas leptonadas possuem função de secretar um gel, composto principalmente de proteofosfoglicano filamentoso, que também permite que eles se liguem ao epitélio até certo ponto, e desempenha um papel fundamental na transmissão, visto que a colonização da válvula estomodeal são essenciais para uma transmissão eficaz. Algumas promastigotas leptonadas se diferenciam em promastigotas haptomonadas, que se fixam mecanicamente ao epitélio do intestino através da expansão da ponta flagelar em estruturas do tipo hemi-desmossoma, enquanto outras formas leptonadas se diferenciam em promastigotas metacíclicas. A última fase de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado é caracterizada por parasitas alongados e móveis, representando

o estágio infeccioso dos mamíferos. Esse processo é chamado de metaciclogênese e é definido como a transformação de promastigotas pouco infecciosas em altamente infecciosas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (BRASIL, 2014; DOSTÁLOVÁ; PETR, 2012; ALCOLEA et al., 2019).

Figura 5 – Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.



Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*, apresentando um ciclo digenético, e as fases de diferenciação no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro vertebrado. Fonte: Modificado de BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018.

No momento em que o inseto vetor fêmea infectado com formas promastigotas metacíclicas for realizar um novo repasto sanguíneo, ocorrerá a infecção do hospedeiro mamífero. A transmissão ocorre através da presença de promastigotas metacíclicas na probóscide, e/ou dos parasitas que residem atrás da válvula estomodeal que são regurgitados com refluxo de sangue ingerido. Uma pequena fração das promastigotas inoculadas é internalizada principalmente por células do sistema fagocítico mononuclear. Por fim, no fagolisossomo dos macrófagos, as promastigotas, conseguem sobreviver as substâncias microbidas e se diferenciam na forma amastigota não móvel e

proliferam extensivamente por divisão binária, até a lise do fagolisossomo e consequente da célula hospedeira, liberando os parasitas que se espalham para novas células e tecidos de diferentes órgãos causando lesões e destruição dos tecidos. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo toma outra refeição de sangue, recuperando amastigotas livres ou células infectadas (MURRAY et al., 2005; DOSTÁLOVÁ; PETR, 2012; CECÍLIO et al., 2014).

2.5 Epidemiologia

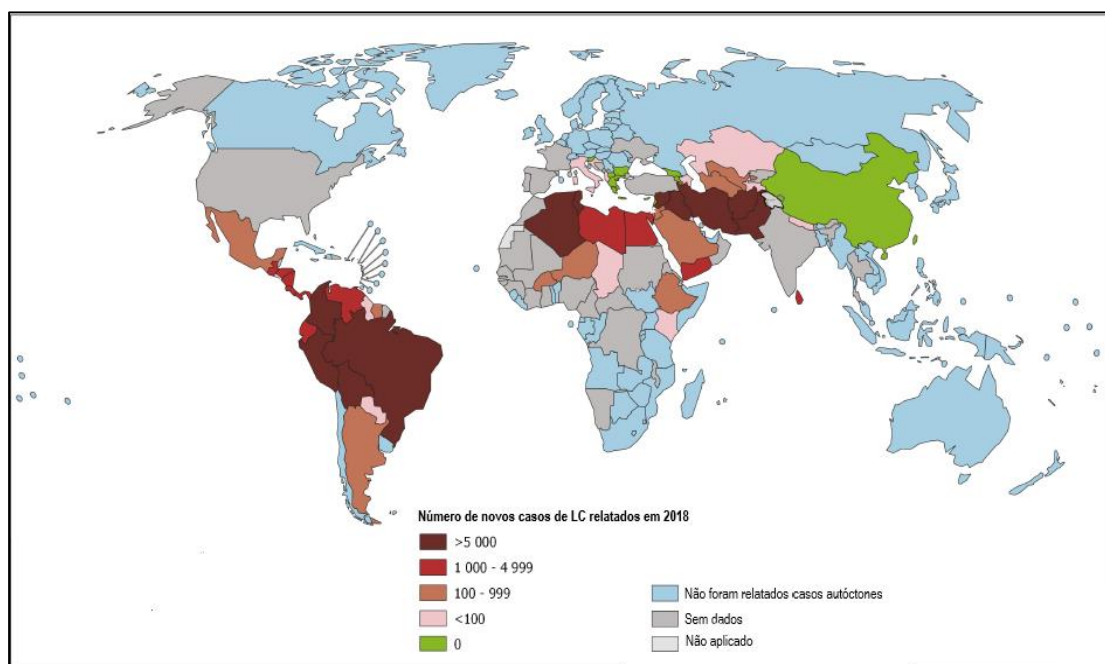
As leishmanioses são um conjunto de doenças que se encontram entre as doenças negligenciadas, que são aquelas que prevalecem em países tropicais e subtropicais, onde há condições de pobreza e vulnerabilidade, além de serem ignoradas nas discussões sobre as prioridades de saúde. (BRASIL, 2010; MITRA; MAWSON, 2017; WHO, 2018). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que produzem formas clínicas que afetam a pele, as mucosas e as vísceras, sendo transmitidas aos seres humanos e a animais através de flebotomíneos (STEVERDING, 2017; OPAS, 2019).

Esse conjunto de doenças representam um importante problema de saúde pública mundial, e segundo os últimos dados da Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses são endêmicas em 98 países. Estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente (MARTINS-MELO et al., 2018; WHO, 2018).

A leishmaniose cutânea ou tegumentar é a forma clínica mais comum, sendo endêmica em mais de 70 países (Figura 6), cerca de 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria. O Brasil especificamente tem 84% (16.432) do total de casos que foram reportados em 2019 pela América (OPAS, 2019; WHO, 2019a). A LC é endêmica em todas as regiões do Brasil, no Nordeste o número de casos notificados entre os anos de 2014 a 2018 foi de 27.023, sendo 254 notificados pelo estado da Paraíba (DATASUS, 2020). A LC é antroponótica, ou seja, os seres humanos são o principal reservatório do parasita, e é predominantemente urbana e periurbana (REITHINGER et al., 2007).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é encontrada em países da América do Sul, sendo o maior número de casos presentes no Brasil, Peru e Bolívia, mas também é encontrado um menor número de casos na Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Figura 6 – Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no mundo.

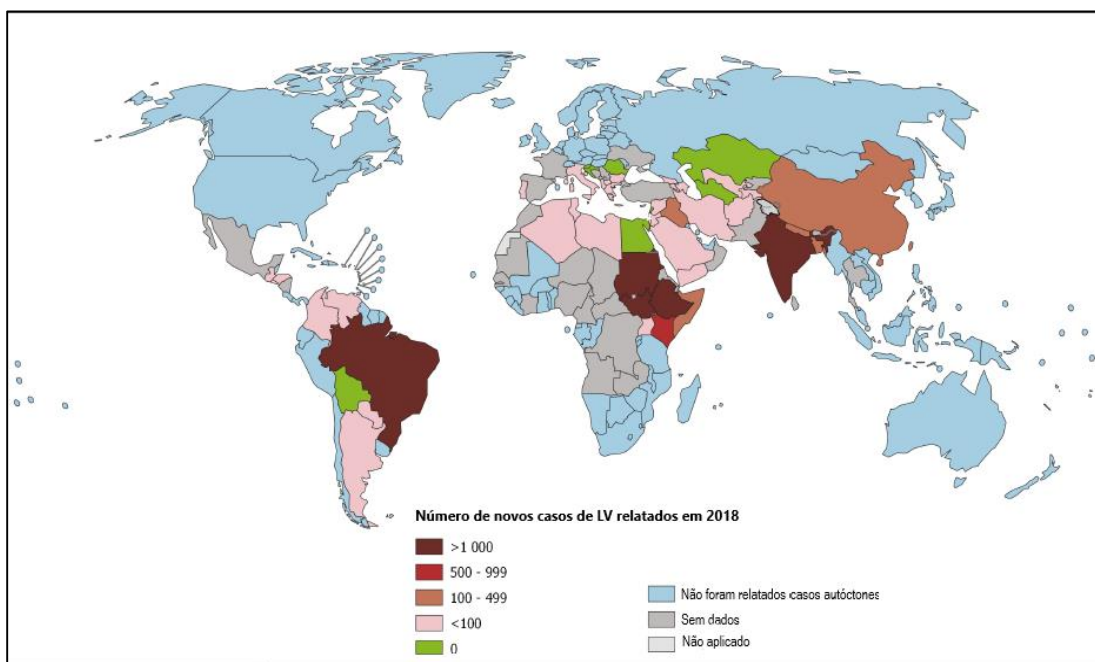


Fonte: Modificado de WHO, 2019b.

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave, podendo ser fatal em casos não diagnosticados e que não recebem tratamento adequado. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos ocorram em todo o mundo a cada ano, dos quais apenas uma pequena parte deles (25 a 45%) são relatados à OMS. Em 2017, mais de 95% dos novos casos relatados à OMS ocorreram em 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. É endêmica em 12 países das Américas, e em 2018, dentre eles o Brasil é o que apresentou o maior número de casos, cerca de 97% (3.466). Os outros países da América que apresentaram casos de LV foram a Argentina, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Paraguai, Venezuela e Uruguai (Figura 7) (OPAS, 2019). No Brasil a LV é endêmica em todas as regiões, o total de casos notificados pela região Nordeste entre os anos de 2014 a 2018 foi de 10.846, enquanto a Paraíba apresentou 238 novos casos (DATASUS, 2020).

A co-infecção HIV-LV é uma condição preocupante e já foi relatada em mais de 35 países. Inicialmente, a maioria desses casos era do sudoeste da Europa, mas o número de casos está aumentando na África Subsaariana, especialmente na Etiópia, no Brasil e no sul da Ásia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Figura 7 – Distribuição de casos de Leishmaniose visceral no mundo.



Fonte: Modificado de WHO, 2019b3.

2.6 Formas clínicas

A infecção por parasitas do gênero *Leishmania* causam ao hospedeiro diferentes manifestações clínicas, sendo essa variedade relacionada a espécie do parasita envolvido na infecção, além da genética do hospedeiro e a sua capacidade de desenvolver uma resposta imune adequada para controlar a infecção (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

As leishmanioses compreendem duas manifestações clínicas distintas: a leishmaniose visceral e a tegumentar. A leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo acometimento da derme, e seu espectro de manifestações pode ser subdividido em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD). Enquanto a leishmaniose visceral apresenta

manifestação sistêmica e tem predileção pelas vísceras, como o fígado e baço. Cada tipo de manifestação clínica abrange uma ampla variedade de sinais, sintomas e variados graus de gravidade (REITHINGER et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

A forma tegumentar acomete a derme do hospedeiro vertebrado, podendo causar desfiguração grave para os pacientes, incluindo a pele ulcerosa, lesões e a destruição das membranas das mucosas do nariz, boca e garganta, levando a desfiguração permanente e exclusão social (BARBOSA et al., 2011).

O subtipo leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 8A e 8B), é a manifestação clínica mais prevalente em todo o mundo, clinicamente caracterizada por lesões restritas ao local da picada do flebotomíneo. O primeiro sinal de infecção é um eritema que se desenvolve em um período variável para uma pápula, e nos meses seguintes torna-se um nódulo que ulcera progressivamente ao longo de um período de 2 semanas a 8 meses. As lesões podem variar em gravidade, aparência e o tempo de cura. A resolução da lesão pode ser espontânea, e geralmente resulta em proteção ao longo da vida da doença, que pode ou não estar restrita à mesma *Leishmania* spp, além de causar uma cicatriz cutânea, que, dependendo do tamanho e local, pode causar trauma substancial nos indivíduos afetados. Na região Norte do Brasil, esse tipo de manifestação clínica parece estar relacionada a infecção por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REITHINGER et al., 2007; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 8C e 8D) é uma condição crônica e progressiva que afeta grandes áreas da pele, que pode durar longos períodos. É caracterizada pela anergia da resposta imune celular aos antígenos do parasita, o que permite a disseminação pelas vias tecidual, linfática e sanguínea. Os pacientes apresentam múltiplos nódulos não ulcerativos que se disseminam do local inicial da infecção e pode cobrir o corpo todo. No Brasil, a doença é causada pela *L. (L.) amazonensis* (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2007; VAN HENTEN et al., 2019).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 8E e 8F) é caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato levando a extensa desfiguração facial. As lesões geralmente começam nas narinas ou nos lábios e é comum uma história de agravamento da congestão nasal, epistaxe ou corrimento. A LMC é

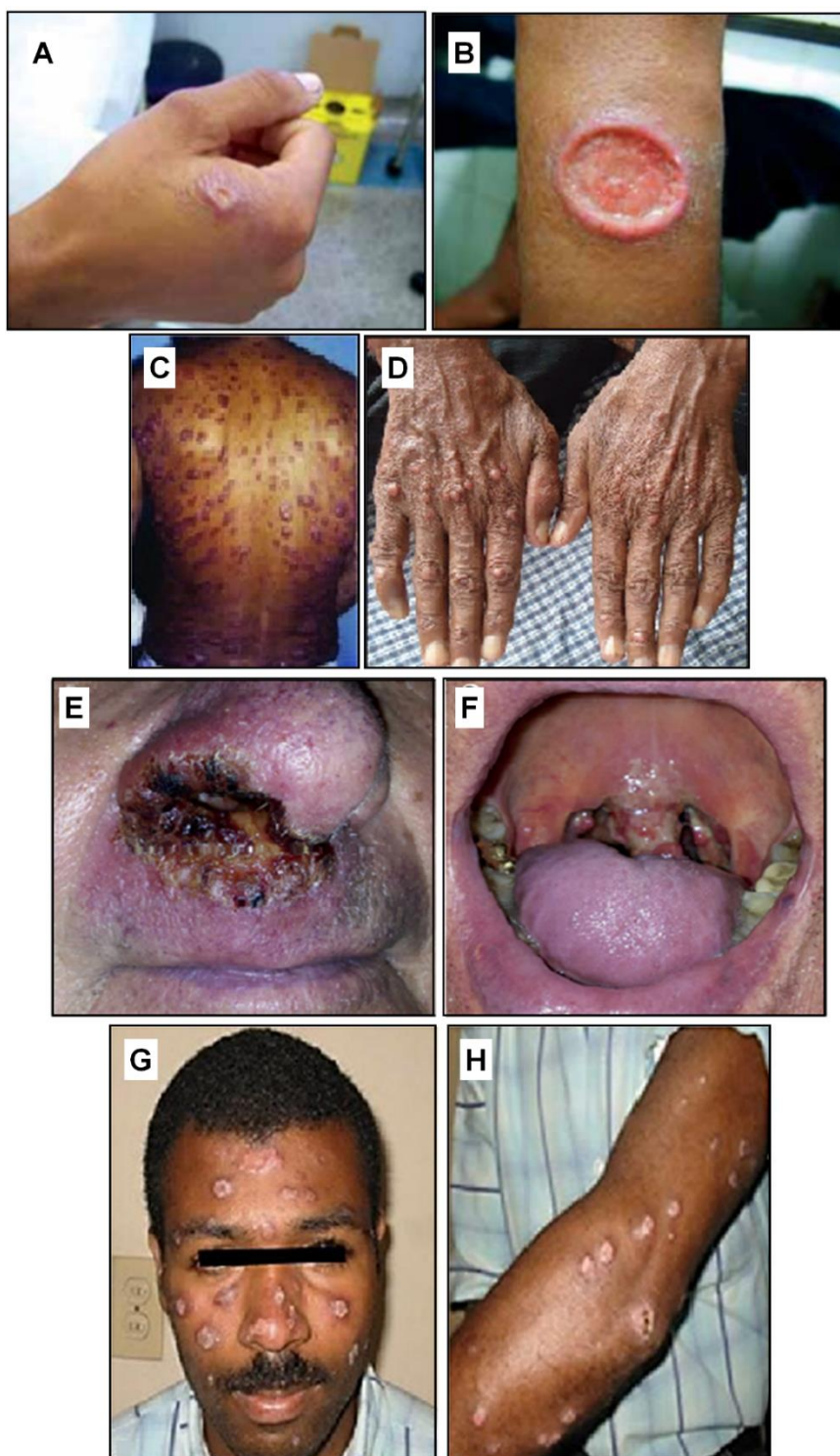
considerada potencialmente fatal, podendo levar a uma desfiguração permanente e precisa ser diagnosticada e tratada rapidamente (TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Embora a LMC possa ser causada por diversas espécies de *Leishmania spp.* (*L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. maior*, *L. tropica* e *L. infantum*) é mais comum a doença estar associada a *L. braziliensis*. (REITHINGER et al., 2007; STEVERDING, 2017).

A leishmaniose disseminada (LD) (Figura 8G e 8H) é uma forma rara, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que se estende por todo o corpo, em alguns casos pode existir comprometimento mucoso. No Brasil, as principais espécies envolvidas nesse tipo de infecção são a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* (BRASIL, 2007).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica grave resultante da infecção principalmente por *L. infantum* (sin. *L. chagasi*), e por *L. donovani*. A *L. infantum* tem ampla distribuição na América Latina, estendendo-se do México à Argentina. Já a *L. donovani*, causa LV nas regiões da Índia e África (BUBLITZ; POCHÉ; GARLAPATI, 2016; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Essa manifestação clínica é resultante da invasão dos parasitas às células do sistema mononuclear fagocitário, e pelo tropismo dos parasitas pelas vísceras, como o fígado e baço, sendo considerada uma infecção crônica grave, e quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (TIUMAN et al., 2011; BRASIL, 2017).

A manifestação clínica da forma visceral (Figura 9) é decorrente da proliferação de parasitas em macrófagos no fígado, baço e medula óssea, dando origem a hepatoesplenomegalia progressiva e supressão da medula óssea. Essa condição pode gerar um quadro de pancitopenia, além disso, os pacientes apresentam febre alta e perda de peso, sendo a desnutrição aguda associada a uma alta carga parasitária, principalmente em crianças pequenas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Manifestações clínicas mais severas podem levar a uma hiperpigmentação da pele, levando à designação *Kala-Azar*, que em hindi significa "Pele negra". O início pode ser agudo, e o período de incubação é de 2 semanas a 8 meses (WILHELM, 2019).

Figura 8 – Lesões provocadas em decorrência da Leishmaniose tegumentar.



(A e B) Sinais característicos de LCL. As lesões são ulceradas, com bordas elevadas, com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso. (C e D) Lesões características de LCD, onde o paciente apresenta lesões não ulceradas por grande extensão do corpo. (E e F) Lesões características de LMC, onde o paciente apresenta severo comprometimento da região oronasal proveniente da infecção por *Leishmania*. Na imagem à esquerda: lesão que afeta a narina e lábio superior, enquanto na imagem à direita: lesão que afeta a úvula e os tecidos adjacentes. (G e H) Lesões características de LD. Fonte: (A e B) BRASIL, 2007; (C e D) HOOJA et al., 2014; (E e F) BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; (G e H) VÉLEZ et al., 2015.

Os indivíduos que apresentam a co-infecção LV e HIV têm uma suscetibilidade particular ao desenvolvimento de apresentações atípicas e maior gravidade da LV, além de ter maior suscetibilidade ao desenvolvimento da AIDS. O prognóstico ruim da co-infecção se deve aos efeitos da desregulação do sistema imunológico do hospedeiro proveniente dos agentes de cada doença (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Uma condição que pode ocorrer após o tratamento da LV por infecção por *L. donovani* é o desenvolvimento da leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC), caracterizada por uma proliferação rápida e progressiva de parasitas dentro da pele, que dão origem a lesões maculares de distribuição em torno da boca e de aspecto hipo ou hiperpigmentadas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). O diagnóstico é desafiador, tendo em vista que o espectro clínico pode variar e imitar outras doenças de pele. A LCPC ocorre predominantemente na África e na Ásia, em áreas onde a *L. donovani* é o parasita causador (WHO, 2017).

Figura 9 - Lesões provocadas em decorrência da Leishmaniose visceral.



Paciente com hepatoesplenomegalia (A); Lesões características de leishmaniose cutânea pós-calazar (B). Fonte: (A) BRASIL, 2014; (B) BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018.

2.7 Diagnóstico

Na leishmaniose cutânea, o diagnóstico é baseado pela identificação de amastigotas em exame microscópico de raspados na pele ou espécimes de biópsia, geralmente retirados da borda das lesões. O exame microscópico é uma

alternativa de baixo custo e de rápida execução, mas tem sensibilidade limitada, principalmente em lesões crônicas. Além disso, podem ser realizadas culturas das lesões, embora mais sensíveis, podem ser contaminadas por elementos bacterianos e fúngicos, outra limitação são as diferentes condições de crescimento que as espécies necessitam. A partir da cultura, as espécies de *Leishmania* podem ser identificadas usando eletroforese de isoenzima, mas se trata de um teste demorado, caro e que requer o cultivo de parasitas em larga escala. A detecção de anticorpos é pouco sensível devido à falta de produção significativa de anticorpos na leishmaniose cutânea (BRASIL, 2017; PISCOPO; MALLIA, 2007).

O teste cutâneo de Montenegro é baseado no monitoramento da reação local a uma injeção intradérmica de antígeno de *Leishmania*. Esse teste tem uma sensibilidade variada, tendo em vista que no início da infecção (3 meses) o teste é negativo, mas torna-se positivo em quase todos os pacientes com leishmaniose e permanece positivo para a vida (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Para o diagnóstico de leishmaniose visceral pode-se seguir dois métodos: o parasitológico ou sorológico (BRASIL, 2010). O método parasitológico consiste na detecção microscópica de amastigotas em esfregaços de aspirados de tecidos ou amostras de biópsias. Já os métodos sorológicos consistem em reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento e aglutinação direta. O DNA de *Leishmania* também pode ser detectado em aspirados de tecidos e sangue periférico por reação em cadeia da polimerase (PCR) (PISCOPO; MALLIA, 2007).

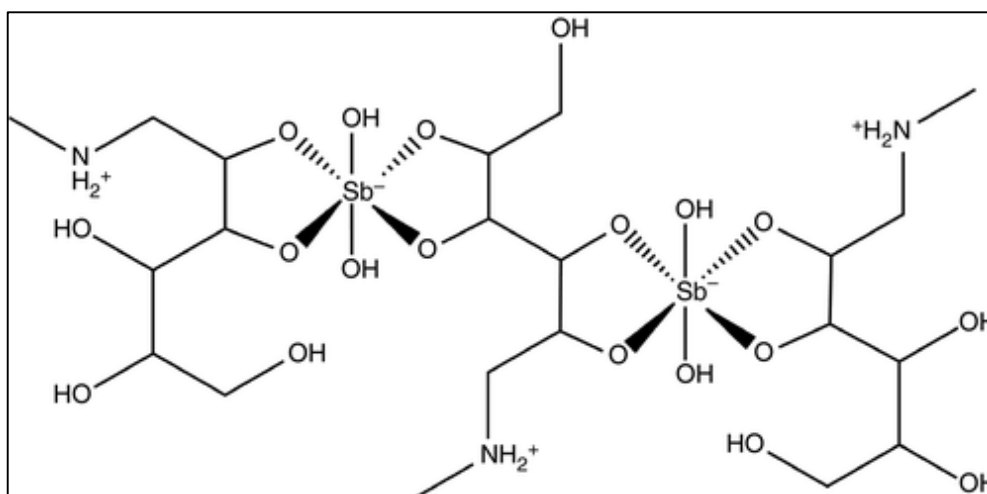
2.8 Terapêutica da leishmaniose

Devido à falta de vacinas como método de prevenção para as leishmanioses, os medicamentos se tornam as únicas alternativas para o tratamento dessas patologias. Nas últimas décadas, poucos medicamentos ou novas formulações dos antigos se tornaram disponíveis, mas até o momento, nenhum deles é ideal para tratamento devido à alta toxicidade, problemas de

resistência, alto custo e a longa duração do tratamento (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A base para a terapia da leishmaniose são os antimônias pentavalentes (Sb^{+5}), que começaram a ser introduzidos em 1945, e por muitos anos têm sido utilizados para a terapia de LV e LC (BARBOSA et al., 2011). Dentre os antimonias pentavalentes são utilizados o antimonato-N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), esses são fármacos de primeira escolha no tratamento da leishmaniose (RATH et al., 2003). No Brasil, apenas o Glucantime® (Figura 10), dentre os antimonias está disponível para o tratamento dessa patologia. A apresentação comercial do fármaco é em ampola de 5 mL, o que corresponde a 405 mg de antimônio pentavalente (Sb^{+5}). São administrados em uma concentração de 10 mg a 20 mg $\text{Sb}^{+5}/\text{kg}/\text{dia}$, por via intravenosa, e em alguns casos por via subcutânea com intervalos de 15 em 15 dias. (MINODIER; PAROLA, 2007; BRASIL, 2017).

Figura 10 - Fórmula estrutural do antimonato-N-metilglucamina.



Fonte: RATH et al., 2003.

Os antimonias (Sb^{+5}) são pró-fármacos, que são reduzidos (por ação enzimática ou não) a antimônio trivalente (Sb^{+3}) após atravessar a membrana fagolisossômica das células hospedeiras (BRUNTON et al., 2012). O antimônio reduzido age contra amastigotas comprometendo o potencial redox de tiol das células, dessa forma, há um aumento na concentração de tióis, induzindo o seu efluxo e consequentemente inibindo a tripanotione redutase (TR). Além disso,

atuam aumentando níveis de citocinas e induzindo danos ao DNA (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

Os efeitos colaterais são comuns no uso de terapia com antimônio de forma sistêmica, dentre os principais efeitos estão os relacionados ao sistema cardiovascular, tais como: arritmias cardíacas, intervalo QTc prolongado, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Além disso, os pacientes em uso de antimoniais podem apresentar artralgia e mialgia, enzimas hepáticas e pancreáticas elevadas (SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017). Dessa forma, não é recomendado o uso desses medicamentos em pacientes com idade acima de 50 anos, com doenças cardíacas, renais, hepáticas e com o uso concomitante de medicamentos que prolongam o intervalo QT (BRASIL, 2017).

Em mais de cinco décadas em uso no tratamento da leishmaniose, os antimoniais apresentaram poucas evidências de resistência. No entanto, a região endêmica da LV em North Bihar, na Índia, tem a distinção única de ser a única região no mundo em que foi relatada falha primária generalizada ao Sb⁺⁵ (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006).

A anfotericina B (AB) (Figura 11) é um antifúngico da classe dos macrolídeos polienos, cuja estrutura é caracterizada por átomos de carbono divalentes dispostos em série (MARTINEZ, 2006). Atualmente, é considerado um medicamento de segunda linha no tratamento da leishmaniose, atuando principalmente no tratamento de gestantes com LC e em pacientes que possuem co-infecção HIV-LV (PELISSARI et al., 2011; RIZK et al., 2014; TIUMAN et al., 2011; SUNDAR; SINGH, 2018).

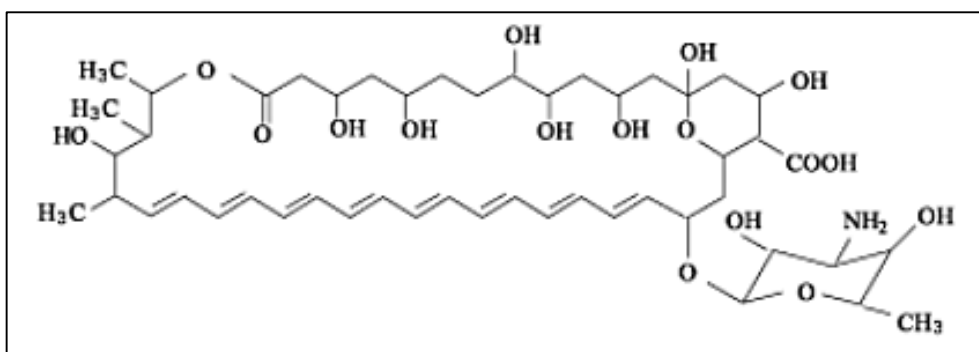
A formulação clássica da AB é o desoxicolato de Anfotericina B, que consiste em uma junção do princípio ativo com micelas desoxicolato, que comercialmente são apresentadas como uma suspensão coloidal em frascos-ampola com 50 mg (BRASIL, 2017). Essa formulação apresenta certa instabilidade e o fármaco é rapidamente liberado na corrente sanguínea, causando efeitos colaterais (GHORBANI; FARHOUDI, 2017; SUNDAR; SINGH, 2018).

O mecanismo de ação da AB provoca lesão nas membranas celulares ao interagir com o ergosterol, causando instabilidade da membrana e formação de poros, através dos quais há o efluxo de potássio, resultando em morte celular

(SATOSKAR, 2014; GOLAN et al., 2016). Os efeitos colaterais relacionados ao uso desse medicamento, inclui reações à infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite, e, portanto, deve ser usado apenas em ambiente hospitalar, o que aumenta o custo da terapia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Devido a elevada toxicidade foram desenvolvidas alternativas utilizando lipídeos, e atualmente existem, a anfotericina lipossômica, anfotericina com dispersão de colesterol e anfotericina com complexo lipídico. Essas formulações têm sido utilizadas para o tratamento de LV (GOTO; LINDOSO, 2010). Além de diminuir a toxicidade, a formulação lipídica permite que o composto ativo possa circular no corpo por um longo período de tempo, penetrando nos tecidos de maneira eficiente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006; GHORBANI; FARHOUDI, 2017). A AB lipossomal é comercializada na forma de pó estéril amarelo-vivo em frascos-ampola de vidro com 50 mg de princípio ativo (GHORBANI; FARHOUDI, 2017; BRASIL, 2017).

Figura 11 - Fórmula estrutural do Anfotericina B.



Fonte: RATH et al., 2003.

As pentamidinas, como o isetionato (Di- β -Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina (Figura 12), pertencem as diamidinas aromáticas (BRUNTON et al., 2012). As pentaminas são drogas de segunda escolha, que tem sido utilizada para o tratamento de LMC no Brasil, além de seu uso na profilaxia secundária na co-infecção por HIV-LV (TIUMAN et. al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

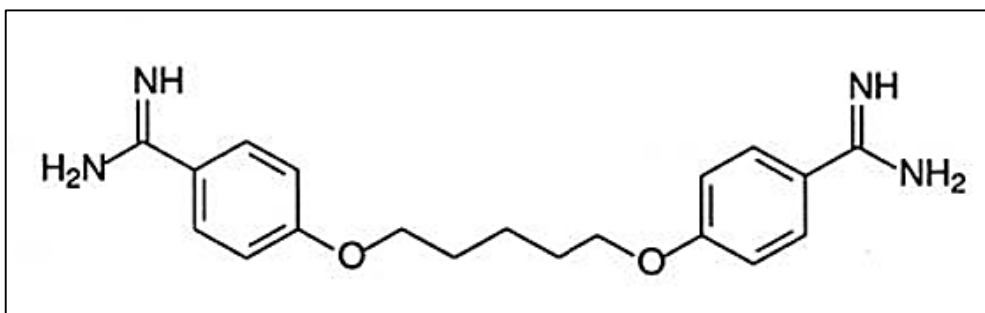
O alvo da ação das pentamidinas é a biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídios e proteínas, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana mitocondrial, matando o parasita (GOTO; LINDOSO, 2010; BRUNTON et al., 2012; MCGWIRE;

SATOSKAR, 2014). A Hipoglicemia e hiperglicemia são os principais efeitos adversos.

As pentamidinas são apresentadas comercialmente em frasco – ampola com 300 mg do sal. A administração deve ser de 3 – 4 mg/kg/dia, em dias alternados, de três a dez doses dependendo da região e da forma clínica, por via endovenosa ou intramuscular (BRASIL, 2017)

Estudos *in vitro* já demonstraram parasitas com resistência as pentamidinas. As promastigotas de *L. donovani* e *L. amazonensis* resistentes à pentamidina demonstraram ter 18 a 75 vezes menos captação do fármaco e possuem um aumento do efluxo (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006).

Figura 12 - Fórmula estrutural do isetionato de pentamidina.



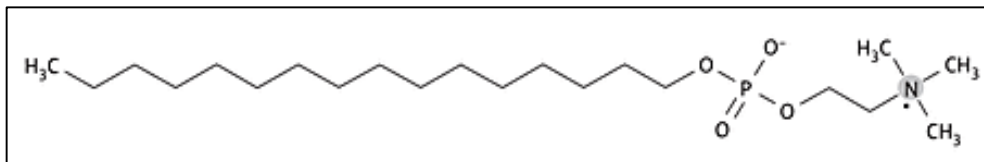
Fonte: CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006

A miltefosina (Figura 13), também conhecida como hexadecilfosfocololina, teve a atividade anti-neoplásica e leishmanicida descoberta simultaneamente em 1980 (DORLO et al., 2012; FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Esse medicamento é uma alquilfosfocololina, que são ésteres de fosfocolina dos álcoois alifáticos de cadeia longa. O seu mecanismo de ação ainda não é bem estabelecido, ela parece ter ação direta contra o parasita, prejudicando o metabolismo lipídico e causando apoptose do parasita (DORLO et al., 2012; GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

O seu uso já foi relatado em pacientes com LV e nos últimos anos ele tem sido utilizado na terapia da LC causadas por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (GOTO; LINDOSO, 2010; CARVALHO et al., 2019). A administração é por via oral de 50-200 mg/kg durante 28 dias, tendo como efeitos colaterais: distúrbios gastrointestinais, e ocasionalmente, podem ocorrer hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. É contraindicado em mulheres com

potencial para engravidar devido aos seus efeitos teratogênicos em estudos com animais (BRASIL, 2017).

Figura 13 - Fórmula estrutural da miltefosina.



Fonte: DORLO et al., 2012.

A Pentoxifilina, da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas, é um inibidor da fosfodiesterase eritrocitária, atualmente recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para uso em combinação com AM no tratamento de LCM, foi originalmente desenvolvido para uso em doenças vasculares periféricas (CARVALHO et al., 2019). É apresentado como comprimido revestido, de liberação prolongada, contendo 400 mg de pentoxifilina (BRASIL, 2017). Outros medicamentos também são utilizados em combinação com a terapia padrão, como os antifúngicos azóis (CARVALHO et al., 2019).

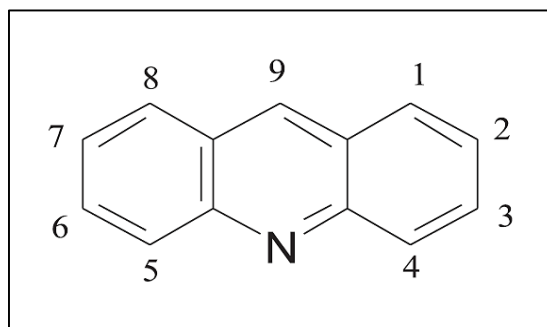
Além dos efeitos colaterais, a elevada toxicidade e o aparecimento de resistência às drogas justifica o estudo de produtos que possam ser mais eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais para o hospedeiro (MANJOLIN et al., 2013).

2.9 Derivado acridínicos

A acridina é um alcaloide derivado do antraceno, caracterizada estruturalmente pela fusão linear de três anéis aromáticos de 6 membros com um átomo de nitrogênio incluído no anel central (Figura 14), também conhecidas pelos nomes dibenzopiridina, 2,3,5,6-dibenzopiridina e 10-azaantraceno (BELMONT et al., 2007; KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; BERGER et al., 2018).

As acridinas foram isoladas pela primeira vez do carvão por Graebe em 1870, e foi utilizada com a função de pigmentos e corantes no final do século XIX, apenas durante a Primeira Guerra Mundial as suas propriedades farmacológicas foram investigadas (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001).

Figura 14 – Estrutura química da acridina.



Fonte: KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012.

Os derivados da acridina são fortes candidatos a novos fármacos devido às suas amplas propriedades biológicas. Diversas atividades já foram descritas, como a anti-inflamatória (SONGHI et al., 2010), antiprion (MAY et al., 2006), anti-alzheimer (FANG et al., 2008) antiparasitários e antimicrobiana (PATEL et al., 2006).

A diversidade das atividades biológicas de derivados da acridina, tanto de origem natural quanto sintética, foram atribuídos a propriedade que são compartilhadas por estes compostos, como a estrutura planar do anel e a consequente capacidade de intercalação entre os ácidos nucleicos do DNA. Além disso, conseguem interagir e inibir a ação das enzimas essenciais, como topoisomerases tipo I e II, telomerase e proteína quinases, que levam a um comprometimento da função fisiológica e consequente morte celular (DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001; MENEZES et al., 2019).

Neste sentido, foram exploradas ações em diversas doenças, como no câncer. O primeiro agente a ser submetido ao desenvolvimento clínico completo foi a Amsacrine (m - AMSA), para a utilização como agente antineoplásico em leucemias. A AMSA é um medicamento à base de anilinoacridina, utilizado na prática clínica desde 1976, foi provado ser um intercalador do DNA e inibidor da topoisomerase II (BELMONT et al., 2007; ALMEIDA et al., 2016).

Lisboa e colaboradores (2019) estudaram derivados da acridina com atividade antitumoral, os híbridos de tiofeno-acridina. Estes derivados demonstraram em efeito antitumoral em modelo de adenocarcinoma mamário espontâneo em murinos, reduzindo o volume do tumor e a viabilidade celular, indicando uma atividade in vivo significativa destes compostos.

A atividade contra o *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, já foi investigado desde de 1928, quando um medicamento antimalárico derivado de 9-aminoacridina, a quinacrina, foi inicialmente utilizado como um agente profilático da malária (YAN et al., 2018). Posteriormente, em 1940, a quinacrina conseguiu a aprovação do FDA dos EUA para o tratamento da giardíase, bem como para a artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (WOZNIACKA; CARTER; MCCAULIFFE, 2002; LEE et al., 2011)

Estudos recentes demonstraram a atividade in vitro de quatro acridinas contra cepas o *P. falciparum* resistente à cloroquina (medicamento de escolha para a malária), demonstrando ser efetivos contra os parasitas (SILVA et al., 2018).

Um dos grandes desafios no estudo da leishmaniose é identificar novas terapias que possam substituir ou complementar as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis, sendo estas mais seletivas e menos tóxicas para atenuar ou impedir o estabelecimento da patologia. Diante disso, levou à hipótese de que agentes antineoplásicos poderiam se consolidar como possíveis candidatos antileishmaniais, tendo em vista a semelhança no que diz respeito a replicação de células tumorais e de protozoários da família Trypanosomatidae, como as espécies do gênero *Leishmania* (MESA et al., 2002; DI GIORGIO et al., 2003; SERAFIM et al., 2018).

A atividade anti-*Leishmania* já foi investigada em compostos híbridos de amino-tiofeno e acridina. Estes compostos mostraram atividade anti-*Leishmania* contra promastigotas de *L. amazonensis*, além de nenhuma citotoxicidade contra eritrócitos humanos (SERAFIM et al., 2018). Em estudos *in vitro* de Mesa (2002), derivados da acridina demonstraram reduzir a multiplicação de promastigotas de *L. donovani*, e nos testes *in vivo* redução de amastigotas no baço de ratos infectados (MESA et al., 2002).

Devido a essas propriedades farmacológicas, a síntese desses compostos tem sido de considerável interesse na química medicinal. Essa diversidade de ações está relacionada a diferentes substituições no anel heterocíclico que podem conferir várias características e atividades biológicas às acridinas (BELMONT et al., 2007; SILVA et al., 2018).

Os compostos espiro-acridínicos são uma nova classe promissora de derivados de acridina. A obtenção desses derivados é por meio de reações de

espirociclicização produzindo um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina. Esses compostos já demonstraram capacidade de ligação ao DNA, inibição da enzima topoisomerase II α , tirosinase humana e atividade antiproliferativa contra as linhas celulares de tumor (MENEZES et al., 2019).

Dessa forma, justifica-se o estudo com compostos espiro-acridínicos contra formas promastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*, além da avaliação de citotoxicidade dessas moléculas sobre eritrócitos de humanos. As informações adquiridas com os resultados desse trabalho ampliam os conhecimentos na área da leishmaniose e levam ao desenvolvimento de novos estudos que possam beneficiar diretamente a população de pacientes com a doença.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos de derivados sintéticos espiro-acridínicos contra protozoários do gênero *Leishmania*, bem como avaliar sua ação citotóxica contra linhagens de células sanguíneas humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade *anti-Leishmania* in vitro dos derivados espiro-acridínicos sobre as formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonensis*;
- Calcular a concentração inibitória de 50% dos compostos testadas sobre as promastigotas de *L. amazonensis*, e determinar a mais potente;
- Determinar o efeito citotóxico dos compostos contra as linhagens eritrocíticas do sangue periférico de humanos saudáveis;
- Determinar o índice de seletividade dos derivados espiro-acridínicos.

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

Os parasitos utilizados durante a pesquisa foram promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). A cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* foi cedida pela Universidade Federal de Brasília (UFB), enviadas junto com os certificados de autenticação para o Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas.

Os parasitos foram cultivados, *in vitro*, em frascos de cultura de células (25 mL) estéreis contendo meio Schneider® com pH 7 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2% de urina humana masculina e 1 % de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL), sendo denominado de meio Schineider suplementado. A incubação das culturas de *L. amazonensis*, foi feita a temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO), e repicadas semanalmente.

4.3 Compostos químicos avaliados

4.3.1 Fármaco de referência

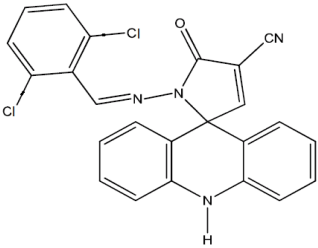
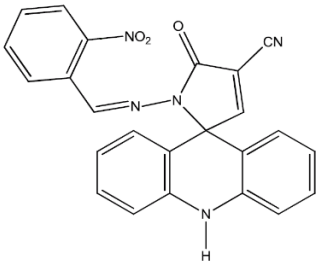
O fármaco de referência utilizado durante os protocolos experimentais de atividade anti-*Leishmania* foi a Anfotericina B® (Anforicin B – Cristália, São Paulo, Brasil). A apresentação da anfotericina B é em pó liófilo em frascos-ampola com 50 mg, dessa forma, foi realizada uma solubilização em DMSO produzindo uma solução-estoque de 10 mg/mL e posteriormente diluída em meios de cultura adequados até atingir as concentrações teste.

4.3.2 Compostos sintéticos derivados espiro-acridínicos

Os compostos utilizados durante os protocolos experimentais foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese e Vetorização De Moléculas, no campus V da Universidade Estadual da Paraíba, coordenado pelo prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

A avaliação da atividade anti-*Leishmania* foi realizada com dois compostos químicos que são derivados espiro-acridínicos, a AMTAC 10 e a AMTAC 13 (Tabela 1). Os derivados possuem solubilidade em DMSO e CH₂Cl₂ (diclorometano), à 25°C e 1 atm. Dessa forma, os compostos foram diluídos com até 0,5% de DMSO, pela ausência de toxicidade nesta concentração. Os derivados espiro-acridínicos foram submetidos a um *screening* inicial pelo método de viabilidade celular através do corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) -2,5-difeniltetrazolio) contra a espécie de *L. amazonensis* e posteriormente à testes de citotoxicidade em eritrócitos.

Tabela 1 – Compostos químicos testes e suas especificações.

Código do composto	Massa molecular (g/mol)	Fórmula molecular	Estrutura química
AMTAC 10	445,3002	C ₂₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O	
AMTAC 13	421,4076	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃	

Fonte: Modificado de ALMEIDA, 2018.

4.4 Atividade anti-*Leishmania* pelo método do MTT

A atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Em placa estéril de 96 poços de fundo reto, foram adicionados promastigotas de *L. amazonensis* obtidas conforme o item 4.2, ajustadas na quantidade de 1×10^6 *Leishmania*/poço, 100 µL de meio schneider suplementado, os compostos teste e o fármaco de referência em diferentes concentrações pré-estabelecidas. Os compostos químicos, foram adicionados em concentrações seriadas de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL, já o fármaco de referência, a Anfotericina B®, foi adicionado em concentrações seriadas de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 3,125; 0,156 e 0,078 µg/mL.

As placas foram incubadas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio na temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 h. Após a incubação, foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 horas e ao final desse período foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de DSS, e deixado em *overnight* para completa dissolução do formazan. Por último foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) a 540 nm. O controle negativo foi realizado com meio schneider suplementado, considerado como 100% de viabilidade dos parasitas, e o controle positivo foi realizado com a Anfotericina B®.

A técnica consiste na conversão do corante acima mencionado em sal de formazan. A partir de reação mitocondrial, os poços contendo coloração mais arroxeadas foram os que demonstraram uma maior conversão ao sal de formazan, por apresentar uma maior concentração de células viáveis promovendo, portanto, valores maiores de absorbância após a leitura em espectrofotômetro na região de 540nm. A atividade anti-*Leishmania* foi expressa em valores de concentração inibitória de 50% (IC₅₀). O experimento foi feito em triplicata em três experimentos independentes.

4.5 Obtenção de células sanguíneas

As células foram obtidas a partir de coleta de amostras de sangue periférico humano (n=3). As amostras foram coletadas de voluntários adultos e saudáveis utilizando material estéril e tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para os ensaios com eritrócitos.

Os indivíduos que contribuíram com a doação de amostras participaram voluntariamente, com prévia assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital universitário Lauro Wanderley (HULW) – CEP/HULW (Número do parecer: 2.560.097 e CAAE: 82944118.5.0000.5188).

4.6 Avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos

A determinação da atividade hemolítica dos derivados espiro-acridínicos foi realizada a partir da coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 5 mL) de voluntários adultos e saudáveis O⁺ (n= 3), utilizando material estéril e colhidos em tubos com anticoagulante EDTA. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, resultando em uma concentração de 5% de eritrócitos. Em seguida, foram adicionadas as concentrações pré-estabelecidas dos compostos químicos teste e da anfotericina B. Os compostos teste foram adicionados em concentrações seriadas de partindo de 400 µg/mL, já o fármaco de referência, a Anfotericina B[®], foi adicionado em concentrações seriadas de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 3,125; 0,156 e 0,078 µg/mL. Em seguida, foram diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em sequência, as suspensões foram centrifugadas com 1000 rpm, por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado e transferidos para placas de 96 poços de fundo reto. Por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) a 540 nm. A ausência de lise (controle negativo) e lise total de glóbulos vermelhos (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), respectivamente. O experimento foi feito em duplicata em 3 experimentos independentes.

4.7 Determinação do índice de seletividade

Partindo dos dados de inibição do crescimento e do ensaio de citotoxicidade frente a eritrócitos humanos, estimou-se, respectivamente, a CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) e CH_{50} (concentração citotóxica para 50% dos eritrócitos) dos compostos ativos testados.

Dessa forma, a partir do resultado do CI_{50} e CH_{50} foi determinado o índice de seletividade. O IS é um indicativo *in vitro* de quantas vezes uma substância é mais seletiva para o parasito (*Leishmania*) do que para a célula humana, sendo determinado pela razão entre a CH_{50} e CI_{50} .

4.8 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes, e foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). A concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) foi calculada usando curvas dose-resposta e intervalos de 95% de confiança foram incluídos. O valor de CI_{50} (concentração da droga capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50%) foi calculado com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida por um pós-teste Tukey, tomando um valor de $p < 0,05$ como o nível mínimo necessário para a significância estatística.

Resultados

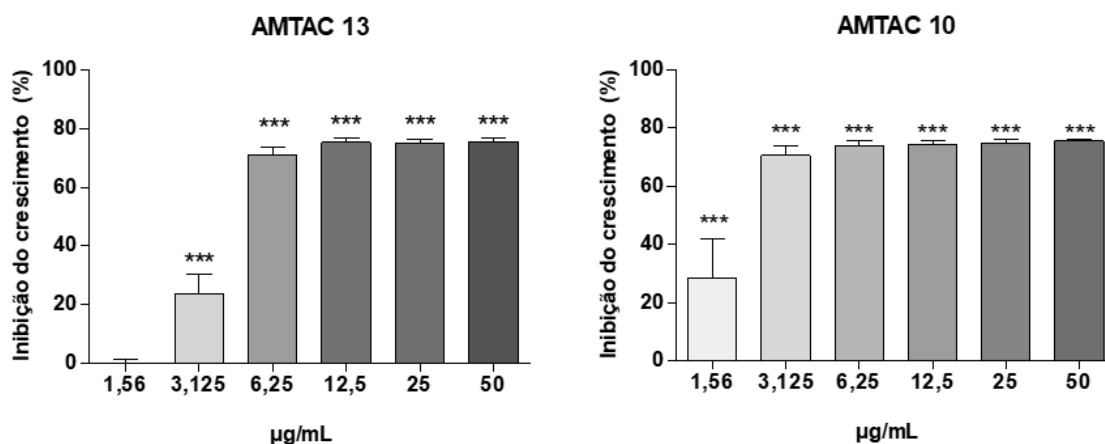
5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* pelo método do MTT

A atividade anti-*Leishmania* foi avaliada através de ensaios *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, responsável pela manifestação cutânea da leishmaniose no Brasil. Foram avaliados dois derivados espiroacridínicos, que demonstraram ser efetivos em inibir o crescimento do parasito nas concentrações avaliadas.

Após a cultura de *L. amazonensis* foram realizadas diluições da AMTAC 10 e AMTAC 13, obtendo concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg/mL, e através do protocolo descrito anteriormente foi realizado o teste pelo método do MTT, contra a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, e para determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitas. De acordo com os dados obtidos no teste *in vitro* dos compostos AMTAC 10 e AMTAC 13 contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, a porcentagem média de inibição do crescimento celular em 72h, em relação ao controle (0% de inibição crescimento), nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg/mL, foi respectivamente de 75,5%, 74,8%, 74,2%, 73,8%, 70,5%, e 28,5% para a AMTAC 10, e de 75,7%, 75,12%, 75,3%, 71,3%, 23,7%, e 0,1% para a AMTAC 13 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Citotoxicidade em formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença do composto químico AMTAC 10 e AMTAC 13.



Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH7 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos AMTAC 10 e AMTAC 13 a 37 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider pH 7 e 20% de SFB) como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey para comparação entre os grupos, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em comparação ao controle. Fonte: Elaboração própria.

Dessa forma, foi possível calcular para a AMTAC 10 uma CI_{50} de $2,910 \pm 1,664 \mu\text{g/mL}$ ($6,5 \pm 3,74 \mu\text{M}$) e para a AMTAC 13 uma CI_{50} de $6,370 \pm 2,035 \mu\text{g/mL}$ ($15,1 \pm 4,83 \mu\text{M}$) (Tabela 2).

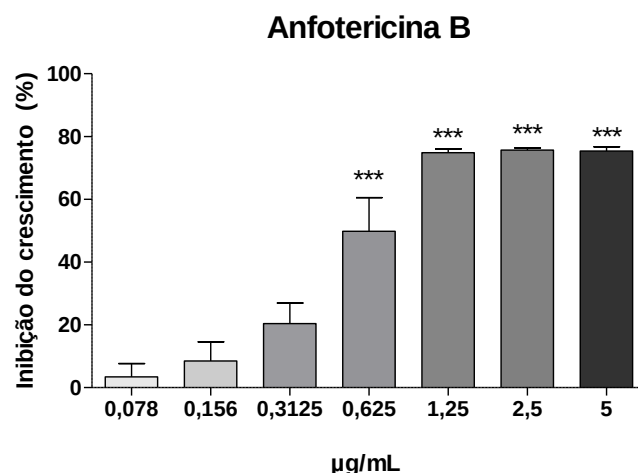
Tabela 2 - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *L. amazonensis* após 72 h de incubação com os compostos AMTAC 10 e AMTAC 13.

Compostos	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)
AMTAC 10	$2,91 \pm 1,664$	$6,5 \pm 3,74$
AMTAC 13	$6,37 \pm 2,035$	$15,1 \pm 4,83$

Os valores representam a média da CI_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0. Fonte: Elaboração própria.

Em relação a atividade do fármaco de referência, anfotericina B, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, os dados estão representados no Gráfico 2 e na Tabela 3, podendo observar que nas concentrações testadas ocorreu uma inibição do crescimento do parasita em relação ao controle (0% de inibição do crescimento). A anfotericina B apresentou uma porcentagem média de inibição do crescimento de 75,4%, 75,6%, 74,8%, 49,8%, 20,4%, 8,4% e 3,4%. Assim, foi possível calcular para a anfotericina B uma CI_{50} de $0,8255 \pm 0,03882 \mu\text{g/mL}$ ($0,88 \pm 0,042 \mu\text{M}$).

Gráfico 2 – Citotoxicidade em formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença do fármaco de referência anfotericina B.



Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH7 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações do fármaco de referência anfotericina B a 37 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5% em meio Schneider pH 7 e 20% de SFB) como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Turkey para comparação entre os grupos, sendo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação ao controle. Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *L. amazonensis* após 72 h de incubação com os fármacos de referência.

Compostos	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	
	CI_{50} (µg/mL)	CI_{50} (µM)
Anfotericina B	0,82 $\pm$ 0,03882	0,88 $\pm$ 0,042

Os valores representam a média da CI_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0. Fonte: Elaboração própria.

5.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos AMTAC 10 e AMTAC 13 e do fármaco de referência sobre eritrócitos humanos

Os derivados acridínicos foram submetidos a testes de citotoxicidade para verificar sua capacidade em causar lise aos eritrócitos humanos. Os dados obtidos sobre essa citotoxicidade são imprescindíveis para fazer a correlação entre a citotoxicidade *in vitro* com danos celulares *in vivo*, baseados em lesão ou

formação de poros na membrana plasmática dos eritrócitos. Os resultados demonstraram um nível de segurança elevado da droga frente a este parâmetro, visto que a concentração que lisa 50% dos eritrócitos é $> 400 \mu\text{g}/\text{mL}$. Essa concentração é maior que as utilizadas no teste, ou seja, não foi observado destruição significativa das hemácias nem em altas concentrações dos compostos, o que por sua vez demonstrou vantagem quando comparado aos controles positivos, anfotericina B que apresentou CH_{50} equivalente a $10,31 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração capaz de causar hemólise em 50% das hemácias (CH_{50}) dos compostos teste e os fármacos de referência após 1 h de incubação.

Compostos	Eritrócitos	
	$\text{CH}_{50} (\mu\text{g}/\text{mL})$	$\text{CH}_{50} (\mu\text{M})$
AMTAC 10	> 400	$> 898,2$
AMTAC 13	> 400	> 949
Anfotericina B	10,31	11,15

Os valores representam a média da CH_{50} calculada em ao menos três experimentos independentes $\pm$ erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0. Fonte: Elaboração própria.

5.3 Determinação do índice de seletividade

Os índices de seletividades dos derivados espiro-acridínicos e do fármaco de referência foram calculados a partir dos dados de inibição do crescimento e do ensaio de citotoxicidade frente à eritrócitos humanos, em que foi estimado, respectivamente, a CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento das formas promastigotas do parasita) e a CH_{50} (concentração citotóxica para 50% dos eritrócitos). O índice de seletividade é um indicativo *in vitro* se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito do que para a célula humana eritrocitária (IS_H), sendo determinado pela razão entre a CH_{50} e CI_{50} .

Os resultados estão demonstrados na Tabela 5 e mostram que a AMTAC 10 teve uma seletividade de 137,46, e a AMTAC 13 de 62,8. Já a anfotericina B resultou em IS_e de 12,6. Dessa forma, há uma maior seletividade dos derivados

AMTAC 10 e AMTAC 13 para as espécies de *L. amazonensis* do que para as células sanguíneas em comparação ao fármaco de referência, denotando maior segurança no uso dos derivados espiro-acridínicos.

Tabela 5 – Atividade anti-*Leishmania*, efeitos citotóxicos contra eritrócitos humanos e índice de seletividade dos compostos teste e do fármaco de referência Anfotericina B.

Compostos	Eritrócitos	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	Índice de seletividade
	HC ₅₀ (µg/mL ⁻¹)	Cl ₅₀ (µg/mL ⁻¹)	IS _e (CH ₅₀ /Cl ₅₀)
AMTAC 10	> 400	2,91	137,46
AMTAC 13	> 400	6,37	62,8
Anfotericina B	10,31	0,82	12,6

Os valores representam a média para cada condição em µg/mL⁻¹, calculada em ao menos três experimentos independentes ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0. Fonte: Elaboração própria.

Discussão

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas uma das principais doenças tropicais negligenciadas, e embora seja uma doença que possui tratamento, continua sendo uma das principais causas de mortalidade entre as populações mais pobres do mundo (MAHAJAN et al., 2018). As terapias disponíveis para essas infecções por possuírem algumas repercussões negativas relativas aos efeitos colaterais e alta toxicidade, aliado a baixa oferta de novas drogas que são limitadas pelo investimento insuficiente representam um quadro preocupante a nível global. Diante de um quadro alarmante como esse, se faz necessário um desenvolvimento contínuo de melhores alternativas para o tratamento, como a pesquisa de novas moléculas com atividade anti-*Leishmania* (DI GIORGIO et al., 2005; DI GIORGIO et al., 2007).

Devido à sua rápida replicação, os protozoários da família *Trypanosomatidae* mostraram muitas semelhanças com células tumorais e vários compostos ativos derivados da acridina inibem a proliferação dessas células (DI GIORGIO et al., 2007; SERAFIM et al., 2018). Diante disso, os derivados da acridina foram testados os derivados espiro-acridínicos, quanto a sua capacidade anti-*Leishmania*.

Os compostos avaliados mostraram diferentes graus de inibição do crescimento das formas promastigotas do parasita. A AMTAC 10 possui uma concentração inibitória mínima de $2,91 \pm 1,664 \mu\text{g/mL}$ ($6,5 \pm 3,74 \mu\text{M}$) para *L. amazonensis*, já a AMTAC 13 possui uma concentração inibitória mínima de $6,37 \pm 2,035 \mu\text{g/mL}$ ($15,1 \pm 4,83 \mu\text{M}$). Esses resultados indicam que mesmo para o mais alto valor de CI_{50} , os derivados espiro-acridínicos demonstraram resultados promissores. As diferenças de valores de CI_{50} entre os candidatos a fármacos indicam variações moleculares de interação entre a droga e o parasita ou alterações na própria biologia do microrganismo que determina uma maior ou menor resistência intrínseca aos compostos ativos.

Ao observar os resultados da atividade leishmanicida obtidos, considerando a diferença estrutural entre os compostos ativos testados, pode-se dizer que a atividade biológica melhora quando estão presentes grupos doadores de elétrons, como os presentes na AMTAC 10, e a atividade diminui quando estão presentes grupos retiradores de elétrons (GRE).

Estudos já demonstraram a atividade de derivados acridínicos sobre *Leishmania*, como o trabalho desenvolvido por Di Georgio e colaboradores (2007), onde foram testados derivados da acridina que demonstram ter atividades antiproliferativas contra promastigotas de *L. infantum*, enquanto, Mahajan e colaboradores (2018) avaliaram compostos 7-arilbenzo [c] acridina-5,6-dionas, em que sete compostos exibiram excelente atividades contra *L. donovani*, com diferentes valores de CI_{50} .

Em outro estudo, as atividades antiproliferativas dos derivados acridínicos também foram avaliados por Serafim e colaboradores (2018), onde derivados híbridos tiofênicos-acridínicos, ACS₀₁ e ACS₀₂ foram testados sobre cepas de *L. amazonensis* em sua forma promastigota. Os resultados da atividade biológica mostraram uma boa atividade anti-*Leishmania* com IC_{50} de 9.60 ± 3.19 e 10.95 ± 3.96 μM , respectivamente. Estes estudos colaboram com os resultados que encontramos, demonstrando que os derivados da acridina podem ser excelentes candidatos com potencial terapêutico no tratamento de doenças parasitárias.

Em relação ao fármaco de referência, a anfotericina B foi mais eficaz e apresentou CI_{50} menor do que os derivados espiro-acridínicos que foram testados. Entretanto, esse fármaco apresenta diversos efeitos colaterais, o que limita o seu uso no tratamento das leishmanioses, sendo uma droga de segunda escolha. Esse resultado reforça o potencial anti-*Leishmania* dos derivados espiro-acridínicos.

A maior atividade antipromastigota da Anfotericina B em relação a derivados da acridina já foi demonstrado em outros estudos (ROCHA et al., 2018). Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, em que já foi relatado que este fármaco apresenta maior citotoxicidade sobre as formas promastigotas de *Leishmania sp.* (DI GIORGIO et al., 2007; SOUSA et al., 2020).

Mediante aos achados sobre a atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, fez-se necessário investigar a atividade citotóxica desses derivados AMTAC 10 e AMTAC 13 sobre eritrócitos humanos, a fim de obter compostos ativos que não sejam tóxicas para os humanos.

Os testes de toxicidade *in vitro* compreendem a investigação dos efeitos danosos dos compostos testados, bem como de mecanismos de toxicidade associados a esse efeito. O principal objetivo destes estudos é determinar a

segurança do composto antes que ele esteja disponível para uso em testes clínicos (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017). Dessa forma, foram realizados ensaios de citotoxicidade para eritrócitos humanos, através da atividade hemolítica com o auxílio do MTT.

A citotoxicidade da AMTAC 10 e AMTAC 13 foi avaliada sobre os eritrócitos humanos, seguindo o protocolo de atividade hemolítica e viabilidade celular por MTT, revelando uma segurança dessas moléculas com uma $CH_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$, esses valores podem ser ainda maiores, visto que não foi avaliado concentrações maiores do que $400 \mu\text{g/mL}$.

A anfotericina B obteve toxicidade sobre glóbulos vermelhos, com CH_{50} de $10,31 \mu\text{g/mL}$. Esse fármaco é muito utilizado no tratamento das leishmanioses, um dos seus efeitos tóxicos é promover hemólise, as quais já foram relatadas em outros estudos (ROCHA et al., 2016). Por isso a importância da avaliação desse efeito adverso na avaliação de compostos ativos que são promissores para o tratamento das leishmanioses.

Após a determinação da atividade dos derivados espiro-acridínicos contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e os efeitos citotóxicos sobre os glóbulos vermelhos humanos, foi possível calcular o IS dessas moléculas.

O IS_e é um método para avaliar se a molécula que foi testada é mais seletiva para o parasito do que para a célula humana, revelando o nível de segurança *in vitro* desses compostos. Esse índice é calculado através da razão dos parâmetros de citotoxicidade (CH_{50}) sobre a atividade anti-*Leishmania* (CI_{50}). O ideal para que um composto possa ser considerado protótipo de um novo fármaco, é que seu índice de seletividade seja alto (DON; IOSET, 2014).

Em relação aos glóbulos vermelhos, foi observado um nível de segurança elevado, com um IS_e de 137,46 para a AMTAC 10 e de 62,8 para a AMTAC 13. Esses resultados foram bastante satisfatórios quando comparados ao fármaco de referência que foi de 12,6. Em linhas gerais, os derivados espiro-acridínicos demonstraram níveis de seletividade para os glóbulos superiores aos índices apresentados pela anfotericina B.

Os resultados apresentados indicam que os compostos AMTAC 10 e AMTAC 13 são seguros *in vitro*, por apresentarem uma maior seletividade para as promastigotas de *L. amazonensis* do que para os glóbulos vermelhos humanos. Essa segurança é expressa diante das concentrações utilizadas em

cada teste, podendo ser ainda maiores, caso sejam avaliadas concentrações maiores. Isso representa um grande avanço na avaliação desses derivados espiro-acridínicos como promissores para o tratamento das leishmanioses.

Experimentos futuros empregando técnicas de biologia molecular aliados a ensaios *in vivo* poderão confirmar a citotoxicidade. Sendo assim, estes compostos ativos se tornam candidatos para pesquisas mais aprofundadas na busca de um novo agente com atividade anti-*Leishmania*.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

As limitações no que se diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas é um grande limitante para obtenção de fármacos mais potentes e menos tóxicos para o tratamento da leishmaniose. Nesse sentido, esse trabalho objetivou avaliar compostos derivados da acridina, que já demonstraram diversas atividades biológicas.

Em suma, os compostos oriundos da reação de espiralização de acridinas, a AMTAC 10 e AMTAC 13, demonstraram uma boa atividade anti-*Leishmania* contra as formas infectantes do protozoário *L. amazonensis*, causador da leishmaniose tegumentar, que é a forma mais comum da doença, considerada endêmica e negligenciada em nosso país, e que, portanto, necessita de incremento no arsenal terapêutico visto que as terapias atuais são demasiadamente agressivas. Em seguida, realizou-se testes de atividade citotóxica onde os derivados espiro-acridínicos estudados demonstraram não possuir ação tóxica aos glóbulos vermelhos, já o fármaco de referência, Anfotericina B apresentou ação tóxica em concentrações mais baixas.

Esses dados demonstraram que o uso dos derivados acridínicos representa uma grande vantagem frente a terapia de referência usada como parâmetro comparativo. Contudo são necessários testes posteriores para a avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico, além da avaliação de um possível mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. PLoS neglected tropical diseases. V. 10, n. 3, 2016.
- ALCOLEA, P. J.; ALONSO A.; MOLINA R.; JIMÉNEZ M.; MYLER P. J.; LARRAGA V. Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. PLoS neglected tropical diseases. V. 13, n. 5, 2019.
- ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, W. L.; SERAFIM, V. L.; MENEZES, T. M.; NEVES, J. L.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; JÚNIOR, L. B. C.; LIMA, M. C. A. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. International Journal of Biological Macromolecules. 2016.
- ALMEIDA, F. S. Estudo *in silico* com possíveis alvos terapêuticos e *in vitro* anti-leishmania de derivados espiro-acridínicos. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas, 2018.
- BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C.; AMORIM, M. F.; RODRIGUES, Y. K. S.; ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Design synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. Bioorganic and Medicinal Chemistry. V. 19, p. 4250-4256, 2011.
- BATES, P. A. "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." International journal for parasitology. V. 37, n. 10, p. 1097-106, 2007.
- BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now?. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. V. 7, p. 139-169, 2007.
- BERGER, K. E.; MCCORMICK, G. M.; JAYE, J. A.; ROZESKE, C. M.; FORT, E. H. Synthesis of Acridines through Alkyne Addition to Diarylamines. Molecules. V. 23, n. 11, p. 2867, 2018.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A.; COOMBS, G. H.; & Mottram, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. International journal for parasitology. V. 37, n. 10, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Revista de Saúde Pública. V. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

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

BRUNTON, LAURENCE L. et al. GOODMAN & GILMAN: AS BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA. 12^a Edição. Porto Alegre (RS): Mc Graw Hill/Artmed, 2012.

BUBLITZ, D. C.; POCHÉ, R. M.; GARLAPATI, R. Measures to Control *Phlebotomus argentipes* and Visceral Leishmaniasis in India. Journal Arthropod-Borne Diseases. V. 10, n. 2, p. 113–126, 2016.

BURZA S.; CROFT S. L.; BOELAERT M. Leishmaniasis. The Lancet. V. 392, p. 951-970, 2018.

CARVALHO, S. H.; FRÉZARD, F.; PEREIRA, N. P.; MOURA, A. S.; RAMOS, L. M. Q. C., CARVALHO, G. B.; ROCHA M. O. C. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. Tropical Medicine & International Health. V. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO DA SILVA, A. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. Frontiers in immunology. V. 5, n. 480, 2014.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. The Lancet. V. 375, p. 239–247, 2010.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. Clinical microbiology reviews. V. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

DATASUS – TabNet, Epidemiológicas e Morbidade - Doenças e Agravos de Notificação – De 2007 em diante (SINAN). 2020. Disponível em < <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892192&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishv> >. Acessado em 10 de março de 2020.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*. V. 7, p. 1703-1724, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. V. 27, p. 305–423, 2004.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; FILLOUX, N.; ROBIN, M.; SEFERIAN, L.; AZAS, N.; GASQUET, M.; COSTA, M.; TIMON-DAVID, P.; GALY, J. P. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. V. 47, n. 1, p. 174–180, 2003.

DI GIORGIO, C.; MEO, M.; CHIRON, J.; DELMAS, F.; NIKOYAN, A.; JEAN, S.; DUMENIL, G.; TIMON-DAVID, P.; GALY, J.-P. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. V. 13, p. 5560–5568, 2005.

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

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. V. 141, n. 01, p. 140-146, 2014.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. V. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; PETR V. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*. V. 5, n. 276, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*. V. 5, n. 276, 2012.

DOUGALL, A. M.; ALEXANDER, B.; HOLT, D. C.; HARRIS, T.; SULTAN, A. H.; Vidence Incriminating Midges (Diptera: Ceratopogonidae) as Potential Vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*. V. 41, p. 571-579, 2011.

FANG, L.; APPENROTH, D.; DECKER, M.; KIEHNTOPF, M.; ROEGLER, C.; DEUFEL, T.; FLECK, C.; PENG, S.; ZHANG, Y.; LEHMANN, J. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. *Journal Medicinal Chemistry*. V. 51, n. 4, p. 713-6, 2008.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*. V. 2, p. 11–19, 2012.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of translational internal medicine*. V. 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug design, development and therapy*. V. 12, p. 25–40, 2017.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, E. J. ARMSTRONG, A. W. *Principios de farmacologia – A base fisiopatológica da farmacologia*. 3º Edição, 2016.

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. V. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics*. V. 26, p. 293-307, 2012.

HOOJA, S.; SHARMA, B.; JINDAL, A.; VYAS, N. First reported cases of diffuse cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus positive patients in Jaipur District of Rajasthan, India. *Tropical Parasitology*. V. 4, n. 1, p. 50–52, 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in Parasitology*. V. 22, n. 9, 2006.

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

KLATT, S.; SIMPSON, L.; MASLOV, D. A.; KONTHUR, Z. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS neglected tropical diseases*. V. 13, n. 7, 2019.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A Versatile Heterocyclic Nucleus. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. V. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

LAISON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their Discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de saúde*. V. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LEE, S. J.; SILVERMAN, E.; BARGMAN, J. M. The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology*. V. 7, n. 12, p. 718–729, 2011.

LISBOA, T.; SILVA, D.; DUARTE, S.; FERREIRA, R.; ANDRADE, C.; LOPES, A. L.; RIBEIRO, J.; FARIAS, D.; MOURA, R.; REIS, M.; MEDEIROS, K.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene-Acridine Hybrid. *Molecules*. V. 25, n. 1, p. 64, 2019.

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

MANJOLIN, L. C.; REIS, M. B.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS FILHO, O. A.; SILVA, E. R.: Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Food Chemistry*. V. 141, 2013.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil Visceral/Visceral leishmaniasis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. V. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADON, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*. V. 27, p. 123–147, 2013.

MARTINEZ R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal brasileiro de pneumologia*. V. 32, n. 5, 2006.

MARTINS-MELO, F. R.; CARNEIRO, M.; RAMOS, A. N.; HEUKELBACH, J.; RIBEIRO, A.; WERNECK, G. L. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS neglected tropical diseases*. V. 2, n. 6, 2018.

MAY, B. C.; WITKOP, J.; SHERRILL, J.; ANDERSON, M. O.; MADRID, P. B.; ZORN, J. A.; PRUSINER, S. B.; COHEN, F. E.; GUY, R. K. Structure-activity relationship study of 9-aminoacridine compounds in scrapie-infected neuroblastoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett*. V. 16, n. 18, p. 4913-6, 2006.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. V. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J.: Does the *Leishmania* major Paradigm of Pathogenesis and Protection Hold for New World Cutaneous Leishmaniasis or the Visceral Disease?. *Immunological Reviews*. V. 201, n. 1, p. 206–224, 2004.

MENEZES, T. M.; ALMEIDA, S. M. V.; MOURAC, R. O.; SEABRA, G.; LIMA, M. C. A.; NEVES, J. L. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: kinetic, proteinligand interaction and molecular docking studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019.

MESA, C.; RODRIGUEZ-CABEZAS, N.; CASTILLA, J. J.; MORALEDA-LINDEZ, V.; BARBE, J.; SANCHEZ-MORENO, M.; OSUNA, A. In vitro and in vivo Activities of Three Acridine Thioethers against *Leishmania donovani*. *Pharmacology*. V. 65, p. 74–82, 2002.

MINODIER P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*. V. 5, p. 150–158, 2007.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. *Tropical medicine and infectious disease*. V. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the Origin and Evolution of the Genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 95, n. 4, p. 583-588, 2000.

MUNSTERMANN L. E. Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*. Ed. 30, 2019.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. V. 366, p. 1561–77, 2005.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Americas Nº 8 – dezembro de 2019. Disponível em < http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y >. Acessado em: 15 de fevereiro de 2020.

PATEL, B. B.; PATEL, R. G.; PATEL, M. P. Synthesis and biological activity of novel pyrimido fused acridine derivatives. *Journal of the Serbian Chemical Society*. V. 71, n. 10, p. 1015-1999, 2006.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; JÚNIOR, F. E. F. L. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. V. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PISCOPO, T. V.; MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*. V. 83, n. 976, p. 649–657, 2007.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS M. N.; MARZAL, P. C.; JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*. V. 26, n. 4, 2003.

REITHINGER R.; DUJARDIN J. C.; LOUZIR H.; PIRMEZ C.; ALEXANDER B.; BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*. Vol. 7, pág. 581-596, 2007.

RIZK, Y. S.; FISCHER, A.; CUNHA, M. C.; RODRIGUES, P. O.; MARQUES, M. C. S.; MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C. R. T.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. P. In vitro activity of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. V. 109, n. 8, p. 1050-1056, 2014.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. Parasites & vectors. V. 9, n. 118, 2016.

ROCHA, J. C.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N.; SILVA, L. V.; ALMEIDA, F. S.; LIMA, V. S.; PEIXOTO, R. F.; ROCHA, J. C., AZEVEDO F. L. A. A.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, W. A. V.; LIMA-JUNIOR C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; AMARAL, I. P. G.; OLIVEIRA, M. R.; KEESEN, T. S. L. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-*Leishmania* activity and cytotoxicity. Parasitology Research. V. 10, p. 3067-3076, 2019.

RODRIGUES, V.; SILVA, A. C.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. Parasites & Vectors. V. 9, n. 118, 2016.

SERAFIM, V. L.; FÉLIX, M. B.; SILVA, D. K. F.; RODRIGUES, K. A. F.; ANDRADE, P. N.; ALMEIDA, S. M. V.; SANTOS, S. A.; OLIVEIRA, J. F.; LIMA, M. C. A.; MENDONÇA-JUNIOR F. J. B.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, M. R.; MOURA, R. O. New thiophene-acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. Chemical Biology & Drug Design. V. 91, n. 6, p. 1141–1155, 2018.

SILVA, M. M.; MACEDO, T. S.; TEIXEIRA, H. M. P.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; PEREIRA, A. L. C.; SERAFIM, V. L.; MENDONÇA-JUNIOR F. J. B.; LIMA, M. C. A.; MOURA, R. O.; SILVA-JÚNIOR, E. F.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; DANTAS, M. D. A.; NASCIMENTO, E. O. O.; MACIEL, T. M. S.; AQUINO, T. M.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C.C. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. Journal of Photochemistry and Photobiology Biology. 2018.

SILVA, D.; DUARTE, S. S.; LISBOA, T.; FERREIRA, R. C.; LOPES, A.; CARVALHO, D.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; SILVA, P. M.; SEGUNDO, M.; MOURA, R. O.; MEDEIROS, K.; SOBRAL, M. V. Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action. Molecules. V. 25, n. 1, 2019.

SONDHI, S. M.; SINGH, J.; RANI, R.; GUPTA, P. P.; AGRAWAL, S. K.; SAXENA, A. K. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. V. 45, n. 2, p. 555-563, 2010.

SOUSA, G.; LIMA, W. G.; SANTOS, F. J.; MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J.; TEIXEIRA-NETO, R. G.; SIQUEIRA, J. M.; SILVA, E. S. Toxicity and Antipromastigote Activity of Benzoxazinoid Analogs Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum*. Advanced pharmaceutical bulletin. V. 10, n. 1, p. 119–124, 2020.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. Parasit Vectors. V. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. Expert opinion on pharmacotherapy. V. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. Parasitology. V. 145, n. 4, p. 481–489, 2018.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding [published correction appears. Open Biology. V. 7, n. 9, 2017.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA T.; FILHO B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent Advances in Leishmaniasis Treatment. International Journal of Infectious Diseases, V. 15, p. e525–e532, 2011.

TORRES, F. D.; ANDRADE, A. J.; TENORIO, K. E. R.; FILHO, J. D. A.; BALBINO, V. Q.; FILHO, S. P. B. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V. 43, n. 6, p. 733-736, 2010.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. F1000Research. V. 6, 2017.

VAN HENTEN, S.; ADRIAENSEN, W.; FIKRE, H.; AKUFFO, H.; DIRO, E.; HAILU, A.; VAN DER AUWERA, G.; VAN GRIENSVEN, J. Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania aethiopica*. EClinicalMedicine. V. 6, p. 69-81, 2019.

VÉLEZ, I. D.; JIMÉNEZ, A.; VÁSQUEZ, D.; ROBLEDO, S. M. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. Case Reports in Dermatology. V. 7, n. 3, p. 275–286, 2015.

VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. PVPE, V. 1, p. 1-7, 2017.

WHO - World Health Organization. Neglected tropical diseases - Neglected tropical diseases course now accessible via eLearning. 2017. Disponível em < https://www.who.int/neglected_diseases/news/NTD_course_now_accessible_via_eLearning/en/ > Acessado em: 15 de fevereiro de 2020.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis: Key facts. 2019a. Disponível em < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> >. Acessado em 15 de fevereiro de 2020.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological situation. 2019b. Disponível em < <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acessado em 15 de fevereiro de 2020.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. Der Chirurg. V. 90, p. 833–837, 2019.

WOZNIACKA, A.; CARTER, A.; MCCAULIFFE, D. P. Antimalarials in cutaneous lupus erythematosus: mechanisms of therapeutic benefit. LUPUS. V. 11, n. 2, p. 71–81, 2002.

YAN, H.; BIAN, A.; GAO, X.; LI, H.; CHEN, Z.; LIU, X. Novel applications for an established antimalarial drug: tumoricidal activity of quinacrine. Future Oncology. 2018.