



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR MOLECULAR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-
ACRIDÍNICOS SOBRE *LEISHMANIA INFANTUM***

PÂMELA GABRIELLA RODRIGUES DAS NEVES

JOÃO PESSOA – PB
2021

PÂMELA GABRIELLA RODRIGUES DAS NEVES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE
COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-
ACRIDÍNICOS SOBRE *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Profa. Dr^a Juliana Franco Almeida

Co-orientadora: Profa. Dr^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA-PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N518a Neves, Pâmela Gabriella Rodrigues das.
Avaliação in vitro da atividade anti-leishmania de
compostos sintéticos derivados
tiossemicarbazônicos-acridínicos sobre leishmania
infantum / Pâmela Gabriella Rodrigues das Neves. - João
Pessoa, 2021.
68 f. : il.

Orientação: Juliana Franco Almeida.
Coorientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Leishmaniose. 2. Derivados
tiossemicarbazônicos-acridínicos. 3. Citotoxicidade. I.
Almeida, Juliana Franco. II. Clemente, Tatjana Keesen
de Souza Lima. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.993.161(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



PÂMELA GABRIELLA RODRIGUES DAS NEVES

Dissertação de Mestrado avaliada em 19/02/2021

BANCA EXAMINADORA

(Assinado digitalmente em 23/02/2021 14:43)

JULIANA FRANCO ALMEIDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1110112

Profa. Dra. Juliana Franco Almeida
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-UFPB
Orientadora/Presidente

(Assinado digitalmente em 23/02/2021 08:43)

IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2016711

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas-UFPB
Examinador Externo

(Assinado digitalmente em 22/02/2021 18:20)

ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-UFPB
Examinador Interno

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas a mim no decorrer desses anos, por ter me dado bom ânimo, sabedoria, discernimento em minhas decisões, coragem e força que me fizeram alcançar e realizar mais um dos meus ideais, sem Deus eu nada sou e para Ele o meu maior agradecimento.

Gratidão aos meus pais Alexandre Rodrigues e Josenilda Ramos e aos meus irmãos Poliana Ramos, Pedro Gabriel e Alexandre Filho pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim, vocês são os meus maiores exemplos de perseverança. Sem o apoio de vocês essa conquista não seria possível. Eu os amo demais!

Ao meu amigo, companheiro, meu amado Gabriel Cortez, por ser um ponto de equilíbrio nos meus momentos de apherio, por todo amor, carinho e paciência, durante esses anos. Gratidão pelo companheirismo e compreensão.

Aos meus familiares e amigos generosos que sempre me apoiaram de todas as maneiras possíveis e procuraram me ajudar de alguma forma para que hoje eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida. Ah, se vocês soubessem da importância que vocês têm para mim... Amo vocês.

À Profa. Dr^a Juliana Franco Almeida por ter aceitado ser minha orientadora e pelos ensinamentos partilhados comigo.

Agradeço especialmente a minha co-orientadora professora Dr^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, por todos esses anos de orientação, pela oportunidade de compor mais uma vez o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), por compartilhar seus conhecimentos comigo, pela paciência, confiança, críticas e pelo incentivo a sempre buscar conhecimento.

Ao professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura pelo fornecimento das substâncias avaliadas neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, que me ajudaram no decorrer desses anos, pelos momentos de descontração na salinha e pelas amizades conquistadas, agradeço de modo especial à Fernanda, por ter sido uma companheira durante os experimentos e tentar sempre me auxiliar esclarecendo minhas dúvidas.

A todos os professores que compõe o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular - UFPB, pela indiscutível contribuição para minha formação.

Aos colegas da pós-graduação, pela convivência durante o curso das disciplinas do mestrado. Anderson e Marta, gratidão por todas as conversas compartilhadas, pelos debates científicos, pelo auxílio, amizade cultivada no mestrado que levarei sempre comigo.

À Regina Emy pelo auxílio prestado em cada solicitação, informação e dúvidas retiradas. Obrigada por todo profissionalismo.

Enfim, a todos aqueles sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível, minha gratidão.

RESUMO

NEVES, P. G. R. **Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos sobre *Leishmania infantum***. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2021.

A leishmaniose é um importante problema de saúde pública, afetando milhares de pessoas anualmente. O tratamento dessa doença negligenciada apresenta várias limitações, as drogas utilizadas para tratamento dos pacientes possuem alta toxicidade, efeitos adversos graves, difícil administração, e custo elevado. Sendo a terapêutica dessa patologia baseada principalmente na administração de antimoniais pentavalentes, que são utilizados desde 1945. Todos esses problemas resultam na descontinuação do tratamento pelos pacientes e, conseqüentemente surgimento de cepas resistentes. Devido a todas essas dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas, que sejam eficazes contra os parasitos e que não apresentem malefícios para o paciente. Nesse contexto, este trabalho avaliou a atividade anti-*Leishmania* de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e do fármaco de referência, anfotericina B, contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* e a sua citotoxicidade frente a eritrócitos humanos. Os resultados demonstraram que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (GLDL 03 e GLDL 06) e o fármaco de referência, anfotericina B, apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. infantum*, com CI_{50} de 3,512 $\mu\text{g/mL}$, 5,279 $\mu\text{g/mL}$ e 0,955 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os compostos GLDL 03 e GLDL 06 e a anfotericina B, também se mostraram ativos contra as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*, com valores de CE_{50} 6,201 $\mu\text{g/mL}$, 7,550 $\mu\text{g/mL}$, 0,476 $\mu\text{g/mL}$, nesta seqüência. Foi observado que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos possuem atividade biológica anti-*Leishmania* relevante contra as formas celulares do parasita e não apresentaram toxicidade para as células sanguíneas humanas. Visto que esses compostos se apresentaram promissores *in vitro*, cabe a realização de estudos mais detalhados que identifiquem os seus mecanismos de ação e eles possam vir a serem utilizados no tratamento da leishmaniose. Dessa forma, a continuidade de testes que elucidem tais caminhos é de extrema importância na pesquisa de uma doença tão negligenciada.

Palavras-chave: derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos; leishmaniose; citotoxicidade.

ABSTRACT

NEVES, P. G. R. **In vitro evaluation of the anti-*Leishmania* activity of synthetic derivatives acridine-thiosemicarbazone on *Leishmania infantum***. 2021. Dissertation (Post-Graduation in Cell and Molecular Biology). Center for Exact and Nature Sciences , Federal University of Paraíba, João Pessoa – PB, 2021

Leishmaniasis is a major public health problem, affecting thousands of people annually. The treatment of this neglected disease has several limitations, the drugs used for the treatment of patients have high toxicity, severe adverse effects, difficult administration, and high cost. Being the therapy of this pathology mainly based on the administration of pentavalent antimonials, which have been used since 1945. All these problems result in discontinuation of treatment by patients and, consequently, the emergence of resistant strains. Because of all these treatment difficulties and the absence of vaccines, there is urgency in the search for new therapeutic drugs that are effective against parasites and do not present harm to the patient. Therefore, in this work, we evaluated the anti-*Leishmania* activity of derivatives acridine-thiosemicarbazone and the reference drug amphotericin B against promastigote and amastigote forms of *Leishmania infantum* and its cytotoxicity against human erythrocytes. The results showed that the acridine-thiosemicarbazone derivatives (GLDL 03 and GLDL 06) and the reference drug showed activity against promastigotes of *L. infantum*, with CI50 of 3.512 μ g/mL, 5.279 μ g/mL and 0.955 μ g/mL, respectively. The compounds GLDL 03 and GLDL 06 and the amphotericin B were also active against the axenic amastigote forms of *L. infantum*, with values of CE50 6.201 μ g/mL, 7.550 μ g/mL, 0.476 μ g/mL, in this sequence. It was noted these compounds have shown promise in vitro, it is necessary to conduct more detailed studies that identify their mechanisms of action and they can be used in the treatment of leishmaniasis. Owing to these compounds have shown promise in vitro, it is necessary to conduct more detailed studies that identify their mechanisms of action and they can be used in the treatment of leishmaniasis. Thus, the continuity of tests that elucidate such paths is extremely important in the research of a disease so neglected.

Keywords: acridine-thiosemicarbazone derivatives;leishmaniasis;cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANFO B**– Anfotericina B
- BRA**– Brasil
- CE₅₀** – Concentração Dose efetiva 50%
- CH₅₀** – Concentração hemolítica sobre 50% dos eritrócitos
- CI₅₀** – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas
- CO₂**– Dióxido de carbono
- DA** – Doença de Alzheimer
- DACA**– N- [2- (dimetilamino) etil] acridina-4-carboxamida
- DBO**– Demanda biológica de oxigênio
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DSS** – Dodecil Sulfato de Sódio
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EUA** – Estados Unidos da América
- FDA** – Food and Drug Administration
- HepG2**– Carcinoma Hepatocelular Humano
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- IS** – Índice de Seletividade
- LABIDIC** – Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas
- LCD** – Leishmaniose cutânea difusa
- LCL** – Leishmaniose cutânea localizada
- LCPC** – Leishmaniose cutânea pós-calazar
- LD** – Leishmaniose disseminada
- LMA** – Leucemia Mieloide Aguda
- LMC** – Leishmaniose mucocutânea
- LQIT/D01**–2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil) hidrazinacarbotioamida.
- LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV** – Leishmaniose visceral
- m-AMSA** – Amsacrina
- MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil) -2,5-difeniltetrazolio
- NOS2**– Óxido Nítrico Sintase 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Paraíba

PBS – Tampão Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SbIII – Antimônio Trivalente

SbV – Antimônio Pentavalente

SFB – Soro fetal bovino

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TR – Tripanotona Redutase

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNDO.....	17
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO MUNDO.....	18
FIGURA 3 - NÚMERO DE CASOS DE LTA, REGIÕES BRASILEIRAS, 2003- 2018.	18
FIGURA 4- NÚMERO DE CASOS DE LV, REGIÕES BRASILEIRAS , 2003 - 2018.	19
FIGURA 5 - ESPÉCIES DE FLEBÓTOMOS FÊMEAS, VETORES DAS LEISHMANIOSES.	21
FIGURA 6 - CICLO DE VIDA DOS PARASITOS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> SP....	21
FIGURA 7 - RESERVATÓRIOS DO PARASITO <i>LEISHMANIA</i> SP.	23
FIGURA 8 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RESULTANTES DA INFECÇÃO POR ESPÉCIES DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> SP.	26
FIGURA 9 - ESTRUTURA DA ACRIDINA.....	32
FIGURA 10 - ESTRUTURA BÁSICA DO COMPOSTO TIOSSEMICARBAZIDA.....	34
FIGURA 11 - ESTRUTURA BÁSICA DO COMPOSTO TIOSSEMICARBAZONA.....	36
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> SP. QUE PODEM CAUSAR LEISHMANIOSE EM HUMANOS.	22
TABELA 2 - PRINCIPAIS DROGAS UTILIZADAS ATUALMENTE NO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.	29
TABELA 3 - COMPOSTOS QUÍMICOS SUAS RESPECTIVAS NOMENCLATURAS E FÓRMULA MOLECULAR.	41
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS (CI_{50}) DE <i>L. INFANTUM</i> APÓS O PERÍODO 72 H DE TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS GLDL 03 E GLDL 06 E ANFOTERICINA B.	47
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DOSE EFETIVA 50% (CE_{50}) DE AMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> DOS COMPOSTOS GLDL 03 E GLDL 06 E O FÁRMACO DE REFERÊNCIA ANFOTERICINA B.	51
TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO HEMOLÍTICA SOBRE 50% DAS HEMÁCIAS (CH_{50}) DOS COMPOSTOS TESTE E OS FÁRMACOS DE REFERÊNCIA APÓS 1 H DE INCUBAÇÃO.	53
TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DO CRESCIMENTO (CI_{50}) DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> , CONCENTRAÇÃO HEMOLÍTICA SOBRE 50% DAS HEMÁCIAS (HC_{50}) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE ($IS = HC_{50}/IC_{50}$) DE DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS.	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- EFEITO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS GLDL 03, GLDL 06 E O FÁRMACO DE REFERÊNCIA ANFOTERICINA B, SOBRE A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> APÓS 72 H DE TRATAMENTO.	46
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE CELULAR DAS FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>L. INFANTUM</i> NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS QUÍMICOS GLDL 03, GLDL 06 E DO FÁRMACO DE REFERÊNCIA ANFOTERICINA B, APÓS 24 H DE TRATAMENTO.	50

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses.....15

1.2 Espécies e vetores.....19

1.3 Ciclo Biológico de *Leishmania* sp.....20

1.4 Manifestações Clínicas.....23

1.5 O tratamento das leishmanioses.....26

1.6 Derivados Acridínicos.....31

1.7 Tiossemicarbazida.....34

1.8 Tiossemicarbazona.....35

1.9 Derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.....36

2. OBJETIVOS.....38

2.1 Objetivo geral.....38

2.1.1 Investigar a atividade anti-*Leishmania* e citotóxica dos compostos derivados tiossemicarbazônicos acridínicos *in vitro* em cepas de *Leishmania infantum*.....38

2.2 Objetivos específicos.....38

2.2.1 Avaliar a atividade anti-*Leishmania*, em diferentes concentrações, dos compostos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e.....38

2.2.2 Investigar o efeito citotóxico de diferentes concentrações dos compostos derivados tiossemicarbazônicos-acrididínicos sobre eritrócitos humanos.....	38
2.2.3 Determinar o índice de seletividade dos compostos derivados tiossemicarbazônicos- acrididínicos.....	38
3. MATERIAL E METÓDOS.....	39
3.1 Parasitas e manutenção das culturas <i>in vitro</i>	39
3.2 Obtenção das formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	39
3.3 Compostos químicos avaliados.....	40
3.3.1 Fármaco de referência.....	40
3.3.2 Compostos sintéticos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.....	40
3.4 Atividade anti- <i>Leishmania</i> pelo método do MTT.....	41
3.5 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos tiossemicarbazônicos-acridínicos sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	42
3.5 Obtenção de células sanguíneas.....	43
3.6 Avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos.....	43
3.7 Determinação do índice de seletividade dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.....	44
3.8 Análise estatísticas.....	44
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Avaliação da atividade antipromastigota de novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.....	45
4.2 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> do GLDL 03 e do GLDL 06 e o fármaco de referência, anfotericina B, sobre a viabilidade de formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i> após 24h.....	49
4.3 Citotoxicidade em eritrócitos humanos.....	51
4.4 Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	53
5- CONCLUSÃO.....	55
6- REFERÊNCIAS.....	56
7 – ANEXOS.....	68

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES
HUMANOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY.....68

1- INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada que apresenta uma maior incidência em países localizados nas regiões tropicais e subtropicais, causada por aproximadamente 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos fêmeas. É sabido que mais de 90 espécies de flebotomíneos possam transmitir esse parasita. As manifestações clínicas da leishmaniose dividem-se em: Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar, manifestação mais grave da doença, pois, se não tratada pode levar a óbito, e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ou cutânea. As formas tegumentares da doença incluem a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC) (WHO, 2020a; PONTE-SUCRE et al., 2017; MATOS, A. P. S. et al., 2020; ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018, MUKHOPADHYAY, 2014).

A LV também denominada de *Kala-azar* (que significa febre negra em Hindi, devido ao escurecimento da pele que frequentemente acompanha a infecção) é a forma clínica mais grave das leishmanioses, pois se deixada sem tratamento pode resultar em óbito em mais de 95% dos casos. Tem como sintomas principais: crises febris, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. A maioria dos casos são registrados no Brasil, na África Oriental e na Índia. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV são estimados para acontecer em todo o mundo anualmente, sendo apenas 25 a 45% relatados à Organização Mundial da Saúde (OMS). No ano de 2018, mais de 95% dos novos registros de LV relatados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1). O Brasil concentra 99% dos 3.500 casos relatados anualmente na América Latina e, apesar dos números permanecerem estáveis, a doença está se espalhando para o sudeste do país (WHO, 2020a; PALATNIK-DE-SOUSA, CLARISSA B.; NICO, D. 2020; SHOWLER; BOGGILD, 2016).

A LC é a forma clínica mais frequente da leishmaniose e causa lesões na pele, principalmente úlceras, nas partes mais expostas do corpo. Aproximadamente 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio

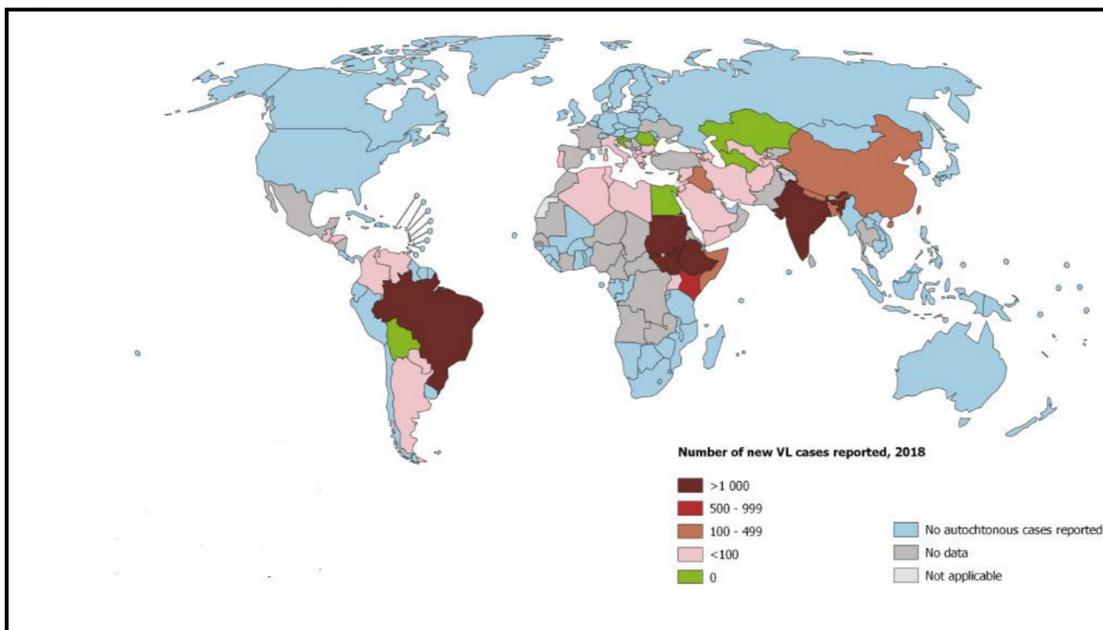
e na Ásia Central. Em 2018, mais de 85% dos novos casos de LC foram registrados em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, Síria e Tunísia (Figura 2). Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram no mundo anualmente. E a LMC que tem como principal característica o acometimento parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta, levando ao aparecimento de úlceras e feridas graves nestes locais. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia (Estado Plurinacional), Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2020a).

A LTA é uma das patologias que acometem a pele, mais preocupantes para a comunidade médica, pois na derme do indivíduo acometido por essa enfermidade são observadas úlceras, lesões nodulares, além da destruição das membranas das mucosas do nariz, boca e garganta, levando a uma desfiguração definitiva, ocasionando em uma estigmatização social dos pacientes. São registrados casos de LTA em todas as unidades federativas brasileiras, no entanto, nas regiões Norte e Nordeste são apresentados o maior número de casos. No período de 2003 a 2018, foram registrados mais de 300.000 casos, com média de 21.158 casos por ano (Figura 3) (BRASIL, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS., 2019). A LV também é um importante problema de saúde pública, pois casos não tratados acarretam uma letalidade de 90%. No Brasil, entre 2003 a 2018, foram confirmados mais de 51 mil casos humanos, com incidência média de 1,7 casos/100 mil habitantes. A região Nordeste apresentou o maior número de casos, no entanto, as maiores incidências são demonstradas na região Norte até o ano de 2012, quando há a inversão para região Nordeste até o ano de 2016, e posterior aumento da incidência novamente na região Norte (Figura 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS., 2019). No estado da Paraíba no período de 2007 a 2019, foram confirmados 826 casos de LTA, enquanto que LV no mesmo período, foram registrados 520 casos. O que evidencia que estado da PB, registra um elevado número de casos da leishmaniose mesmo após os planos de ação e combate a essa patologia, podendo assim, ser considerada uma doença emergente prioritária, sendo necessária maior atenção por parte da vigilância epidemiológica no estado (SINAN, 2020; PARAÍBA, 2019).

As terapias utilizadas no tratamento das leishmanioses variam de acordo com o tipo de manifestação clínica da doença e muitas vezes são guiadas pela prática regional. Os antimoniais pentavalentes são considerados a melhor terapia na leishmaniose, porém, este agente apresenta uma elevada toxicidade e está também está associado ao desenvolvimento da resistência dos parasitas do gênero *Leishmania* a eles. Outros fármacos como a anfotericina B (ANFO B), as pentamidinas, a miltefosina e também são utilizadas no tratamento desta doença

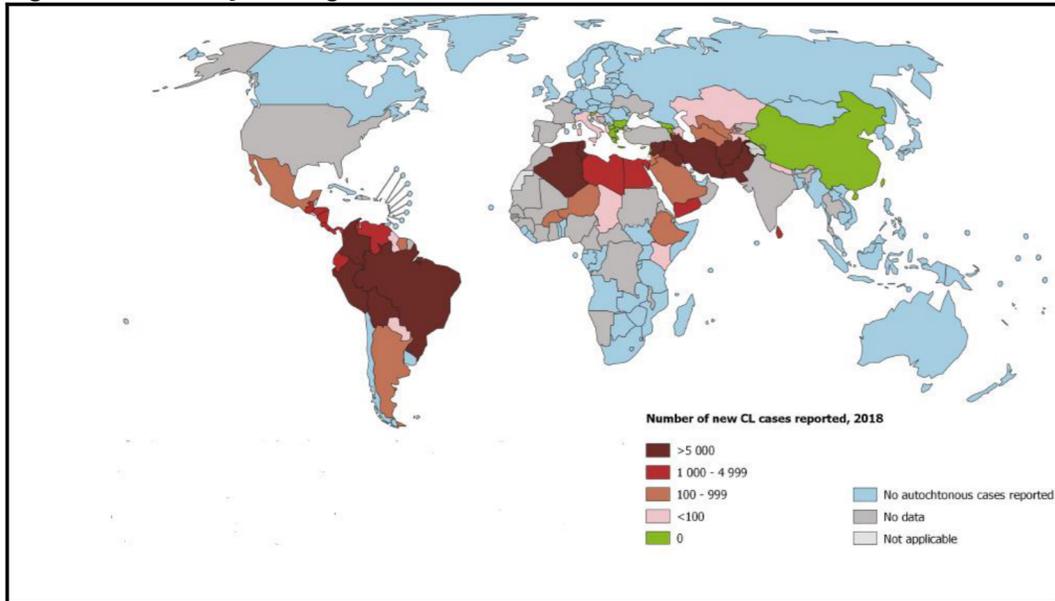
infeciosa (MCGWIRE ; SATOSKAR., 2014 ; CARVALHO et al., 2019; DE MENEZES et al ., 2015). Nesse cenário, é de extrema relevância a busca por compostos que tenham um menor efeito adverso, baixa toxicidade e custo reduzido, e que seja de mais fácil administração, possibilitando melhor qualidade de vida aos pacientes no decorrer do tratamento. Muitos compostos naturais e sintéticos bioativos estão sendo testados nos últimos anos, em ensaios antileishmania. Suas estruturas são diversas e frequentemente tem em seus arranjos anéis aromáticos ligados a átomos de nitrogênio, como quinolinas, pirimidinas, acridinas, fenotiazinas e indóis Os derivados acridínicos já tiveram muitas de suas propriedades farmacológicas descritas na literatura, entre elas, antitumoral, antimalária e até mesmo antileishmania (LISBOA et al., 2019; SILVA et al., 2018; SERAFIM et al., 2018).

Figura 1 - Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral no Mundo.



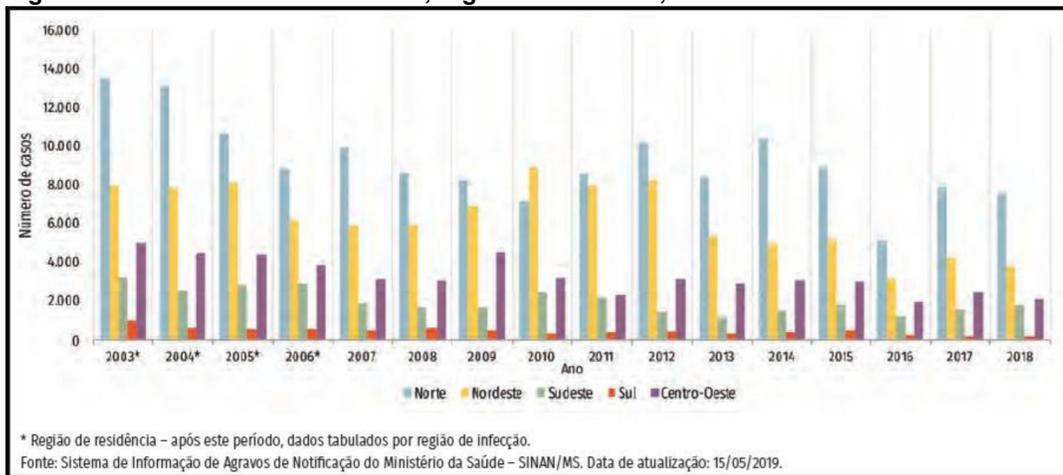
Fonte: Adaptado de WHO, 2020b.

Figura 2 - Distribuição Geográfica da Leishmaniose Cutânea no Mundo.



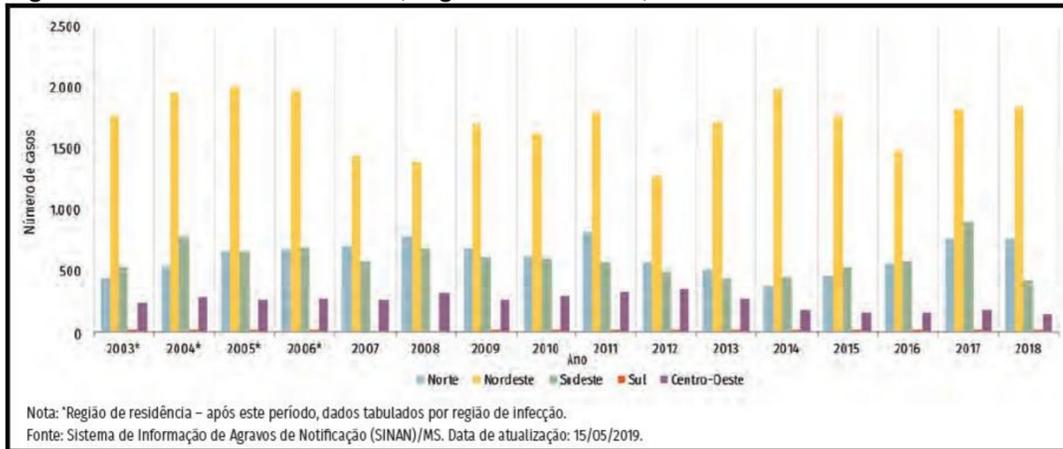
Fonte: Adaptado de WHO, 2020c.

Figura 3 - Número de casos de LTA, regiões brasileiras, 2003- 2018.



Fonte: Boletim Epidemiológico. MS. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019.

Figura 4- Número de casos de LV, regiões brasileiras , 2003 - 2018.



Fonte: Boletim Epidemiológico. MS. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019.

1.2 ESPÉCIES E VETORES

Os protozoários do gênero *Leishmania* sp. estão estabelecidos filogeneticamente na ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, estão inseridas 20 espécies divididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Os dois subgêneros foram divididos de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e por análises filogenéticas (FRAGA et al., 2010). As espécies *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani* são encontradas nos continentes Asiático, Africano e Europeu. No americano, os principais agentes etiológicos são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Tabela 1) (GOTO, LINDOSO, 2010, STEVERDING D., 2017). As espécies do parasito *Leishmania* possuem aspectos específicos quanto aos tipos de manifestações clínicas, vetores, reservatórios e distribuição geográfica. As principais espécies causadoras da leishmaniose no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses*, resultando na manifestação clínica cutânea, enquanto a *L. (L.) infantum* é a responsável pela doença na sua forma clínica visceral (BRASIL, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são heteroxenos, ou seja, eles só completam seu ciclo biológico passando por ao menos dois hospedeiros, e apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é

flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e não possui flagelo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SILVA, 2008). Esses parasitas são transmitidos principalmente através do repasto sanguíneo realizado por insetos fêmeas infectadas da ordem *Diptera*, pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, denominados de flebotomíneos (KATO et al., 2010).

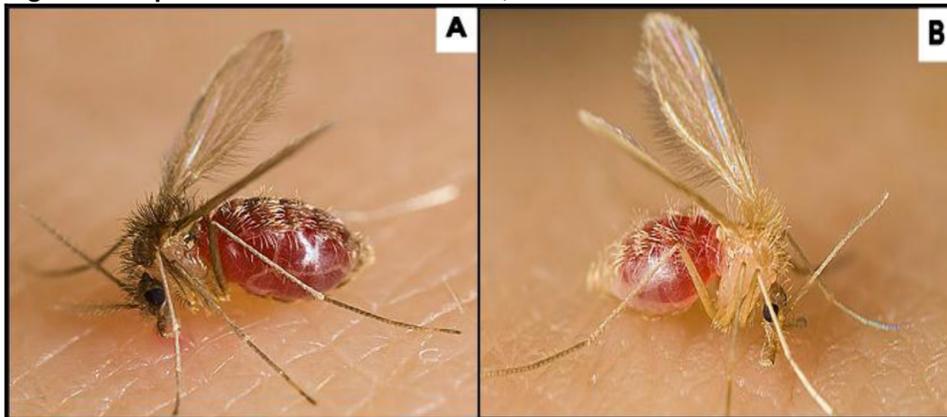
As fêmeas dos flebotomos são hematófagas, porque necessitam de sangue para a maturação e postura dos seus ovos. Dois gêneros possuem importância clínica na transmissão da leishmaniose; o gênero *Lutzomyia* (Figura 5A) no continente americano e *Phlebotomus* para os continentes europeu, asiático e africano (Figura 5B) (STEVERDING, 2017).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DE LEISHMANIA SP.

O ciclo de vida do parasita *Leishmania* sp. é composto por dois estágios, ele tem início no hospedeiro invertebrado, quando o flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo, sendo ingerido o sangue contaminado com formas amastigotas livres ou presentes no interior de macrófagos de um hospedeiro mamífero infectado. Na porção posterior do trato digestivo do inseto vetor, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, devido à diminuição da temperatura e aumento do pH, em comparação ao ambiente encontrado no hospedeiro mamífero (Figura 6) (BATES, 2007; AHMAD et al., 2020).

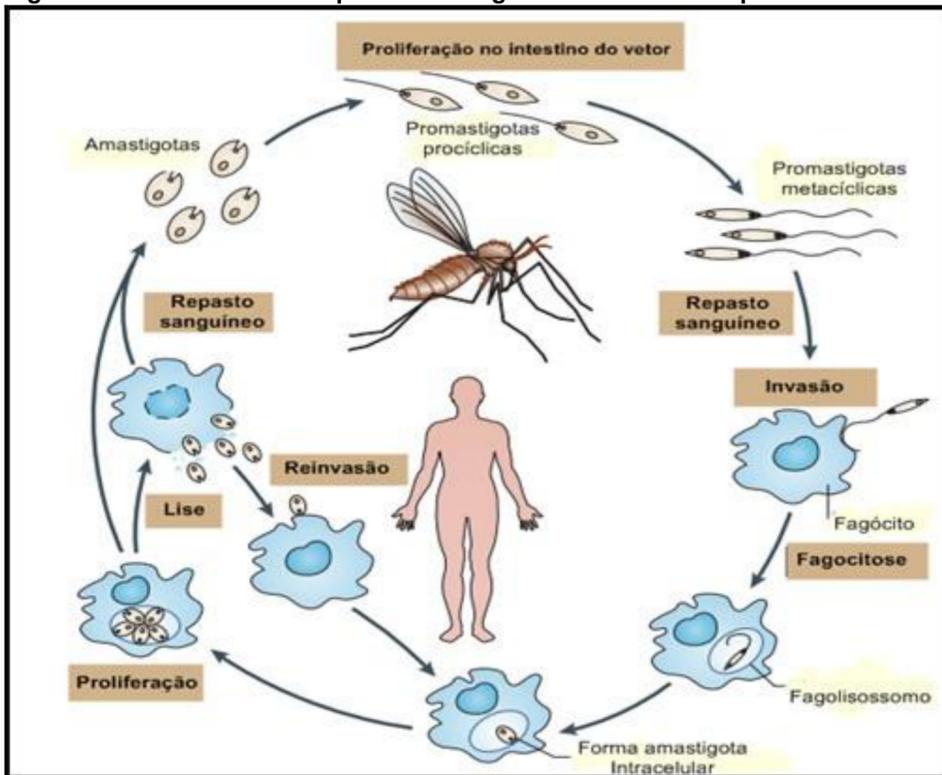
Os reservatórios do parasita *Leishmania* podem ser: selvagem e doméstico. O cachorro-do-mato, o lobo-guará, a raposa-do-campo e o gambá são os principais reservatórios selvagens. E o doméstico principal, é o cão (Figura 7). A proximidade dos animais domésticos com os seres humanos os faz ocupar uma posição de destaque na cadeia epidemiológica, e os cães são considerados os principais responsáveis pela persistência da leishmaniose em ambientes tropicais e neotropicais (PALATNIK-DE-SOUSA, CLARISSA B.; NICO, D., 2020; TOEPP; PETERSEN, 2020).

Figura 5 - Espécies de flebotomos fêmeas, vetores das leishmanioses.



(A) *Lutzomia longipalpis* (B) *Phlebotomus papatasi*. Fonte: BRASIL, 2019; MUNSTERMANN, 2019.

Figura 6 - Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* sp.



Fonte: Adaptado de KAYE P., SCOTT P., 2011. As formas promastigotas procíclicas são as formas consideradas não infectantes e antecedem as formas infectantes, que são as promastigotas metacíclicas. Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo do inseto vetor infectado, o qual injeta formas promastigotas metacíclicas ou infectantes na circulação sanguínea deste hospedeiro, que são então fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, majoritariamente macrófagos, posteriormente, dentro do fagolisossomo os parasitos transformam-se rapidamente em formas amastigotas, replicando-se até ocorrer lise celular. O flebotomíneo sadio, ao se alimentar do sangue deste hospedeiro infectado, suga as formas amastigotas que se transformam

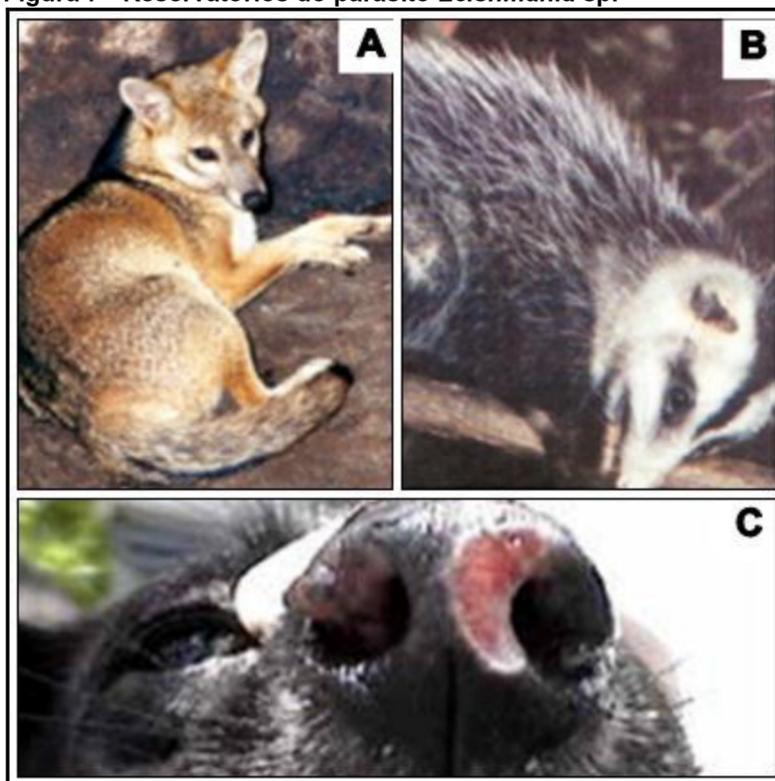
em formas promastigotas procíclicas no seu intestino, em um processo denominado metaciclogênese, originando as promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado, dando assim continuidade ao ciclo.

Tabela 1- Algumas espécies de *Leishmania* sp. que podem causar Leishmaniose em humanos.

Subgênero	Espécies	Manifestações Clínicas	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	LCL, LCD	África Oriental (Etiópia, Quênia)
	<i>L. amazonensis</i>	LCL, LCD, LD	América do Sul (Brasil, Venezuela, Bolívia).
	<i>L. donovani</i>	LV, LDPC	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia, China
	<i>L. infantum (L. chagasi)</i>	LV, LC	(Norte da África e Europa), Sudeste Europeu, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte, Central e do Sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia)
	<i>L. major</i>	LCL	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central
	<i>L. mexicana (L. pifanoi)</i>	LCL, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru.
	<i>L. tropica</i>	LCL, LV	África do Norte e Central, Oriente Médio, Ásia Central, Índia.
	<i>L. venezuelensis</i>	LCL	América do Sul, Venezuela.
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC, LD	América do Sul (Guatemala, Venezuela, Brasil, Bolívia, Peru)
	<i>L. guyanensis</i>	LCL, LMC	Guiné Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia)
	<i>L. lainsoni</i>	LCL	Brasil, Bolívia, Peru.
	<i>L. lindenbergi</i>	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	LCL	Brasil, Guiné Francesa
	<i>L. panamensis</i>	LCL, LMC	Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil.

Abreviações: LCL-Leishmaniose Cutânea Localizada, LCD-Leishmaniose Cutânea Difusa, LD-Leishmaniose Cutânea Disseminada, LDPC -Leishmaniose dérmica pós-calazar, LV-Leishmaniose Visceral, LMC-Leishmaniose Mucocutânea. Fonte: Adaptado de STEVERDING D., 2017.

Figura 7 - Reservatórios do parasito *Leishmania* sp.



Fonte: BRASIL, 2014; BRASIL, 2017. A) *Dusicyon vetulus*, conhecida popularmente como: raposa-do-campo. B) *Didelphis albiventris*, marsupial didelfídeo, ambos são reservatório silvestres da espécie *Leishmania chagasi*. C) *Canis familiaris*, cão doméstico, com lesão no focinho.

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As diferentes espécies de *Leishmania* são na maioria das vezes responsáveis pelas diversas manifestações clínicas, as quais resultam da interação entre o parasita, resposta imunológica do hospedeiro e biologia do vetor. Dessa forma, tanto para a LV quanto para LTA, à progressão da doença depende da manutenção de um estado imunossupressor específico do parasita no hospedeiro, incluindo atuação direta na desativação da resposta imune mediada por macrófagos desses indivíduos. Uma diferença fundamental entre a LV e a LTA é a propensão das espécies causadoras de

LV para causar doenças em locais sistêmicos, invadindo macrófagos do fígado, baço e medula óssea, com patologia mínima da pele. Sendo assim, a LTA acomete pele e mucosas e a LV as vísceras do indivíduo e tem elevada taxa de mortalidade (GOTO; LINDOSO, 2012; KAYE et al., 2020).

Sintomas como: febre irregular persistente, esplenomegalia caracterizam a leishmaniose visceral, pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia, e perda de peso também são observados nesta patologia (Figura 8A). O início da leishmaniose visceral pode ser agudo ou lento, e o período de incubação é entre 2 semanas e 8 meses. Sem tratamento, a doença pode levar a óbito dentro de 2 anos como resultado de infecções bacterianas secundárias ou anemia grave, caso o indivíduo não receba o tratamento adequado. No continente americano, esse quadro clínico é ocasionado principalmente pela espécie *Leishmania chagasi*, sinonímia, *Leishmania infantum* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; FREITAS et al., 2016).

Em indivíduos que desenvolveram LV, cujo o agente etiológico foi a *Leishmania donovani*, após o tratamento com êxito da patologia na forma visceral, a doença pode reaparecer numa forma cutânea crônica, denominada Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC) (FIGURA 8B). As manifestações clínicas de LDPC são limitadas a lesões maculares, papulares ou nodulares na pele. O maior número de casos da LDPC é registrado no Sul da Ásia (Índia, Nepal e Bangladesh) e na África Oriental, principalmente no Sudão. No sul da Ásia, as lesões polimórficas são prevalentes, enquanto no Sudão as lesões são papulares ou nodulares. As lesões, principalmente os papulonódulos, são ricas em parasitas, sendo possível subentender que à LDPC desempenha um importante papel na transmissão interepidêmica de LV. (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

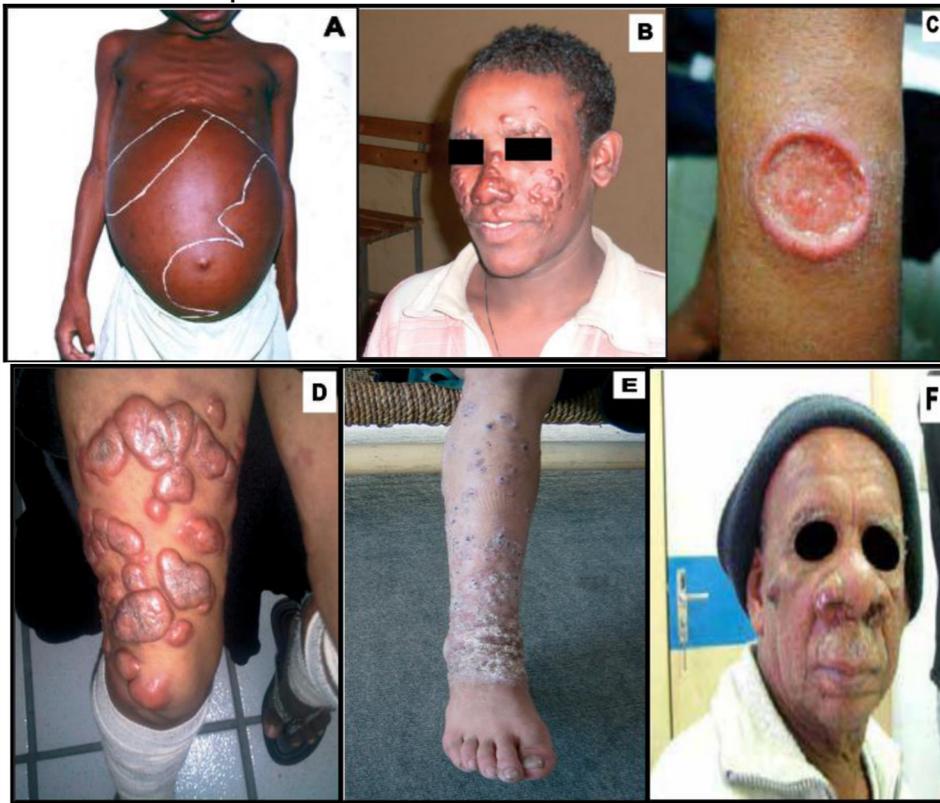
Em contrapartida a leishmaniose tegumentar, geralmente não leva ao óbito, porém pode levar a estigmatização social, baixa autoestima e problemas psicológicos, devido ao acometimento do corpo do indivíduo por nódulos ou lesões ulceradas. Esses ferimentos iniciam-se por uma pápula ao longo de semanas a meses no local onde foi realizado o repasto sanguíneo pelo vetor. Múltiplas lesões geralmente correspondem a diferentes locais de picadas, embora a propagação linfática seja possível. A pápula aumenta para um nódulo que ulcera lentamente ao longo dos meses seguintes. De maneira geral, os pacientes estão sistemicamente bem, e as lesões, embora ocasionalmente cocem, não provocam dor. Pode ser dividida nos subtipos: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC). Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Oriente Médio, Américas, Ásia Central e na Bacia

do Mediterrâneo e a maioria dos casos nas Américas são relatados no Brasil (WHO, 2020a; BRASIL, 2017, STEVERDING D., 2017). A LCL é caracterizada por lesões cutâneas ulceradas em partes expostas do corpo, é propensa à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, as lesões podem ser únicas ou múltiplas (até 20 lesões) deixando cicatrizes permanentes, é a forma mais comum entre os subtipos de LTA (FIGURA 8C). Na Índia, Etiópia, no Sudão e no Irã, ela é causada por *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica*. Nos países da América Central e do Sul, diferentes espécies podem ser as causadoras da doença como: *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. venezuelensis* e *L. panamensis* (WHO, 2020; BRASIL, 2017, STEVERDING D., 2017; SHOWLER; BOGGILD, 2015).

Já a LCD é menos comum e distinta da LCL, pois é caracterizada pelo lento desenvolvimento de múltiplos nódulos sem ulceração, lesões pápulo-nodulares, tuberosas, verrucosas, formando placas envolvendo todo o corpo, é uma manifestação clínica rara, e geralmente acomete indivíduos imunossuprimidos (FIGURA 8D). As espécies reconhecidas como causadoras deste quadro clínico são a *L. aethiopica* no e a *L. amazonensis*. A LD é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco, porém é uma manifestação clínica incomum que pode ser observada em até 2% dos casos, causada pelas espécies *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis* (FIGURA 8E) (BRASIL, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LMC é caracterizada por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores (FIGURA 8F). Frequentemente a lesão não provoca dor, tendo início no septo nasal anterior, cartilaginoso, próxima ao introito nasal, sendo, conseqüentemente, de fácil visualização. A mucosa nasal é a mais acometida, mas pode haver lesões na orofaringe, palato, lábios, língua e laringe. Posteriormente, as úlceras mucosas causam destruição do septo nasal, lábios e paladar levando a uma extensa desfiguração facial (BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017 GOTO; LINDOSO, 2012; STEVERDING D., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Figura 8 - Manifestações Clínicas resultantes da infecção por espécies do gênero *Leishmania* sp.



Fonte: BRASIL, 2017; BRASIL,2014; MOKNI, 2019. (A) Leishmaniose Visceral. (B) Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar. (C) Leishmaniose Cutânea Localizada. (D) Leishmaniose Cutânea Difusa. (E) Leishmaniose Cutânea Disseminada. (F) Leishmaniose Mucocutânea.

1.5 O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Atualmente a quimioterapia é a única abordagem para o tratamento da leishmaniose, pois ainda não há vacina contra qualquer forma da doença aprovada em humanos. Infelizmente, as opções de tratamento são limitadas a um pequeno número de medicamentos, que apresentam um alto custo, efeitos adversos significativos, demandam um longo período de tratamento e também existem casos de resistência aos fármacos utilizados. Essa terapêutica é baseada no uso de antimoniais pentavalentes - SbV (antimoniato de meglumina [glucantime[®]] e o estibogluconato de

sódio [pentostam[®]]), anfotericina desoxicolato B (ANFO B), pentamidina, paromomicina e miltefosina. Podem ser usados sozinhos ou em combinações: anfotericina B desoxicolato com miltefosina/paromomicina, miltefosina com anfotericina B lipossomal ou paromomicina com anfotericina B lipossomal (TABELA 2) (TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018; SINGH, GARG, VAHAB et al., 2016; MONDAL et al., 2014). A investigação inicial que possibilitou a utilização mundial dos antimoniais e da anfotericina B como drogas terapêuticas com atividade antileishmania foi realizada por brasileiros, pois foi o pesquisador Gaspar Vianna que sugeriu que antimoniais trivalentes poderiam ser úteis para tratar os primeiros casos de leishmaniose cutânea diagnosticados em São Paulo, em 1914 (ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018).

Os antimoniais (estibogluconato de sódio) são os principais medicamentos empregados contra a leishmaniose, são administrados desde a década de 1920. Ensaio realizados para elucidação do mecanismo de ação dos antimoniais são baseados em duas hipóteses. A primeira é baseada no redutor na bioconversão de SbV (antimônio pentavalente) a antimônio trivalente (SbIII), ação que ocorre devido ao cruzamento da membrana fagolisossomal, podendo ser realizada pelo parasita ou pelas células hospedeiras. O SbIII atua contra amastigotas e comprometem o potencial redox, permitindo o efluxo de tióis intracelulares e por consequência inibição da tripanotiona redutase (TR). Enquanto que a segunda hipótese infere que a forma pentavalente exerce atividade antileishmania, podendo atuar na inibição da atividade glicolítica, via oxidativa de ácidos graxos na forma amastigota, bem como por mecanismos indiretos por meio do aumento de citocinas e inibição da DNA topoisomerase I (NO, 2016).

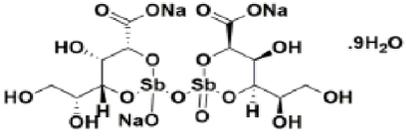
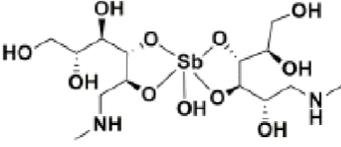
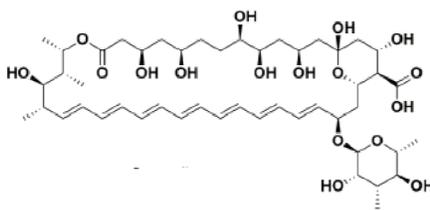
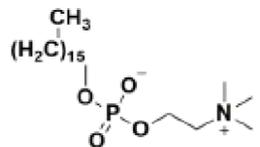
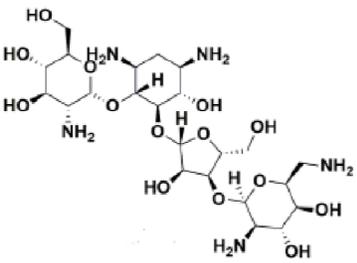
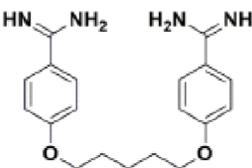
Entretanto esses compostos apresentam elevada toxicidade e uma pequena janela terapêutica, devido a essas limitações o seu uso foi suspenso no subcontinente indiano, onde a resistência se generalizou. No entanto, ainda são utilizados na América Latina e África Ocidental (PONTE-SUCRE et al.,2017).O glucantime é a droga de primeira escolha administrada em pacientes no Brasil, a sua dose recomendada para o tratamento da LC varia entre 10 e 20 mg/SbV/kg/dia por um período de 20 dias; já para o tratamento das lesões mucosas recomenda-se 20 mg/SbV/Kg/dia durante 30 dias seguidos (BRASIL, 2007). Para o tratamento da LV recomenda-se o uso de 20 mg/SbV/Kg/dia com aplicação intravenosa ou intramuscular no período de 20 a 40 dias (BRASIL, 2006).

A anfo B foi descrita no final de 1950 e foi desenvolvida como método terapêutico alternativo para pacientes com leishmaniose mucocutânea que frequentemente sofriam com a doença recidiva, ou não respondiam ao tratamento

com os antimoniais, sua eficácia foi logo observada e o seu uso foi estendido para o tratamento de pacientes com LV grave (ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018). Apesar de eficaz, esta droga apresentou elevada toxicidade quando injetada na sua forma livre de desoxicolato. Mesmo com a utilização de terapias combinadas a resistência ao tratamento ainda é uma possibilidade, o que representa um desafio potencial à próxima geração de terapias combinadas no tratamento da leishmaniose, proposta pela OMS (PONTE-SUCRE et al.,2017). Em razão da sua elevada toxicidade, novas formulações desse medicamento foram desenvolvidas utilizando-se lipídeos e hoje em dia existem a anfotericina lipossômica, anfotericina com dispersão de colesterol e anfotericina com complexo lipídico. Essas formulações foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e a biodisponibilidade dessa droga. Apesar de se apresentarem menos tóxicas, essas formulações alternativas da anfotericina B têm algumas limitações para sua utilização em países em desenvolvimento: são muito caras e instáveis em temperaturas mais altas. Essas drogas têm sido utilizadas no tratamento da LV (GOTO; LINDOSO, 2010; DE MENEZES et al., 2015).

Foi observada que a formulação lipídica desses novos compostos, concede ao composto ativo a capacidade de circular no corpo por um longo período de tempo, penetrando nos tecidos de maneira eficiente, além de diminuir a toxicidade da droga ao indivíduo que está sendo submetido ao tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB; 2006; GHORBANI; FARHOUDI, 2017). Sabe-se que o mecanismo da anfo B resulta em uma lesão nas membranas celulares do parasita 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 (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; GOLAN et al., 2016). A anfo B lipossomal é vendida na forma de pó estéril amarelado vivo em frascos-ampola de vidro com 50 mg de princípio ativo (GHORBANI; FARHOUDI, 2017; BRASIL, 2017).

Tabela 2 - Principais drogas utilizadas atualmente no tratamento das leishmanioses.

Drogas	Estrutura	Fórmula Molecular
Estibogluconato de Sódio		$C_7H_{18}NO_8Sb$
Antimoniato de Meglubina		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$
Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$
Miltefosina		$C_{21}H_{46}NO_4P$
Paromomicina		$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$
Pentamidina		$C_{19}H_{24}N_4O_2$

Fonte: Adaptado de ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018; ALBINO et al., 2020

Uma outra droga utilizada no tratamento da leishmaniose, porém em baixa escala, devido ao registro de resistência do parasito ao tratamento é a pentamidina, que foi sintetizada no final de 1930, e teve primeiramente a sua atividade antitripanossoma identificada, e só em 1940 o seu efeito antileishmania foi observado, sendo utilizada no tratamento da LV na Índia. A pentamidina é uma diamina aromática que também possui atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral. Foram relatados diversos efeitos adversos no tratamento da leishmaniose com essa droga, como *Diabetes mellitus*, hipoglicemia, grave, hipotensão, miocardite e toxicidade renal, que podem levar a óbito. Atualmente ela é uma droga de segunda escolha, utilizada para o tratamento de LMC no Brasil, além de seu uso na profilaxia secundária na co-infecção por HIV-LV (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018).

A pentamidina age inibindo a replicação do material genético dos parasitas, bloqueando a atividade de peptidases e também interrompendo a do homeostase do cálcio, no entanto, atua ainda acumulando-se nas mitocôndrias, causando colapso do potencial de membrana mitocondrial (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). Essas drogas são disponibilizadas comercialmente em frasco – ampola com 300 mg do sal, uma dose que deve ser diluída em 5 mL de água destilada para ser aplicada por via intramuscular no glúteo. A administração deve ser realizada em uma proporção de 3 – 4 mg/kg/dia, em dias alternados, de três a dez doses , não podendo ultrapassar a dose máxima de 240mg por dia. A dose total depende da resposta clínica e dos efeitos adversos do que o indivíduo submetido ao tratamento manifestará, incluindo nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão, hipoglicemia, hiperglicemia (raramente), alterações eletrocardiográficas, formação de abscesso no glúteo, cefaléia, epigastralgia e vertigem. (BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al, 2017).

A hexadecilfosfocololina, mais conhecida como miltefosina, foi desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer. É a droga mais utilizada no tratamento de paciente com LV na Índia, que apresentam resistência ao tratamento padrão com antimoniais pentavalentes e tem mostrado muitos resultados promissores (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017; GHORBANI; FARHOUDI, 2017; ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018). A administração é por via oral de 50-200 mg/kg por um período de 28 dias, apresentando como efeitos colaterais: distúrbios gastrointestinais, e em alguns casos pode resultar em hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (BRASIL, 2017). As principais desvantagens da miltefosina são seu potencial teratogênico, o que restringe a sua administração em pacientes gestantes e a sua longa meia-vida que pode resultar na seleção de cepas resistentes a

medicamentos (ULIANA;TRINCONI;COELHO, 2018). O mecanismo de ação dessas drogas pode ser direto no parasita *Leishmania* sp, afetando seu metabolismo lipídico, resultando em apoptose ou pode agir estimulando a resposta imunológica do hospedeiro induzindo a produção de óxido nítrico sintase 2 (NOS2) que catalisa a geração de óxido nítrico, ocasionando o controle da infecção, por ação dos macrófagos (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017;GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

Ademais, a essas drogas citadas acima, outros compostos como: a rifampicina, tamoxifeno, e alopurinol também são utilizadas no tratamento das leishmanioses, porém em menor escala (ORTEGA; GIORGIO; DE PAULA, 2017). Neste cenário, com inúmeras limitações observadas no tratamento das leishmanioses, incluindo a ausência de uma vacina no mercado para uso em humanos, a dificuldade na execução do tratamento, como a via de administração dos medicamentos e há presença de fortes efeitos colaterais, é de suma importância os estudos com fármacos candidatos a novas drogas, na busca de tratamentos alternativos que proporcionem uma maior eficácia e concomitantemente, uma melhor qualidade de vida aos pacientes, contribuindo assim em novas estratégias de combate as leishmanioses (RODRIGUES et al., 2015; FÉLIX et al., 2016).

1.6 DERIVADOS ACRIDÍNICOS

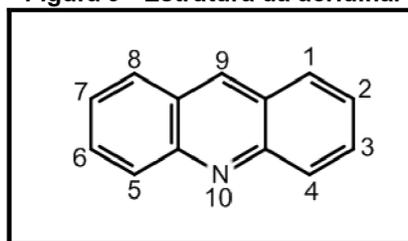
Os compostos acridínicos são aromáticos e policíclicos, e possuem uma estrutura π -conjugada, estes compostos apresentam um arranjo planar como núcleo principal da molécula, com três anéis aromáticos um entre eles sendo heteroaromático, essas características permitem que eles tenham úteis aplicações, também podem ser denominados de dibenzo[*b,e*]piridina, benzo[*b*]quinolina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaaantraceno. Inicialmente, eles foram usados como pigmentos e corantes. Porém, diversas pesquisas foram realizadas e outras aplicações das acridinas foram elucidadas, como a atividade antimicrobiana da acriflavina e seus derivados (ZHANG et al., 2014; SCHMIDT; LIU, 2015).

Outros estudos foram realizados no decorrer dos anos, tendo como objetivo de estudo outras aplicações das acridinas e os resultados obtidos foram promissores para o tratamento de câncer metastático colorretal, foi avaliada a atividade citotóxica de cerca de 2000 moléculas. Atualmente, outras práticas terapêuticas desses compostos

têm sido exploradas, e foi observado um efeito favorável para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA), um exemplo, é a tacrina que foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1993 para tratamento da DA, porém devido aos seus efeitos adversos, principalmente toxicidade hepática, esta droga tem sido raramente usada (ZHANG et al., 2014).

Dessa forma, em consequência do amplo espectro de atividades biológicas da acridina (Figura 9) e de seus derivados houve um interesse dos pesquisadores em explorar os seus mecanismos de ação, e foi relatado que esses compostos têm capacidade de intercalar entre as bases do DNA e assim impossibilitar a transcrição, resultando no impedimento no processo de replicação celular. Entretanto, a capacidade desses fármacos vai muito além da interação com o DNA. Presume-se que uma ligação fármaco-enzima, seja responsável pela inibição enzimática, mais precisamente inibindo a enzima topoisomerase (MOURA 2009; ALMEIDA et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

Figura 9 - Estrutura da acridina.



Fonte: (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012).

Sendo assim, esses compostos são fortes candidatos a novos fármacos devido às suas amplas propriedades biológicas como: atividade antimicrobiana, antiviral, antimalárica, antitripanossômica, antileishmania, antiparkinsoniana, além de suas propriedades antineoplásicas (PITTA, 2012). O derivado acridínico com maior destaque atualmente, é a Amsacrina (m-AMSA), um agente que têm sua atividade anticâncer conhecida, esta droga foi desenvolvida no início da década de 1970 na Nova Zelândia e foi a primeira droga totalmente sintética do tipo intercalante de DNA desenvolvida. Porém, só começou a ser vendida 6 anos depois para atuar na terapêutica da leucemia mieloide aguda (LMA) e linfomas malignos, no entanto, a sua eficácia no tratamento de tumores sólidos não foi significativa (BARROS et al., 2012; KETRON et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016; KAUR; SINGH, 2011).

Compostos acridínicos como o N- [2- (dimetilamino) etil] acridina-4-carboxamida (DACA) e seus derivados também é um intercalador de DNA e atuam interagindo com a topoisomerase I e II. Esses compostos foram desenvolvidos com o

objetivo de potencializar o tratamento contra as células cancerígenas, através da lesão do DNA. A triazoloacridinona outro derivado da acridina demonstrou uma potente inibição da topoisomerase II humana *in vitro*. Ademais, o composto antitumoral imidazoacridinona, mostrou ser capaz de inibir o ciclo celular na fase G2 (KAUR; SINGH, 2011; IWONA, 2020).

No entanto, a atividade biológica desses compostos não está restrita apenas a atividade antitumoral, os compostos 9-acridinonas e 9-tioalquilacridinas derivados acridínicos tiveram sua atividade biológica elucidada, em testes realizados contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (KAUR; SINGH, 2011). Os resultados promissores desses compostos como drogas anticancerígenas e antibacterianas agindo como inibidores das DNA topoisomerasas, evidenciou as topoisomerasas de células de parasitos, como protozoários, como potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias antiparasitárias. Considerando a sua replicação rápida, protozoários da família Tripanosomatidae demonstram algumas semelhanças com as células tumorais e diversos estudos dos compostos acridínicos e seus derivados frente a esses parasitos têm sido relatados. Desde 1928 a atividade desses elementos contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, vem sendo investigada, até que um medicamento com propriedades antimaláricas derivado de 9-aminoacridina, a quinacrina, foi inicialmente utilizado como um agente profilático da malária (YAN et al., 2018; IWONA, 2020). E em 1940, a quinacrina conseguiu a aprovação do FDA dos EUA para o tratamento da giardíase, assim como para a artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (WOZNIACKA; CARTER; MCCAULIFFE, 2002; LEE et al., 2011).

Pesquisas realizadas por Caffrey e colaboradores (2007) utilizando compostos sintéticos bis-acridínicos, mostraram potencial atividade antileishmania contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* quando se observou que os derivados bis-acridínicos substituídos com poliamidas e com poliamidas alquiladas mostraram-se mais eficazes. Foram realizados testes utilizando-se híbridos de amino-tiofeno e acridina, frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, e estes compostos mostraram citotoxicidade para essas células, em contrapartida, não foi observada nenhuma citotoxicidade em eritrócitos humanos (SERAFIM et al., 2018).

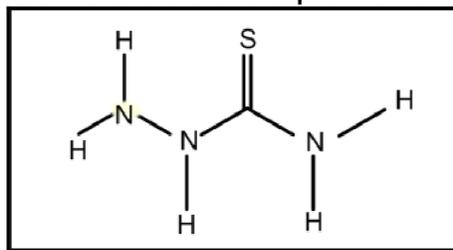
A leishmaniose está inserida no grupo das doenças negligenciadas, termo circunstanciado no fato de que as patologias inseridas neste grupo não provocam o interesse de indústrias farmacêuticas de grande porte, para a elaboração de fármacos e vacinas, devido a essas doenças se manifestarem principalmente em países em situação socioeconômica de vulnerabilidade (MARTINS-MELO et al., 2016; SOUZA,

2010; SANTOS et al., 2012). Diante este cenário, em que o tratamento é precário, de alto custo, e que as drogas utilizadas atualmente estão desatualizadas, é de extrema importância à busca por compostos terapêuticos para a leishmaniose. E baseando-se nos estudos realizados, e conseqüentemente em suas propriedades farmacológicas, os compostos acridínicos e seus derivados tem despertado um considerável interesse na química medicinal. Ademais, modificações e substituições nos núcleos acridínicos e seus análogos, amplificam a sua atividade farmacológica. Predispondo o advento de novos fármacos para a terapêutica das leishmanioses (SILVA et al., 2018).

1.7 TIOSSEMICARBAZIDA

A hidrazinacarbotoamida, comumente denominada de tiossemicarbazida, compreende uma classe de compostos orgânicos que tem sido bastante explorada devido a identificação de suas atividades biológicas relevantes, são elas: anticonvulsivante, antiviral, inibidores de polimerase, anti-inflamatório, antimalárico, antibacteriano, antioxidante, antifúngicas e antitumorais (GÜNİZ KÜÇÜKGÜZEL; P. COŞKUN, 2016; YOUSEF et al., 2011; KULANDASAMY et al., 2010; SIWEK et al., 2010). A tiossemicarbazida tem em sua estrutura (Figura 10) os elementos: carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, os átomos de hidrogênio podem ser substituídos por grupos alquila ou arila (REIS, 2012).

Figura 10 - Estrutura básica do composto tiossemicarbazida.



Fonte: REIS, 2012.

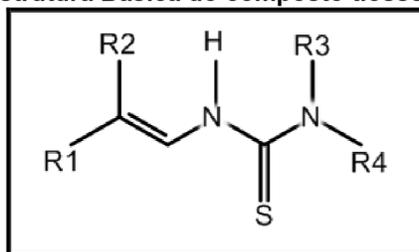
1.8 TIOSSEMICARBAZONA

Os compostos tiossemicarbazonas vêm sendo amplamente estudados devido as suas relevantes propriedades químicas e atividades biológicas, tais como antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, anticonvulsivante (AL-OTAIBI, 2019; DE SIQUEIRA et al., 2019; SUMMERS, 2019; NAMIECIŃSKA, 2019). Esses compostos possuem uma capacidade quelante, e o seu mecanismo de ação está relacionado a essa sua capacidade. A forma estrutural das tiossemicarbazonas (Figura 11) é formada por carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, onde os átomos de hidrogênio podem ser substituídos por grupos alquila ou arila. As moléculas tiossemicarbazonas são normalmente obtidas através da reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas (REIS, 2012). Esses compostos também apresentam baixo custo, reações com alto rendimento, e capacidade de gerar uma diversidade de análogos (SCARIM et al., 2019; ROSSI; FASEL, 2018; HALDYS; LATAJKA, 2019). Temraz e colaboradores através de estudos *in silico* com derivados tiossemicarbazonas, sugerem através dos resultados obtidos que esses derivados possuem uma atividade antileishmania superior comparado à miltefosina, droga padrão utilizada no tratamento de pacientes com leishmaniose (TEMRAZ et al., 2018). Outros ensaios realizados recentemente relataram uma atividade antileishmania promissora dos compostos aril tiossemicarbazonas, a espécie *Leishmania amazonensis* foi submetida ao tratamento com esses compostos, e os resultados obtidos mostraram que esta classe de compostos se mostrou mais efetiva do que a anfo B nas formas promastigotas do parasita, porém ao contrário da anfo B, esses compostos exibiram baixa citotoxicidade para as células hospedeiras. Além da atividade antiparasitária observada, os compostos também apresentaram propriedades imunomodulatórias sendo observada a secreção de citocinas denominadas pró-inflamatórias, que atuam no organismo do hospedeiro promovendo a resistência à infecção pelo parasita. Entretanto, esses compostos não apresentaram atividade significativa contra as formas amastigotas do parasita, sendo a sua atividade citotóxica inferior a observada no tratamento com a anfo B (DA SILVA et al., 2017).

Outro composto que teve sua atividade antileishmania descrita, foi o benzaldeído tiossemicarbazona derivado do limoneno complexado com cobre, denominado BenzCo, essa substância foi avaliada *in vitro* contra a espécie *L. amazonensis*. O BenzCo inibiu o crescimento das formas promastigota e amastigota

axênica do parasita, com concentrações de IC_{50} de 3,8 e 9,5 μ M, respectivamente, no período de 72 h de incubação. Os pesquisadores sugeriram que essa atividade antileishmania do BenzCo pode estar relacionada à disfunção mitocondrial e dano oxidativo, resultando na morte do parasita (BRITTA et al., 2012). As potencialidades terapêuticas promissoras dessas moléculas observadas nas leishmanioses, e a ausência de toxicidade delas sobre as células de mamíferos, as tornam importantes objetos de estudo como possíveis candidatos terapêuticos a serem utilizados no tratamento das leishmanioses.

Figura 11 - Estrutura Básica do composto tiossemicarbazona.



Fonte: Adaptado de REIS, 2012.

1.9 DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS

Os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos (Figura 12) são compostos sintéticos que foram obtidos por meio de uma via convergentes. O plano de síntese caracterizou-se pela condensação de derivados tiossemicarbazônicos a dois núcleos acridínicos: o I – 9-cloroacridina e II – 6,9-dicloro-2-metoxiacridina. Estudos de *docking* molecular foram realizados com os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e observou-se bons resultados de interação desses compostos, tanto com o complexo DNA-Topo II, quanto com a dupla fita do DNA, se esse mecanismo de ação vir a ser confirmado através de protocolos experimentais *in vitro* e *in vivo*, a potencial atividade promissora e seletividade para estes novos derivados será elucidada (SOUZA, 2019).

A citotoxicidade dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos já foi avaliada *in vitro* frente a duas linhagens de células tumorais: a linhagem MCF-7 que são células de câncer de mama, um tipo de tumor sólido e a HL-60, células de leucemia promielocítica aguda. Os compostos apresentaram efeitos inibitórios relevantes diretamente no crescimento das células leucêmicas (HL-60), linhagem HL60. No

entanto, na linhagem MCF-7 não apresentaram inibição significativa nessa linhagem (SOUZA, 2019).

Dessa forma, baseando-se nas atividades biológicas desses compostos e também na urgência na busca por fármacos eficazes para o tratamento das leishmanioses, os derivados tiosemicarbazônicos-acrídnicos podem surgir como moléculas com potencialidades terapêuticas promissoras no campo das leishmanioses.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

2.1.1 Investigar a atividade anti-*Leishmania* e citotóxica dos compostos derivados tiossemicarbazônicos acridínicos *in vitro* em cepas de *Leishmania infantum*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a atividade anti-*Leishmania*, em diferentes concentrações, dos compostos derivados tiossemicarbazônicos-acrididínicos sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e;

2.2.2 Investigar o efeito citotóxico de diferentes concentrações dos compostos derivados tiossemicarbazônicos-acrididínicos sobre eritrócitos humanos;

2.2.3 Determinar o índice de seletividade dos compostos derivados tiossemicarbazônicos- acrididínicos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARASITAS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS *IN VITRO*

A cepa da espécie *Leishmania infantum* IOC/L0579 (MHOM/BR/1974/PP75) foi cedida pela professora Dra. Selma Maria Bezerra Jeronimo do Laboratório de Imunogenética do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As formas promastigotas dessa espécie de *Leishmania* foram mantidas *in vitro* em meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL - Gibco, BR) e 1% de urina masculina humana. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 26 ± 1 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) e repicadas semanalmente, não excedendo vinte repiques, para que dessa forma fosse mantida a viabilidade celular.

As culturas de formas promastigotas em início de fase estacionária, de 5 dias foram criopreservadas em 12% de glicerol estéril (Amresco, Ohio, EUA) sob agitação constante por 15 minutos e então armazenadas em freezer a -80 °C para futuras utilizações. E de acordo com a necessidade, as culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e alíquotas de 500 µL foram colocadas em 5 mL de meio Schneider suplementado e mantidas em estufa de DBO à 26 ± 1 °C.

3.2 OBTENÇÃO DAS FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. INFANTUM*

As formas promastigotas de *L. infantum* foram diferenciadas em formas amastigotas axênicas conforme o protocolo de Debrabant et al., 2004. As formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas até atingirem a fase estacionária em meio Schneider suplementado durante 5 dias, a 26 ± 1 °C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a 112 x g (centrífuga PARSEC CT0603), tiveram seu sobrenadante desprezado e então ressuspensas em meio RPMI suplementado, com pH 5,46 suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico

(penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL). Por fim, as células foram então incubadas a 37 °C em estufa a 5% de CO₂ por 24 horas para diferenciação em formas amastigotas. A morfologia característica de amastigota foi analisada sob microscopia óptica antes de cada experimento.

3.3 COMPOSTOS QUÍMICOS AVALIADOS

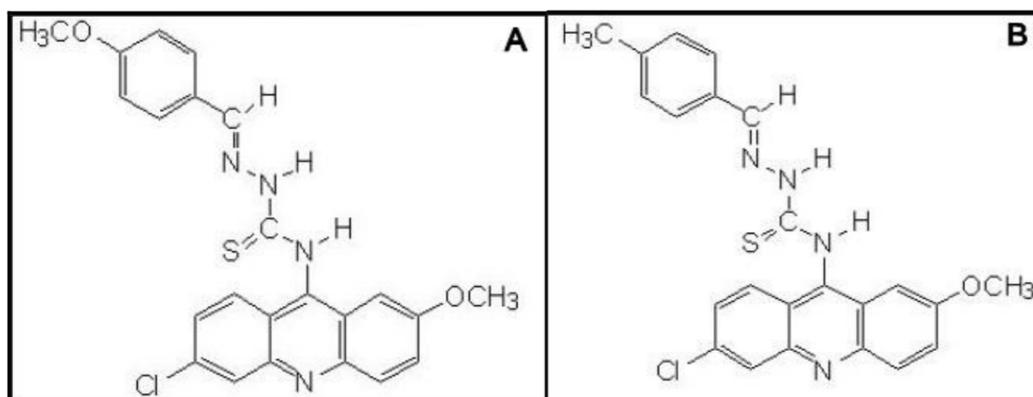
3.3.1 Fármaco de referência

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 líófilo em frascos-ampola com 50 mg, dessa forma, foi realizada uma solubilização em DMSO (dimetilsulfóxido) produzindo uma solução-estoque de 10 mg/mL e posteriormente diluída em meios de cultura adequados até atingir as concentrações teste.

3.3.2 Compostos sintéticos derivados tiossemicarbazônicos-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 tiossemicarbazônicos-acridínicos (Figura 12), o GLDL 03 e o GLDL 06 (Tabela 2). Os derivados possuem solubilidade em DMSO e CH₂Cl₂ (diclorometano), a 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 tiossemicarbazônicos-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. infantum* e posteriormente a testes de citotoxicidade em eritrócitos.

Figura 12 - Estrutura química dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.



Fonte: SOUZA, 2019. (A) Composto de código GLDL 03. (B) Composto de código GLDL 06.

Tabela 3 - Compostos químicos suas respectivas nomenclaturas e fórmula molecular.

Código do Composto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Molecular	Radical
GLDL 03	(2E,NE)-N-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-(10H)-ilideno)-2-(4metoxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida	C ₂₃ H ₁₉ ClN ₄ O ₂ S	4-OCH ₃
GLDL 06	(2E,NE)-N-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-(10H)-ilideno)-2-(4metoxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida	C ₂₂ H ₁₅ Cl ₃ N ₄ OS	4-CH ₃

Fonte: Adaptado de SOUSA, 2019.

3.4 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-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Em placa estéril de 96 poços de fundo reto, foram adicionadas formas promastigotas de *L. infatum* obtidas conforme o item 3.1, ajustadas na quantidade de 1×10^6

Leishmania/poço, 100 µL de meio schneider suplementado, os compostos teste e o fármaco de referência, a anfotericina B, em diferentes concentrações pré-estabelecidas. Os compostos químicos foram adicionados em concentrações seriadas de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 e 0,78µg/mL, já o fármaco de referência, a Anfotericina B[®], foi adicionado em concentrações seriadas de 2,5; 1,25; 0,625; 3,125 e 0,156µg/mL. As placas foram incubadas em estufa de DBO na temperatura de 26 ± 1°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 incubado mais uma vez por 16h para completa dissolução do formazan. Por último foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) a 550 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[®].

O teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), consiste na conversão do corante acima mencionado em sal de formazan. A partir de reação mitocondrial, os poços contendo coloração mais arroxeada foram os que demonstraram uma maior conversão ao sal de formazan, por apresentar uma maior concentração de células viáveis promovendo, conseqüentemente, 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% (CI₅₀). O experimento foi feito em triplicata em três experimentos independentes.

3.5 ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DOS COMPOSTOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. INFANTUM*

A atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT–Amresco, Ohio, EUA). Em placas de 96 poços, foram adicionadas as formas amastigotas axênicas de *L. infantum* obtidas conforme o item 3.2, ajustadas na quantidade de 1 x 10⁶ leishmanias/poço, contendo 100 µL de meio Schneider, pH 7 suplementado a 20% de SFB e diferentes concentrações seriadas de 50; 25; 12,5; 6,25 ,3,12, 1,56 e 0,78µg/mL para as moléculas testes; de 5, 2,5; 1,25; 0,625; 3,125 e 0,156µg/mL para a Anfotericina B[®]. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% à 37 °C por 24 h. Após a

incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 h e em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de DSS. A placa foi incubado por mais 16h para dissolução completa do formazan e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). O controle negativo foi realizado com meio Schneider, pH 5,5 e 5% de SFB a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitas.

3.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

As células foram adquiridas a partir da 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 esse trabalho, fizeram a doação de forma voluntária 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: 404.854 e CAAE: 17813013.8.0000.5183.

3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS

A determinação da atividade hemolítica dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos foi realizada a partir da coleta de amostras de sangue periférico humano (aproximadamente 5 mL) de voluntários adultos e saudáveis tipo sanguíneo 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 na concentração 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; 0,312; 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. Finalmente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800) a 550 nm. A ausência de lise (controle negativo) e lise total de glóbulos vermelhos (controle positivo) foi determinada, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), nesta ordem. O experimento foi feito em duplicata em 3 experimentos independentes.

3.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS

A partir dos resultados da atividade antipromastigota pelo ensaio de MTT e do ensaio de citotoxicidade frente a eritrócitos humanos, estimou-se, respectivamente, o CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) e o CH_{50} (concentração capaz de causar 50% de hemólise) de todos os compostos químicos testados. Assim, a partir destes resultados, determinou-se o índice de seletividade (IS). O IS é um indicativo *in vitro* se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito (*Leishmania*) do que para a célula de mamífero, sendo determinado pela razão entre os valores de HC_{50} e IC_{50} .

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram executados 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 CE_{50} (concentração da droga capaz de diminuir a viabilidade celular dos parasitas 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.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

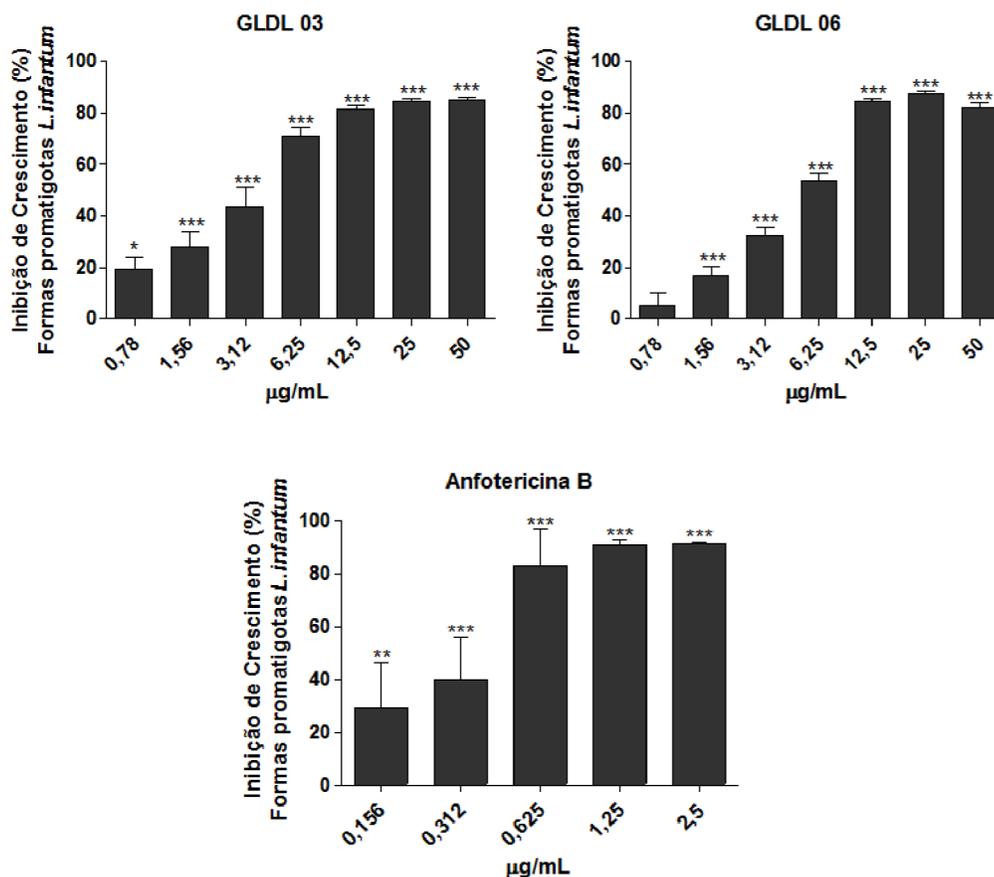
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS

Tendo como objetivo a busca por potenciais alvos antileishmania, os compostos tiossemicarbazônicos-acridínicos foram testados *in vitro* para a forma promastigota de *Leishmania infantum*, agente etiológico responsável por causar a forma mais grave da leishmaniose. Foram realizadas as diluições seriadas das substâncias GLDL 03 e GLDL 06, obtendo-se as concentrações a serem testadas de: 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12; 1,56; 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi observado neste ensaio colorimétrico, que os compostos analisados e o fármaco de referência, anfo B, apresentaram atividade antipromastigota sobre a espécie *L. infantum*, após 72 h de tratamento, demonstrados no Gráfico 1. As maiores concentrações testadas foram efetivas em inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*. No entanto, podemos destacar as concentrações 50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, onde se obteve inibições de crescimento de 84,92% e 84,64% respectivamente, para o GLDL 03 e de 87,74% e 82,03% para o GLDL 06, em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). Podendo inferir que à medida que se aumentavam as concentrações destes compostos, conseqüentemente havia um aumento na inibição do crescimento do parasita. Logo, com a obtenção desses dados foi possível calcular para o GLDL 03 uma CI_{50} de 3,512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para o GLDL 06 uma CI_{50} de 5,279 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para o fármaco de referência anfotericina B, obteve-se uma CI_{50} de 0,955 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 4).

Outros estudos já haviam demonstrado a atividade de derivados acridínicos sobre protozoários, como o trabalho de Silva e colaboradores (2018), em que se avaliou a atividade antimalárica de quatro compostos derivados acridínicos e os seus possíveis mecanismos de ação. Todos os compostos sintetizados se mostraram ativos contra a cepa *Plasmodium falciparum* W2 resistente a cloroquina e foram menos citotóxicos do que drogas de referência contra células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). O composto 2 apresentou um CI_{50} de 0,90 μM e foi o que exibiu CI_{50} mais próximo do da mefloquina, droga utilizada tanto na prevenção, quanto no

tratamento da malária, cujo CI_{50} foi $0.04 \mu\text{M}$ (DE M. SILVA et al., 2018). Um trabalho realizado recentemente em que derivados híbridos tiofênicos-acridínicos, foram avaliados sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, agente etiológico da leishmaniose cutânea, mostrou uma atividade antiproliferativa muito efetiva com CI_{50} inferiores a $35 \mu\text{g/mL}$, destacando-se inclusive, a atividade do composto ACS01 ($CI_{50}=3,9 \mu\text{g/mL}$) que se mostrou mais eficaz do que os antimoniais tri e pentavalentes ($CI_{50}=9,07$ e $32100,65 \mu\text{g/mL}$ respectivamente), fármacos de referência utilizados no tratamento das leishmanioses (SERAFIM., 2016).

Gráfico 1- Efeito dos compostos químicos GLDL 03, GLDL 06 e o fármaco de referência anfotericina B, sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento.



Fonte: NEVES, P. G. R. Os parasitos foram mantidos em meio Schneider suplementado e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos GLDL 03, GLDL 06 e do fármaco de referência. A inibição do crescimento dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle (DMSO 0,5%) como 0% de inibição. Foi realizado

One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ em comparação ao controle.

Tabela 4 - Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *L. infantum* após o período 72 h de tratamento com os compostos GLDL 03 e GLDL 06 e anfotericina B.

Compostos	Formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)
GLDL 03	3,512	7,788
GLDL 06	5,279	12,137
Anfotericina B	0,955	1,03

Fonte: NEVES, P. G. R. Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

A tiossemicarbazona 2-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-N-(4-nitrofenil) hidrazinacarbotoamida (LQIT/D01), um derivado tiossemicarbazônico, também teve sua atividade antileishmania avaliada frente as formas promastigotas de *L. infantum*, sendo possível calcular o $IC_{50} = 97,28\mu\text{M}$ desse composto (AIRES, 2017). Comparando-se os resultados desse estudo, com o composto analisado neste trabalho, em que a mesma espécie de *Leishmania* foi exposta ao tratamento, pode-se concluir que os novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, se mostraram mais ativos, do que o derivado tiossemicarbazônico LQIT/D01, porque o ($CI_{50} = 7,788 \mu\text{M}$) do GLDL 03 quanto do GLDL 06 ($CI_{50} = 12,137 \mu\text{M}$) encontrados foram muito menores em comparação ao CI_{50} do LQIT/D01 ($97,28\mu\text{M}$).

Mendes e colaboradores (2019) recentemente sintetizaram uma série de sete chalcona-tiossemicarbazonas (5a-5g) e as avaliaram como potenciais novos fármacos para o tratamento da leishmaniose. Os valores de 50% da atividade inibitória do crescimento (CI_{50}) também foram avaliados pelo método MTT. Os resultados obtidos se mostraram promissores contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, podendo destacar como composto mais ativo o 5e, com um valor de CI_{50} de $5,22 \pm 0,75 \mu\text{M}$, muito próximo do CI_{50} da pentamidina, fármaco de referência administrado em pacientes com leishmaniose, que foi utilizado como controle positivo e apresentou um valor de CI_{50} de $4,90 \pm 0,60 \mu\text{M}$. Uma significativa atividade antipromastigota de outras sete tiossemicarbazonas (TS01- TS07) frente à cepa (WHOM/00 LTB 0016) de *L. amazonensis* foi descrita. Os resultados obtidos através desses testes *in vitro* revelaram que todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento celular do parasita, com valores CI_{50} variando entre 3,5 e $87,5 \mu\text{M}$. O TS03 foi o composto que

mostrou maior atividade com $CI_{50} = 3.5 \pm 0.33$. O fármaco de referência utilizado como controle positivo foi a Anfotericina B, e apresentou um $CI_{50} = 1.1 \pm 0.15$ (DA SILVA et al., 2017). Da Silva (2017) sintetizou 10 novos derivados indólicos tiossemicarbazônicos (LQIT/PR-02- LQIT/PR-10), e realizou ensaios *in vitro* desses compostos contra as formas promastigotas de *L. infantum*, com o objetivo de identificar os compostos mais promissores. Na avaliação antileishmania foi verificado a eficácia desses derivados, sendo possível calcular o CI_{50} de todos eles, a concentração inibitória de 50% do crescimento das formas promastigotas, variou de 4,36 a 23,25 μM , sendo os resultados mais significativos contra os parasitos as moléculas LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 com valores de CI_{50} de 5,60 μM e 4,36 μM , nesta ordem (DA SILVA, 2017).

Um estudo realizado por Santos (2015) em que a avaliação da atividade antileishmania de compostos tiossemicarbazônicos foi explorada, formas promastigotas de *L. chagasi* foram incubadas com esses compostos por um período de 48h, os resultados foram muito promissores, sendo relatados CI_{50} abaixo de 10 μM , valores inclusive muitos próximos ao da pentamidina, fármaco padrão de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, que apresentou $CI_{50} = 6,1 \mu\text{M}$.

Experimentos recentes realizados por Da Silva e colaboradores (2020) em que foi realizada a síntese e a caracterização estrutural de novos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos (2a-j), e também avaliações *in vitro* através de ensaios de citotoxicidade desses compostos frente a duas espécies de *Leishmania*. Na avaliação contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* os valores CI_{50} variaram entre 12,31 e 481,52 μM , enquanto a atividade contra a mesma forma celular de *L. infantum* os valores de CI_{50} obtidos variaram entre 4,36 e 23,35 μM . Os compostos 2d e 2i testados contra *L. infantum* foram os mais promissores da série, pois apresentaram os menores valores de $CI_{50} = 5,60$ e 4,36 μM , respectivamente. Através dos resultados obtidos neste trabalho e também dos dados discutidos acima, é evidente a atividade biológica antileishmania dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, permitindo supor que esses derivados podem ser excelentes candidatos com potencial terapêutico no tratamento de doenças parasitárias negligenciadas. No entanto, é necessária a realização de estudos adicionais *in vivo* para haja a complementação dos resultados observados neste estudo.

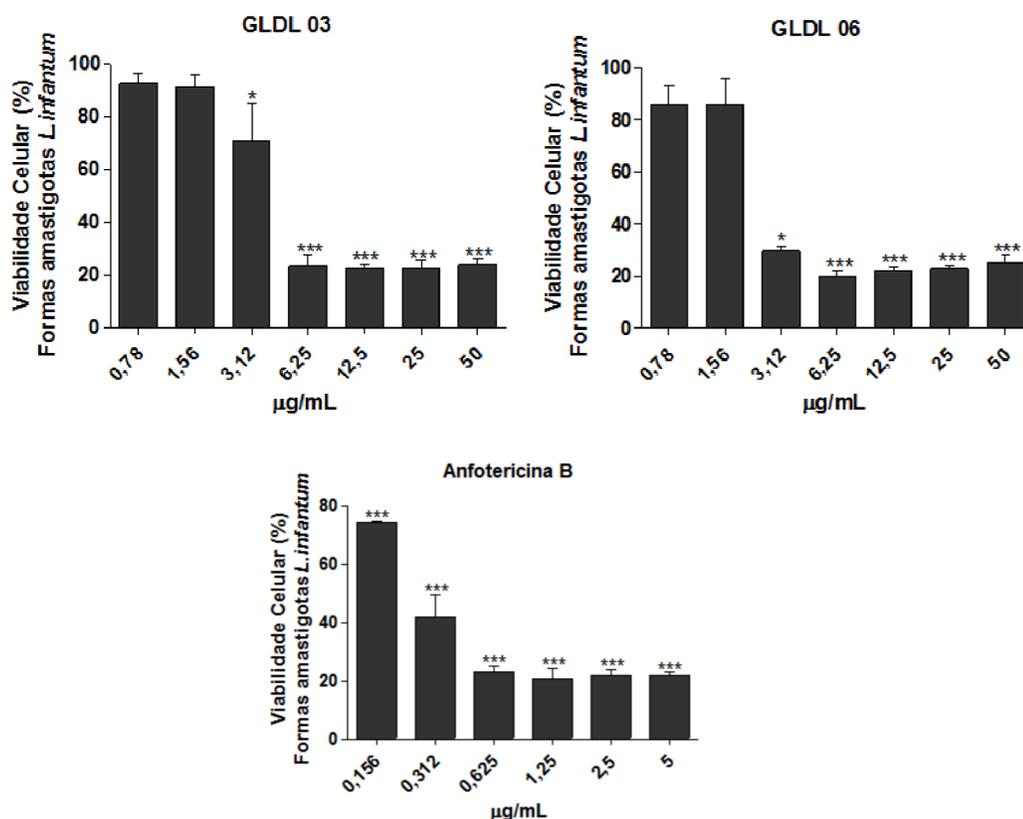
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DO GLDL 03 E DO GLDL 06 E O FÁRMACO DE REFERÊNCIA, ANFOTERICINA B, SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* APÓS 24H.

Dando continuidade a pesquisa com os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos a partir dos resultados antipromastigota, analisou-se a atividade dos compostos 03 e 06 nas concentrações de: 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,12; 1,56; 0,78µg/mL e como controle positivo utilizou-se a anfotericina B, sobre a forma amastigota axênica da *L. infantum*. Foram feitos 3 experimentos independentes em triplicata, juntamente com a anfotericina B. É fundamental examinar o potencial destas moléculas nesta forma celular, já que a forma amastigota do parasito é intracelular e é encontrada nos macrófagos de seu hospedeiro vertebrado sendo o homem, um deles. Neste ensaio foi possível calcular a dose efetiva desses compostos sobre 50% das formas amastigotas axênicas do parasita, já que eles não mais se encontram em fase logarítmica de crescimento, mas sim em sua fase estacionária. Os compostos mostraram-se ativos nas maiores concentrações, como pode ser observado no Gráfico 2. O GLDL 03 apresentou uma taxa de inibição de viabilidade celular de 75,93%;77,49%;77,41%;76,45% nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,12 µg/mL, respectivamente, quando comparadas ao controle (100% viabilidade celular). Enquanto que o GLDL 06 inibiu a viabilidade celular em 74,96%;77,00%;77,71%; 50; 25; 12,5 µg/mL, nesta sequência, quando comparadas ao controle (100% viabilidade celular).

De acordo com os resultados obtidos nesses experimentos foi possível calcular a concentração efetiva dos compostos GLDL 03, GLDL 06 e Anfo B, sendo o CE_{50} =6,201 µg/mL do GLDL 03; o do GLDL 06 CE_{50} = 7,550 µg/mL e a da Anfo B CE_{50} =0,476 µg/mL (Tabela 5). Outros derivados aril tiossemicarbazonas foram avaliados quanto a sua atividade biológica sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* por Da Silva e colaboradores (2017) e os valores encontrados de CE_{50} variaram de 18,3 a 40,3 µM, porém, esses compostos se mostraram muito menos ativos que o fármaco de referência anfo B CE_{50} = 0.23 µM, e os nossos derivados tiossemicarbazônicos acridínicos se mostraram mais efetivos do que estes com CE_{50} =13,751 µM (GLDL 03) CE_{50} = 17,358 µM (GLDL 06). No estudo realizado por Mendes et al. (2019), no qual se avaliou a atividade de cinco chalconas-tiossemicarbazonas sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, todos os

cinco se mostraram muito efetivos na atividade anti-amastigota, com valores de CE_{50} variando de 3,19 a 7,08 μM , apresentando inclusive uma maior eficácia do que a droga utilizada como controle positivo, a pentamidina, que apresentou um valor de $CE_{50} = 12,29 \mu\text{M}$. Santos (2015) também demonstrou uma potente atividade contra formas amastigotas de *L. chagasi* dos derivados tiossemicarbazônicos, sendo encontrado um $CE_{50} = 2,2 \mu\text{M}$ em contra partida, a droga utilizada como controle positivo, a pentamidina teve um $CE_{50} = 4,4 \mu\text{M}$. Britta et al., já haviam descrito a potente atividade *in vitro* antileishmania contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* do derivado do limoneno complexado com cobre, denominado BenzCo (benzaldeído tiossemicarbazona), sendo obtido um valor de $CE_{50} = 10,7 \mu\text{M}$ (BRITTA et al., 2012).

Gráfico 2 - Viabilidade celular das formas amastigotas axênicas de *L. infantum* na presença dos compostos químicos GLDL 03, GLDL 06 e do fármaco de referência anfotericina B, após 24 h de tratamento.



Fonte: NEVES, P. G. R. Os parasitos foram cultivados em meio RPMI pH 5,46 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos químicos GLDL 03, GLDL 06 e do fármacos de referência a 37 °C. A viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolio brometo (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 Tukey

para comparação entre os grupos, sendo * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Significância em relação ao controle).

Tabela 5 - Concentração Dose efetiva 50% (CE₅₀) de amastigotas de *L. infantum* dos compostos GLDL 03 e GLDL 06 e o fármaco de referência Anfotericina B.

Compostos	Formas amastigotas <i>L. infantum</i>	
	CE₅₀ (µg/mL)	CE₅₀ (µM)
GLDL 03	6,201	13,751
GLDL 06	7,550	17,358
Anfotericina B	0,476	0,51

Fonte: NEVES, P. G. R. Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

Sendo assim, em comparação com os resultados dos estudos que antecederam este trabalho e de forma análoga como ocorreu com as formas promastigotas, os derivados tiossemicarbazônicos acridínicos GLDL 03 e GLDL 06 apresentaram baixos valores de CE₅₀, demonstrando estar entre os tiossemicarbazônicos mais efetivos já relatados contra formas amastigotas axênicas da espécie *L. infantum* agente etiológico da manifestação clínica mais grave da leishmaniose, podendo vir também a ter uma potencial atividade frente a outras espécies do parasita.

4.3 CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Diante da notável atividade antileishmania dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos fez-se necessário realizar outros ensaios biológicos para verificar a seguridade desses compostos frente às células de animais e humanas. Esses ensaios são de extrema importância, pois por meio deles é possível levantar hipóteses sobre o mecanismo de ação dos compostos, uma vez que, substâncias testadas podem gerar modificações na membrana, através de formação de poros ou ruptura total, levando a alterações de permeabilidade que podem levar à morte celular (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

A avaliação foi realizada através de ensaios de citotoxicidade para eritrócitos

humanos, ou seja, foi avaliado se o GLDL 03, o GLDL 06 e Anfo B apresentavam atividade hemolítica, os resultados desse ensaio estão dispostos na Tabela 6. Os compostos sintéticos avaliados (GLDL 03 e GLDL06) não alteraram de forma significativa a viabilidade dessas células nem mesmo na maior concentração testada, de 400 µg/mL, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular, devido a ausência de citotoxicidade não foi possível determinar o CH₅₀ desses compostos com precisão. No entanto, considerando outros trabalhos em que compostos químicos sintéticos também não apresentaram hemólise mesmo na maior e o valor de CH₅₀ foi equivalente a maior concentração testada, podemos considerar o valor de CH₅₀ >400 µg/mL. O fármaco de referência avaliado, anfo B apresentou atividade hemolítica com uma CH₅₀ de 10,31µg/mL, ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade dessa droga. Esses resultados são muito promissores, dado que, os fármacos mais administrados em pacientes com leishmaniose provocam hemólise, como antimoniais pentavalentes e anfotericina B(LÖFGREN et al., 2008; HAMILL, 2013; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al.,2015).

Serafim e colaboradores (2018) sintetizaram oito novos compostos tiofênicos-acridínicos, todos eles assim como os tiossemicarbazônicos-acridínicos apresentaram relevante atividade antileishmania, sendo encontrada uma ação antipromastigota melhor dos que as drogas de referência (antimoniais tri e pentavalente), e ainda assim, nenhum deles apresentou citotoxicidade em eritrócitos humanos, mesmo na maior concentração testada de 1000µM.

Outros ensaio com derivados acridínicos realizados *in vitro* também exibiram HC₅₀ >400 µg/mL. Almeida (2018) demonstrou a ausência de citotoxicidade de dez derivados espiro-acridínicos, corroborando com nosso estudo. Essa atividade antileishmania dos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos e a ausência de citotoxicidade em glóbulos vermelhos estimulam o prosseguimento de estudos com esses compostos. Para que sejam elucidados os seus possíveis mecanismos de ação, visando a busca de fármacos para o tratamento da LV.

Tabela 6 - Concentração hemolítica sobre 50% das hemácias (CH₅₀) dos compostos teste e os fármacos de referência após 1 h de incubação.

COMPOSTOS	CITOTOXICIDADE ERITRÓCITOS (HC ₅₀ µg/mL)
GLDL 03	>400
GLDL 06	>400
Anfotericina B	10,31

Fonte: NEVES, P. G. R. Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

4.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).

O Índice de Seletividade (IS) é uma grandeza utilizada para avaliar *in vitro* se o composto que foi testado é mais seletivo para o parasito do que para a célula de mamífero. Esse índice é calculado pela razão dos parâmetros de citotoxicidade (CH₅₀) sobre a atividade anti-*Leishmania* (CI₅₀). Para que uma molécula venha a ser considerada uma potencial nova droga, é necessário que o seu índice de seletividade seja alto, caracterizando que aquela molécula possui uma ação mais seletiva para o parasito (DON; IOSET, 2014).

Os valores do IS dos derivados tiassemicarbazônicos-acridínicos foram muito mais expressivos do que o do fármaco de referência. O GLDL 03 IS= 113,89; GLDL 06= 75,7; anfo B=10,85. Outros trabalhos que avaliaram o índice de seletividade de novos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos testados contra *L. infantum* mostraram valores que variaram de 12,21 a 26.49, enquanto, que os mesmos compostos quando avaliados contra *L. amazonensis* apresentou valores de IS entre 4, 32 e 14,97, nesse ensaio a droga de referência utilizada foi a miltefosina, e ela apresentou um IS de 3,87 (DA SILVA et al., 2020). Em outro estudo, em que foi calculado o IS de dez derivados espiro-acridínicos, os valores do IS variaram de 66,03-360,68 (ALMEIDA,2018). Ensaio realizado em que foi calculado o IS do composto acridínico, amsacrina, fármaco antineoplásico, o IS da amsacrina para células tumorais em relação a células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi

de 11,6 (BARROS et al.,2012).

Sendo assim, podemos inferir que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos, não mostraram toxicidade contra hemácias e também foram mais seletivos ao parasita do que outros derivados acridínicos. A partir destes resultados obtidos, *in vitro*, é possível pressupor que os compostos GLDL 03 e GLDL 06 podem não apresentar toxicidade significativa *in vivo*, visto que se apresentaram seguros mesmo testados na maior concentração (>400 µg/mL). No entanto, é fundamental a realização de ensaios de toxicidade *in vitro* mais específicos, como citotoxicidade em células CMSP, seguidos por testes *in vivo*.

Tabela 7 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀) de promastigotas de *L.infantum*, concentração hemolítica sobre 50% das hemácias (HC₅₀) e índice de seletividade (IS = HC₅₀/IC₅₀) de derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos.

Compostos	Formas promastigotas de <i>L. infantum</i>		
	CI ₅₀ (µg/mL)	HC ₅₀ (µg/mL)	IS (CH ₅₀ /CI ₅₀)
GLDL 03	3,512	>400	113,89
GLDL 06	5,279	>400	75,77
Anfotericina B	0,955	10,31	10,85

Fonte: NEVES, P. G. R. Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

5- CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que os derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos GLDL 03 e GLDL 06 apresentam atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas do parasita *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral em testes *in vitro*.

Ao contrário do observado no tratamento de eritrócitos com a anfo B, esses compostos mostraram altos níveis de seletividade *in vitro* quanto à toxicidade para eritrócitos humanos dentro das concentrações avaliadas, sendo verificada uma citotoxicidade maior para as formas morfológicas da espécie do parasita *L. infantum* do que para eritrócitos. Esses resultados tornam esses compostos possíveis candidatos a potenciais fármacos para o tratamento das leishmanioses. No entanto, são necessários ensaios subsequentes para a avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico, e também avaliação do mecanismo de ação desses compostos, para que sejam realizados ensaios *in vivo*.

6- REFERÊNCIAS

AHMAD, AFTAB et al. Biogenic metal nanoparticles as a potential class of antileishmanial agents: mechanisms and molecular targets. **Nanomedicine**, n. 0, 2020.

AIRES, DIOGO CHAVES GAMA. Derivados tiossemicarbazônicos e tiazolidinônicos como possíveis candidatos ao tratamento da leishmaniose. 2017. 83f (**Dissertação**) - Mestrado em Ciências Farmacêuticas- UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. Recife, 2017.

ALBINO, SONALY LIMA et al. Bioprospecting of Nitrogenous Heterocyclic Scaffolds with Potential Action for Neglected Parasitosis: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, 2020.

ALMEIDA SILVA, FERNANDA. ESTUDO *IN SILICO* COM POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS E *IN VITRO* ANTI-LEISHMANIA DE DERIVADOS ESPIRO-ACRIDÍNICOS.2018. 117f (**Dissertação**)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.

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, S.M.; LAFAYETTE, E.A.; DA SILVA, L.P.; AMORIM C.A.; DE OLIVEIRA, T.B.; RUIZ, A.L.; DE CARVALHO, J.E.; DE MOURA, R.O.; BELTRÃO E.I.; DE LIMA, M. do C.; DE CARVALHO JÚNIOR, L.B..Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **Int J Mol Sci**. Jun 9;16(6):13023-42, 2015.

AL-OTAIBI, F. An overview of structurally diversified anticonvulsant agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 69, n. 3, p. 321–344, 2019.

BARROS, F. W. A.; et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE |Ministério da Saúde Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019: Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. n. 50 (n.esp), 2019.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2ª edição, p. 180, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. **Editora do Ministério da Saúde**, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Editora do Ministério da Saúde**, p. 182, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral. Brasília: **Ministério da Saúde**. 1ª edição, 2014.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN: normas e rotinas. 2. ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007b. 68 p.

BRITTA, ELIZANDRA APARECIDA et al. Benzaldehyde thiosemicarbazone derived from limonene complexed with copper induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e41440, 2012.

BURZA, SAKIB; CROFT, SIMON L.; BOELAERT, MARLEEN. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CAFFREY, C. R.; STEVERDING, D.; SWENERTON, R. K.; KELLY, B.; WALSH, D.; DEBNATH, A.; ZHOU, Y. M.; DOYLE, P. S.; FAFARMAN, A. T.; ZORN, J. A.; LAND, K. M.; BEAUCHENE, J.; SCHREIBER, K.; MOLL, H.; PONTE-SUCRE, A.; SCHIRMEISTER, T.; SARAVANAMUTHU, A.; FAIRLAMB, A. H.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H.; WEISMAN, J. L.; MAY, B. C. H. Bis-acridines as lead antiparasitic agents: structure-activity analysis of a discrete compound library in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2164-2172, 2007.

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

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.

COSTA-LOTUFO, L. V; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-234, 2002.

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

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

DA SILVA, P. R. et al. **Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies.** [s.l.] Elsevier B.V., 2020. v. 315

DA SILVA, PAULA. ROBERTA. SÍNTESE, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS -TIOSEMICARBAZÔNICOS.2017. 84f (**Dissertação**)-Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife,2017.

DE LIMA SERAFIM, Vanessa et al. 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.

DE M. SILVA, M. et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 165–175, 2018.

DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**, v. 2015,2015.

DE SIQUEIRA, LUCIANNA RABELO PESSOA et al. Multi-target compounds acting in cancer progression: focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European journal of medicinal chemistry**, v. 170, p. 237-260, 2019.

DEBRABANT, A.; JOSHIB, M. B.; PIMENTAC, P. F. P.; DWYERB, D. M. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 205–217, 2004.

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.

DOSTÁLOVÁ, ANNA; VOLF, PETR. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

FÉLIX, M. B.; DE SOUZA, E. R.; DE LIMA, M. C. A; FRADE, D. K. G.; SERAFIM, V. L.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N; RIBEIRO, F. F.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; DE AQUINO, T. M.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. Antileishmanial Activity of new Thiophene-indole Hybrids: Design, Synthesis, Biological and Cytotoxic Evaluation, and Chemometric Studies. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.057. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2016.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.; AUWERA, G. V. Phylogeny of Leishmania species based on heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FREITAS, E. O.; LEORATTI, F. M. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A.; FEIJO, D. F. The Contribution of immune evasive Mechanisms to Parasite Persistence in visceral Leishmaniasis. **Front. Immunol**, v. 7, p. 1-7, 2016.

GABRIEL, IWONA. 'Acridines' as New Horizons in Antifungal Treatment. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1480, 2020.

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.

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

GÜNİZ KÜÇÜKGÜZEL; P. COŞKUN. Macromolecular drug targets in cancer treatment and thiosemicarbazides as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 16, n. 10, p. 1288-1300, 2016.

HAŁDYS, Katarzyna; LATAJKA, Rafał. Tiossemicarbazonas com atividade inibitória da tirosinase. **MedChemComm** , v. 10, n. 3, pág. 378-389, 2019.

HAMILL, Richard J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919-934, 2013.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H. MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 814-826, 2010.

KAUR, JATINDER; SINGH, PALWINDER. Acridine derivatives: a patent review (2009–2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, n. 4, p. 437-454, 2011.

KAYE, PAUL M. et al. Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. In: **Seminars in Immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2020. p. 1-18.

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

KETRON AC, DENNY WA, GRAVES DE, OSHEROFF N. Amsacrine as a topoisomerase ii poison: Importance of drug-dna interactions. **Biochemistry** 2012;51(8):1730-1739.

KULANDASAMY, R.; ADHIKARI, A. V.; TARANALLI, A.; VENKATASWAMY, T. New Hydrazides and Thiosemicarbazides Derived from Ethylenedioxythiophene as Potential Anticonvulsants. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, 185, 7, 1358- 1368, 2010.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 3–9, 2012.

KUMAR, RAMESH; KAUR, MANDEEP; KUMARI, MEENA. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Pol. Pharm**, v. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

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.

LÖFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDEL, M.; BACHÈRE, E.; BARRACCO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, p. 197-202, 2008.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS-JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103-110, 2016.

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.

MENDES, E. P. et al. Evaluation of novel chalcone-thiosemicarbazones derivatives as potential *Anti-leishmania amazonensis* agents and its HSA binding studies. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 1–19, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. BR.Secretaria de Vigilância em Saúde Vigilância em saúde no Brasil 2003-2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. n. 50 (n.esp), 2019.

MOKNI, M. Cutaneous leishmaniasis. In: **Annales de dermatologie et de venerologie**. 2019. p. 232.

MONDAL, DINESH et al. Challenges for management of post kala-azar dermal leishmaniasis and future directions. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 5, p. 105, 2014.

MOURA, R. O. Síntese e avaliação in vitro de novos derivados isoquinolínicos, quinazolínicos, pirimidínicos e piridínicos acridínicos. 2009. 238 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife. 2009.

MUKHOPADHYAY, DEBANJAN et al. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2014.

MUNSTERMANN, L. E. Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae). In: **Medical and Veterinary Entomology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 191–211.

NAMIECIŃSKA, EWELINA et al. Antimicrobial and structural properties of metal ions complexes with thiosemicarbazide motif and related heterocyclic compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 664-693, 2019.

NO, JOO HWAN. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016 Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.

ORTEGA, VANESSA; GIORGIO, SELMA; DE PAULA, ENEIDA. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: a review. **Journal of liposome research**, v. 27, n. 3, p. 234-248, 2017.

PALATNIK-DE-SOUSA, CLARISA BEATRIZ; NICO, DIRLEI. O atraso no licenciamento de vacinas protozoárias: uma história comparada. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 204, 2020.

PARAÍBA. Secretaria de Estado da Saúde. Gerência Executiva de Vigilância em Saúde. Plano Estadual de Ação para Intensificação da Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral – 2019 A 2020. João Pessoa, PB: **Secretaria de Estado da Saúde**, 2019.

PITTA, M. G. D. **Novos Agentes Tiazacridínicos com Propriedades Anticâncer**. 2012. 192 f. Tese (Doutorado em Inovação terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

PONTE-SUCRE, ALICIA et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, 2017.

REIS, CAMILA MORETTO DOS. Síntese e avaliação da atividade biológica de tiossemicarbazidas, tiossemicarbazonas e cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminadas. 2012. 110f (**Tese**) - Doutorado em Ciências- UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO. Rio de Janeiro, 2012.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N. S.; NÉRIS, P. L. N. ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L. MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; DE MEDEIROS, I. A.; KEESENA, T. S. L.; DE OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, M. C. A; BALLIANOF, T. L.; de AQUINO F. T. M.; DE MOURA, R. L.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

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

SANTOS, F. L. A.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R.; ROLIM, L. A.; GOMES, T. C. B. L.; FERRAZ, L. R. M.; LIMA, Á. A. N.; SOBRINHO, J.L. S.; ROLIM-NETO, P. J. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 33, n. 1 p. 37-47. 2012.

SANTOS, MARIANA DA SILVA. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DE DERIVADOS GUANILIDRAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS. 2015. 69f (**Dissertação**) - Mestrado em Ciências da Saúde- UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. Maceió, 2015.

SCARIM, C. B. et al. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 162, p. 378–395, 2019.

SCHERLIEß, REGINA. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International journal of pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 98-105, 2011.

SCHMIDT, ANDREAS; LIU, MING. Recent advances in the chemistry of acridines. In: **Advances in Heterocyclic Chemistry**. Academic Press, 2015. p. 287-353.

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.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Cutaneous Leishmaniasis in Travellers: a Focus on Epidemiology and Treatment in 2015. **Current Infectious Disease Reports**, v. 17, n. 7, 2015.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. **Protozoan Diseases: Leishmaniasis**. Second Edition. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 6

SILVA, ALESSANDRA FERREIRA DA. **Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Vale do Ribeira**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia.

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.

SINGH, K.; GARG, G.; VAHAB, A. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. *Current Drug Metabolism*, v.17, p. 1-23, 2016.

SIWEK, A.; STACZEK, P.; WUJEC, M.; STEFANSKA, J.; KOSIKOWSKA, U.; MALM, A.; JANKOWSKI, S.; PANETH, P. Biological and docking studies of topoisomerase IV inhibition by thiosemicarbazides. **Journal of Molecular Modeling**, 17, 9, 2297-2303, 2010.

SOUSA, GLEYTON LEONEL SILVA. SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS-ACRIDÍNICOS. 2019. 240f (**Dissertação**)-Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

SOUZA, A. S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J. M.; GUIMARÃES, L. H.; DE JESUS, A. R.; DE MOURA, T. R.; WILSON, M.; CARVALHO, E. M; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

STEVERDING, DIETMAR. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUMMERS, KELLY L. Uma perspectiva da química estrutural sobre as propriedades antimaláricas dos complexos de metal tiossemicarbazona. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry** , v. 19, n. 7, pág. 569-590, 2019.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497-507, 2018.

TEMRAZ, M. G. et al. Anti-leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: Design, synthesis, biological evaluation and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 585–600, 2018.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, n. April 2018, p. 19–25, 2020.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; KOREHISA MAZA, P.; PRADO DIAS FILHO, B.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. **Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

ULIANA, SILVIA RB; T TRINCONI, CRISTIANA; COELHO, ADRIANO C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464, 2018.

WHO - World Health Organization. Leishmaniasis: Key facts. 2020a. Disponível em < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> >. Acessado em 20 de novembro 2020.

WHO - World Health Organization. Status of Endemicity of Cutaneous Leishmaniasis Worldwide, 2018.2020b. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2018.png. Acesso em 20 de novembro de 2020.

WHO - World Health Organization. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2018. 2020c. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_VL_2018.png. Acesso em 20 de novembro de 2020.

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.

YOUSEF, T. A.; BADRIA, F. A.; GHAZY, SHABANE E.; EL-GAMMAL, O. A.; ABU ELREASH, G. M. In vitro and in vivo antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3- thiosemicarbazides derivatives. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, 3, 2, 37-46, 2011.

ZHANG, BIN et al. Acridine and its derivatives: a patent review (2009–2013). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 6, p. 647-664, 2014.

7 – ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17813013.8.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 404.854

Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica na região do nordeste incluindo o estado da Paraíba e possui um forte impacto na população. O modelo epidemiológico deixou de ser totalmente rural e esta doença se tornou prevalente também em zonas urbanas e peri-urbanas. O projeto de pesquisa tem como proposta estudar a leishmaniose que é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*.

Serão selecionados 3 grupos de indivíduos: 1) com leishmaniose visceral com sintomatologia e 2) indivíduos assintomáticos, com sorologia positiva e sem sintomatologia clínica, além de 3) indivíduos com sorologia negativa e com nenhuma sintomatologia. Os pacientes com leishmaniose visceral serão provenientes de áreas endêmicas da Paraíba. O diagnóstico da doença será baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, padrão utilizados nos centros de referência, incluindo demonstração parasitológica e presença de anticorpos anti-leishmania. Os indivíduos não infectados e assintomáticos serão selecionados de acordo com uma anamnese detalhada e exames sorológicos. Todos os indivíduos que contribuirão para a realização deste trabalho participarão voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho e assinarão o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Após

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município:

Telefone: (833)216-7302

Fax: (833)216-7522

E-mail: laponiracortez@yahoo.com.br, cepulw@hotmail.