



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA-RENORBIO**

FERNANDA SILVA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS DE GUANIDINA,
SELENOGLICOLICAMIDAS E ESPIRO-ACRIDÍNICOS SOBRE *LEISHMANIA*
*INFANTUM***

**JOÃO PESSOA – PB
2022**

FERNANDA SILVA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS DE GUANIDINA,
SELENOGLICOLICAMIDAS E ESPIRO-ACRIDÍNICOS SOBRE *LEISHMANIA*
*INFANTUM***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- RENORBIO, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em BIOTECNOLOGIA – Área de concentração: SAÚDE.

Orientadora:

Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A447a Almeida, Fernanda Silva.

Avaliação da atividade de compostos de guanidina, selenoglicolicamidas e espiro-acridínicos sobre leishmania infantum / Fernanda Silva Almeida. - João Pessoa, 2022.

198 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.
Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Leishmaniose. 2. Atividade anti-Leishmania. 3. Guanidina - Derivados. 4. Selenoglicolicamidas. 5. Espiro-acridínicos - Derivados. 6. Apoptose. I. Clemente, Tatjana Keesen de Souza Lima. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.993.161(043)



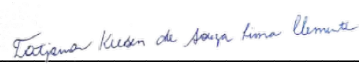
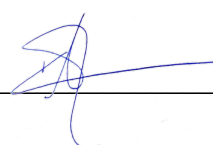
Coordenação Nucleadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia
Cidade Universitária, Campus I. CEP:58051-900. João Pessoa, PB.
Telefone : (83) 3216.7173 E-mails: securenorbio@cbiotec.ufpb.br
Homepage: <http://www.renorbio.org>

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: FERNANDA SILVA ALMEIDA

TÍTULO DO TESE: “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS DE GUANIDINA, SELENOGLICOLICAMIDAS E ESPIRO-ACRIDÍNICOS SOBRE *LEISHMANIA INFANTUM*”.

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

	CONCEITO	ASSINATURA
BANCA EXAMINADORA:		
Prof ^a . Dr ^a . Tatjana Keesen de S. Lima Clemente (Presidente)	APROVADA	
Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Examinador)	APROVADA	
Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski (Examinador)	APROVADA	
Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinadora)	APROVADA	
Prof. Dr. Klinger Antônio da Franca Rodrigues (Examinador)	APROVADA	

LOCAL: Plataforma Google Meet
DATA DA APROVAÇÃO: 23 de setembro de 2022
HORÁRIO: 09:00 horas

Emitido em 23/09/2022

FOLHA Nº 2/2022 - CBIOTEC - DB (18.62)
(Nº do Documento: 2)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/09/2022 18:45)
ENEAS RICARDO DE MORAIS GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2008919

(Assinado digitalmente em 26/09/2022 18:34)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 2,
ano: 2022, documento (espécie): FOLHA, data de emissão: 26/09/2022 e o código de verificação: 0d301271e2

“Conheça a sua própria felicidade. Só precisa de paciência – ou dê-lhe um nome mais fascinante e chame-a de esperança.”
Jane Austen- Razão e Sensibilidade

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por tamanha graça. Ele me fez chegar até aqui. Agradeço também a todas as pessoas que me acompanharam nessa jornada. Em especial ao meu esposo Wesley que lutou junto comigo e que me apoiou todo esse tempo. À minha família e aos meus amigos que sempre estiveram comigo. Em especial ao LABIDIC (Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas)- Pedro, Fany, Leo, Shayene, Luíz, Sandro, Fernando, Ericka. Em tantos momentos vocês foram como uma família pra mim aqui em João Pessoa, foram tantos momentos compartilhados e também de muitos aprendizados.

Minha gratidão também ao LBCM (Laboratório de Biologia Celular e Molecular), mais do que colegas de turma/RENORBIO, vocês foram meus amigos, parceiros nesse universo da pesquisa. Muito obrigada Aline, Ubiratan, Renata, Adriely. Sempre tão solícitos...Aprendi que trabalhando junto, compartilhando conhecimentos e vivências, nós conseguimos progredir muito nas nossas pesquisas.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia (CBIOTEC), a RENORBIO e a Universidade Federal da Paraíba; às agências de fomento, FAPESQ e CAPES, por proporcionar a possibilidade de cumprimento desse projeto. Agradeço desde já à participação dos membros da banca presente, obrigada por todas as contribuições apresentadas.

Por fim, agradeço em especial a minha orientadora Prof. Dra. Tatjana Keesen pela oportunidade de ser sua orientanda. És um exemplo para todos nós, uma exímia professora e pesquisadora. Obrigada por tanto aprendizado, e por acreditar em mim. Eu ingressei nesse universo acadêmico e hoje posso dizer o quanto eu cresci, obrigada por essa oportunidade. Obrigada por tudo.

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas tropical negligenciada com milhares de casos anualmente; sendo de grande preocupação para a saúde global, particularmente a forma mais grave, a leishmaniose visceral. Os tratamentos da leishmaniose visceral são limitados e têm efeitos adversos graves. Os compostos contendo guanidina, selênio e acridínicos tem apresentado atividades biológicas, dentre estas, antiparasitárias. Analisou-se, portanto, os efeitos citotóxicos desses vários compostos contendo guanidina, derivados de acridina e selenoglicolicamidas em *Leishmania infantum* em suas formas promastigota e amastigota *in vitro*, sua citotoxicidade em células humanas e efeitos na produção de espécies reativas de nitrogênio. Quanto a atividade dos derivados acridínicos, os valores de CI_{50} foram entre 1,10 a 6,05 $\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*. Na atividade sob formas amastigotas axênicas dos compostos mais ativos, destaca-se expressiva atividade do AMTAC 11 ($EC_{50} = 0,97 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) e baixa citotoxicidade em células mononucleares do sistema periférico ($CC_{50} = > 100 \mu\text{g/mL}$). Para os compostos do grupo das selenoglicolicamidas, dos 9 compostos avaliados, 8 apresentaram atividade inibitória contra promastigotas de *L. infantum* com CI_{50} que variaram entre 1,34 e 68,96 $\mu\text{g/mL}$. Na atividade citotóxica para amastigotas, o composto mais promissor, MSe 13 apresentou CE_{50} de $14,59 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$. Dentro das concentrações testadas, nenhum dos compostos apresentaram toxicidade em eritrócitos humanos. Para identificar os mecanismos de ação, avaliou-se os processos de morte celular por coloração com anexina V e iodeto de propídio e produção de nitrito. Quanto ao avaliação do perfil de morte celular a selenoglicolicamida MSe 13 induziu morte celular por apoptose em amastigotas axênicas, todavia a MSe 13 ainda induziu um percentual de morte celular em PBMC por apoptose, assim como o fármaco de referência Anfotericina B. Já os compostos guanidinícos LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 apresentaram valores de CI_{50} entre 5,14 a 10,76 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em promastigotas. Estes compostos exibiram citotoxicidade em amastigotas axênicas em valores de 10,59; 8,15 e 8,46 $\mu\text{g/mL}$. Os derivados de guanidina não apresentaram citotoxicidade aparente em células de doadores saudáveis. Compostos contendo guanidina apresentaram uma porcentagem significativa de amastigotas a apoptose. Independente da infecção por *L. infantum*, LQOFG-7 aumentou a produção de nitrito em PBMC's sugerindo um potencial mecanismo de ação para este composto. Portanto, esses dados sugerem que os derivados de guanidina, selenoglicolicamidas e espiro-acridínicos são potenciais moléculas para atividade anti-*Leishmania*, e mais pesquisas são necessárias para o entendimento completo de seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: atividade anti-*Leishmania*; leishmaniose; derivados de guanidina; selenoglicolicamidas; derivados espiro-acridínicos; apoptose

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical infectious disease complex with thousands of cases annually; being of major global health concern, particularly the most severe form, visceral leishmaniasis. Treatments for visceral leishmaniasis are limited and have serious adverse effects. Compounds containing guanidine, selenium, and acridines have shown biological activities, including antiparasitic. Therefore, we analyzed the cytotoxic effects of these various compounds containing guanidine, acridine derivatives, and selenoglycolicamides on *Leishmania infantum* in their promastigote and amastigote forms in vitro, their cytotoxicity in human cells and their effects on the production of reactive nitrogen species. As for the activity of acridine derivatives, the IC₅₀ values ranged from 1.10 to 6.05 µg/mL for promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) infantum*. In the activity under axenic amastigotes of the most active compounds, there is an expressive activity of AMTAC 11 (EC₅₀ = 0.97 ± 0.2 µg/mL) and low cytotoxicity in mononuclear cells of the peripheral system (CC₅₀ = > 100 µg/mL). For the compounds of the selenoglycolicamides group, of the 9 compounds evaluated, 8 showed inhibitory activity against *L. infantum* promastigotes with IC₅₀ ranging between 1.34 and 68.96 µg/mL. In terms of cytotoxic activity for amastigotes, the most promising compound, MSe 13, showed an EC₅₀ of 14.59 ± 1.44 µg/mL. Within the concentrations tested, none of the compounds showed toxicity in human erythrocytes. To identify the mechanisms of action, the processes of cell death were evaluated by staining with annexin V and propidium iodide and nitrite production. As for the evaluation of the cell death profile, selenoglycolicamide MSe 13 induced cell death by apoptosis in axenic amastigotes, however, MSe 13 still induced a percentage of cell death in PBMC by apoptosis, as well as the reference drug Amphotericin B. LQOFG-2, LQOFG-6 and LQOFG-7 showed IC₅₀ values between 5.14 and 10.76 µg/mL, respectively, in promastigotes. These compounds exhibited cytotoxicity on axenic amastigotes at values of 10.59; 8.15 and 8.46 µg/mL. The guanidine derivatives showed no apparent cytotoxicity in cells from healthy donors. Compounds containing guanidine showed a significant percentage of amastigotes to apoptosis. Regardless of *L. infantum* infection, LQOFG-7 increased nitrite production in PBMC's suggesting a potential mechanism of action for this compound. Therefore, these data suggest that guanidine derivatives, selenoglycolicamides, and spiro-acridines are potential molecules for anti-*Leishmania* activity, and more research is needed to fully understand their mechanism of action.

Keywords: anti-*Leishmania* activity; leishmaniasis; guanidine derivatives; selenoglycolicamides; spiro-acridine derivatives; apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Taxonomia da <i>Leishmania spp</i>	23
Figura 2.	Flebotomínio vetor da leishmaniose.....	24
Figura 3.	Formas promastigota e amastigota do gênero <i>Leishmania</i>	25
Figura 4.	Ciclo biológico e transmissão da leishmaniose.....	27
Figura 5.	(A) Epidemiologia da leishmaniose cutânea em todo o mundo no ano de 2020; (B) Epidemiologia da leishmaniose visceral em todo o mundo no ano de 2020.....	29
Figura 6.	Casos de leishmaniose visiceral na região das Américas entre 2001-2019.....	30
Figura 7.	Formas clínicas da Leishmaniose.....	33
Figura 8.	Estrutura do antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B), respectivamente.....	37
Figura 9.	Estrutura da Anfotericina B (AmB).....	38
Figura 10.	Estrutura da Miltefosina.....	39
Figura 11.	Estrutura da Paronomicina.....	40
Figura 12.	Estrutura molecular da Pentamidina.....	41
Figura 13.	Estrutura química da acridina e suas atividades biológicas.....	48
Figura 14.	Estrutura molecular dos derivados de guanidina.....	55
Figura 15.	Estrutura molecular base das selenoglicolicamidas.....	56
Figura 16.	Estrutura química dos derivados espiro-acridínicos e as respectivas substituições no anel aromático.....	58
Figura 17.	<i>Dot plots</i> representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de células mononucleares do sistema periférico tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B.....	64
Figura 18.	Estratégia de análise da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B.....	65
Figura 19.	Estratégia de análise avaliação de morte celular por	

	apoptose/necrose de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratadas com a selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B.....	66
Figura 20.	<i>Dot plots</i> representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de <i>L. infantum</i> (sub-população 1) tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B.....	68
Figura 21.	<i>Dot plots</i> representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de <i>L. infantum</i> (sub-população 1) tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e AnfotericinaB.....	69
Figura 22.	<i>Dot plots</i> representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de <i>L. infantum</i> (sub-população 2) tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B.....	70
Figura 23.	<i>Dot plots</i> representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de <i>L. infantum</i> (sub-população 2) tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B.....	71
Figura 24.	Estratégia de análise por citometria de fluxo do ensaio de infecção.....	73
Figura 25.	Efeito dos compostos derivados de guanidina LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, LQOFG-29, LQOFG-32 e LQOFG-33 sobre a inibição de crescimento após 72 h de tratamento em formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	78
Figura 26.	Processo de transformação <i>in vitro</i> da forma promastigota (a) em amastigota axênica (b).....	79
Figura 27.	Citotoxicidade dos derivados de guanidinas (LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7) e Anfotericina B sob a forma amastigota axênica de <i>L. infantum</i> após 24 h de tratamento.....	81
Figura 28.	Citotoxicidade dos compostos derivados de guanidina (LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7) e Anfotericina B sob células mononucleares do sistema periférico após 24 h de tratamento.....	83

Figura 29.	Morte celular por apoptose de formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> expostas aos compostos derivados de guanidina (LQOFG-2; LQOFG-6 e LQOFG-7), Anfotericina B e controles.....	88
Figura 30.	Efeito do composto LQOFG-7 e anfotericina B sobre a taxa de infecção de monócitos por <i>Leishmania infantum</i> após 24 h de tratamento	90
Figura 31.	Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com <i>Leishmania infantum</i> tratados com LQOFG-7 e controles.....	91
Figura 32.	Efeito dos compostos selenoglicolicamidas MSe 10, MSe 11, MSe 13, MSe 16, MSe 17, MSe 18, MSe 19 e MSe 20 sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> após 72 h de tratamento.....	95
Figura 33.	Citotoxicidade dos compostos selenoglicolicamidas (MSe 11, MSe 13 e MSe 19) e Anfotericina B sob a forma amastigota axênica de <i>L. infantum</i> após 24 h de tratamento.	97
Figura 34.	Perfil de morte celular de formas amastigotas (sub-população 1) de <i>Leishmania infantum</i> expostas a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B.....	100
Figura 35.	Perfil de morte celular de formas amastigotas (sub-população 2) de <i>Leishmania infantum</i> expostas a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B.....	102
Figura 36.	Índice de morte celular de células mononucleares do sistema periférico expostas a MSe 13 e anfotericina B.....	105
Figura 37.	Inibição da viabilidade celular de formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> por AMTAC 01 e AMTAC 11.....	109
Figura 38.	Viabilidade das células mononucleares do sistema periférico de doadores saudáveis (PBMC) tratadas com os compostos AMTAC 01 e AMTAC 11.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Série de compostos derivados de guanidina estudados	54
Tabela 2.	Série de compostos selenoglicolicamidas estudados	55
Tabela 3.	Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas especificações.....	56
Tabela 4.	Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI ₅₀) de <i>Leishmania infantum</i> após 72 h de incubação com os compostos derivados de guanidina e fármaco de referência	76
Tabela 5.	Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE ₅₀) de <i>Leishmania infantum</i> após 24 h de incubação com os compostos derivados de guanidina e fármaco de referência	80
Tabela 6.	Citotoxicidade em células humanas e índice de seletividade dos derivados guanidina e anfotericina B.....	82
Tabela 7.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h.....	85
Tabela 8.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h.....	86
Tabela 9.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de <i>Leishmania infantum</i> tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h para subpopulação 2.	89
Tabela 10.	Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI ₅₀) de <i>Leishmania infantum</i> após 72 h de incubação com os compostos selenoglicolicamidas e fármaco de referência.....	92
Tabela 11.	Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE ₅₀) de <i>Leishmania infantum</i> após 24 h de	

	incubação com os compostos selenoglicolicamidas e fármaco de referência.....	96
Tabela 12.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratados com selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h.....	97
Tabela 13.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de <i>Leishmania infantum</i> tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h para subpopulação 1.	101
Tabela 14.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de <i>Leishmania infantum</i> tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h para subpopulação 2.	102
Tabela 15.	Citotoxicidade em células humanas e índice de seletividade dos derivados de selênio e anfotericina B.....	104
Tabela 16.	Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose PBMC tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B.....	106
Tabela 17.	Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) dos derivados <i>spiro</i> -acridínicos frente as formas promastigotas de <i>L.infantum</i>	107
Tabela 18.	Atividade anti- <i>Leishmania</i> , efeitos citotóxicos contra células PBMC e o índice de seletividade para AMTAC 01, AMTAC 11 e anfotericina B.....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Estratégias convencionais para o tratamento da leishmaniose recomendadas pela Organização Mundial da Saúde.....	40
Quadro 2.	Substituições no anel aromático das espiro-acridinas.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 Leishmaniose: parasito e vetor	22
2.2 Ciclo biológico	25
2.3 Epidemiologia da leishmaniose	27
2.3 Manifestações clínicas	31
2.5 Diagnóstico da leishmaniose	33
2.6 Relação parasito x hospedeiro	35
2.7 Tratamento da leishmaniose	36
2.8 Resistência à fármacos e o incentivo a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e o desenho racional de fármacos para leishmaniose	42
2.9 Guanidina e seus derivados	45
2.10 Selenoglicolicamidas e seus derivados	46
2.11 Acridina e seus derivados	48
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral:	51
3.2 Objetivos específicos:.....	51
4 MÉTODOS.....	53
4.1 Local de pesquisa.....	53
4.2 Parasitos e manutenção das culturas <i>in vitro</i>	53
4.3 Obtenção das formas amastigotas axênicas	54
4.4 Fármaco de referência	54
4.5 Derivados de guanidina estudados	54
4.6 Derivados de selenoglicolicamidas estudados.....	56
4.7 Derivados espiro-acridínicos estudados	57
4.8 Atividade anti- <i>Leishmania infantum</i> dos compostos avaliados sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	58
4.9 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos compostos avaliados sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i>	59
4.10 Material biológico para avaliação da citotoxicidade dos compostos estudados.....	59
4.11 Citotoxicidade frente a eritrócitos humanos	60
4.12 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano	60
4.12.1 Ensaio de citotoxicidade em PBMC pelo método colorimétrico com MTT	61
4.12.2 Avaliação de morte celular em células mononucleares do sistema periférico humano por citometria de fluxo.	62
4.13 Determinação do índice de seletividade dos compostos avaliados	65
4.14 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> expostas aos compostos avaliados (LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13)	65

4.15 Avaliação do perfil de morte celular de formas amastigotas axênicas de <i>L. infantum</i> expostas aos compostos avaliados (LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13)	67
4.16. Avaliação da taxa de infecção de monócitos humanos por <i>L. infantum</i> e indução da síntese de óxido nítrico tratados com LQOFG-7 e controles.	73
4.17. Análise estatística	75
5.1 RESULTADOS: DERIVADOS DE GUANIDINA.....	77
5.1.1 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados de guanidina sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	77
5.1.2 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados de guanidina sobre as formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i>	80
5.1.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos de guanidina em células de mamíferos e índice de seletividade.....	82
5.1.3.1 Citotoxicidade em eritrócitos humanos	82
5.1.3.2 Citotoxicidade frente a células mononucleares de sangue periférico humano	83
5.1.4 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas e amastigota axênica de <i>L. infantum</i> expostas os derivados de guanidina LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7.....	85
5.1.5 Avaliação da taxa de infecção e indução da síntese de óxido nítrico mediante infecção de monócitos humanos por <i>Leishmania infantum</i>	90
5.2 RESULTADOS: SELENOGLICOLICAMIDAS	93
5.2.1 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> das selenoglicolicamidas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	93
5.2.2 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> das selenoglicolicamidas sobre amastigotas axênicas de <i>Leishmania infantum</i>	97
5.2.3 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas e amastigota axênica de <i>L. infantum</i> expostas a selenoglicolicamida MSe 13	99
5.2.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos seleoglicolicamidas em células de mamíferos e índice de seletividade.....	104
5.2.5.1 Citotoxicidade em eritrócitos humanos	104
5.2.5.2 Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares do sistema periférico expostas a selenoglicolicamida MSe 13	105
5.3 RESULTADOS: DERIVADOS ACRIDÍNICOS	107
6. DISCUSSÃO.....	113
7. CONCLUSÃO	124
REFERÊNCIAS	126
APÊNDICE	138

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas entre mamíferos por dípteros da família Psychodidae fêmeas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A infecção por *Leishmania* afeta humanos e diversos animais domésticos e tem grande impacto na saúde pública com morbidade e mortalidade significativos (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

Existem duas formas principais da doença: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar. LT é a forma mais comum, e a LV é a forma mais grave da doença. Em 2018, 92 e 83 países ou territórios foram considerados endêmicos ou haviam relatado casos de LT e LV, respectivamente, e estima-se que a prevalência mundial de todas as formas desta infecção é de cerca de 12 milhões de casos, com 1,5–2 milhões adicionados novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral todos os anos. Além disso, cerca de 60.000 mortes devido a estas doenças parasitárias têm sido relatadas anualmente no mundo. Apesar do diagnóstico incorreto e da subnotificação, espera-se que os casos reais sejam maiores (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

Essa doença prospera em áreas onde o acesso a cuidados de saúde, saneamento e água potável são inadequados, atingindo pessoas pobres da sociedade. Compreender a complexa interação entre fatores socioeconômicos, culturais, demográficos e ecológicos nesses ambientes é parte do desafio de vencê-los (THE LANCET GLOBAL HEALTH, 2020).

Durante décadas, a leishmaniose visceral foi tratada por fármacos antimonimais pentavalentes (SbV): o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]), não parecendo existir diferenças quanto à eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato meglumina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas. Os antimoniais são cardiotoxicos e podem induzir arritmias. Esse efeito adverso é particularmente evidente na coinfeção HIV-leishmaniose visceral (BRASIL., 2006; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Devido às limitações presentes nos tratamentos atuais, a busca por novos fármacos com atividade leishmanicida se faz necessária (LAMOTTE et al., 2017).

Muitos compostos contendo guanidina em suas estruturas foram sintetizados na última década mostrando potente atividade antimicrobiana, com alguns deles em desenvolvimento avançado de candidatos a fármacos ou mesmo em estudos de fase clínica (KIM; SEMENYA;

CASTAGNOLO, 2021a; LIU et al., 2011; MUTTATHUKATTIL et al., 2019; RD et al., 2019; REID et al., 2008). O grande interesse nas guanidinas, especialmente fármacos contendo guanidina, deve-se principalmente à sua capacidade de formar interações não covalentes com proteínas e alvos moleculares, por meio da ligação de ânions como carboxilatos, fosfatos, sulfetos através de ligações H, pareamento de cargas e interações catiônicas (KIM; SEMENYA; CASTAGNOLO, 2021b).

Já os compostos orgânicos contendo selênio em sua estrutura, tem-se destacado por sua atividade antioxidante, e efeitos antitumorais, prevenindo a angiogênese (DE QUEIROZ et al., 2020). A evidência de que compostos com comprovada atividade antiproliferativa contra o câncer foram escolhidas para testes como agentes leishmanicidas e demonstraram exibir efeitos potentes e seletivos contra algumas espécies de *Leishmania* (MARTÍN-MONTES et al., 2017).

Juntamente, os compostos de acridina têm chamado a atenção a partir de atividades biológicas já relatadas. Vários derivados de acridina, que mostraram uma forte atividade antiproliferativa, foram considerados promissores como agentes antitumorais e usados para terapia antiparasitária (CAROLE et al., 2005; DE LIMA SERAFIM et al., 2018; DELMAS et al., 2004; DI GIORGIO et al., 2007; MENEZES et al., 2019). Por muitos anos a estrutura planar dos anéis tricíclicos conferiu aos derivados de acridina a capacidade de se intercalar no DNA e interferir em vários processos metabólicos em células procarióticas e eucarióticas (BARROS et al., 2012; BELMONT; DORANGE, 2008; CAROLE et al., 2005; CHARMANTRAY et al., 2003; GAO et al., 2015; HEALD; STEVENS, 2003; PATEL; MALI; PATEL, 2010).

Desta forma, a importância no desenvolvimento biotecnológico de produtos mais eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais para o hospedeiro se faz necessário e de extrema importância para o controle, tratamento e prevenção desta doença. Os objetivos propostos para a busca de atividade anti-*Leishmania* e estudo dos mecanismos associados a esta atividade atua em duas frentes principais: (1) Avaliação dos derivados de guanidina e selenoglicolicamidas e acridínicos na atividade anti-*Leishmania* (2) Avaliação do composto mais promissor na influência na morte celular e produção de óxido nítrico em células humanas do sangue periférico, sendo possível validar o papel desses compostos como promissores no desenvolvimento biotecnológico de novos fármacos.

REFERENCIAL TEÓRICO

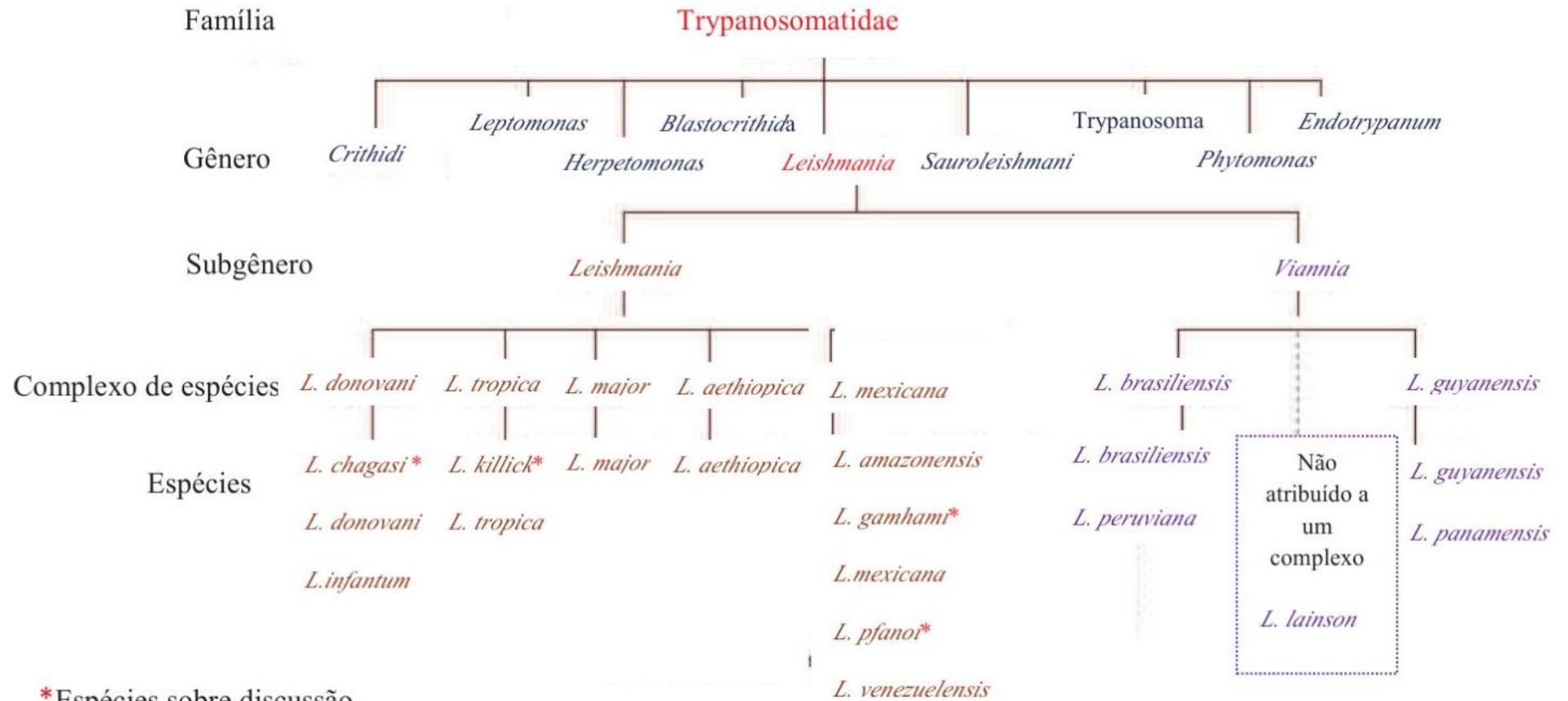
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose: parasito e vetor

A leishmaniose pertence ao grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que incluem várias doenças parasitárias, virais e bacterianas em cerca de mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, com maior presença nos países subdesenvolvidos das regiões de clima tropical e subtropical (WHO, 2021).

Em 2018, mais de 90 países foram considerados endêmicos ou haviam relatado casos de leishmaniose, países pobres do Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina, a leishmaniose também é endêmica em vários países mediterrâneos. Hoje, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e estão sob risco de infecção. Entre todas as doenças parasitárias, a mortalidade por leishmaniose perde apenas para a malária (PACE, 2014; WHO, 2021; THE LANCET GLOBAL HEALTH, 2020).

O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários tripanossomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida, e abrange mais de 20 espécies diferentes. Existe variação geográfica no (s) tipo (s) de espécie (s) entre países endêmicos com clima subtropical característico (figura 1). Inicialmente, apenas caracteres extrínsecos, como manifestações clínicas, distribuições geográficas, ciclos epidemiológicos e o comportamento de *Leishmania* em seus vetores de flebotomíneos, foram utilizados para discriminar as espécies de *Leishmania*. Assim, o gênero *Leishmania* foi subdividido em dois subgêneros: *Leishmania*, que é encontrada nas Américas, Ásia e África, e em *Viannia*, endêmica nas américas. Espécies distintas de *Leishmania* causam diferentes manifestações clínicas, e o resultado é determinado pela interação dos seguintes: características do parasita, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, com as respostas imunes sendo um fator chave nessa relação (AKHOUNDI et al., 2016b; PACE, 2014).

Figura 1. Taxonomia da *Leishmania* spp.

Fonte: ALONSO, 2014; BRASIL, 2017.

Os parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos aos humanos pela picada de um flebotomíneo fêmea infectado dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021). Noventa e três das cerca de 800 espécies conhecidas desses flebotomínios hematófago, conhecidos como mosquitos-palha, transmitem a leishmaniose. O vetor (figura 2), é um artrópode de 2 a 3 mm de comprimento, cuja cor varia do preto ao branco e são ativos nos meses quentes de verão (PACE, 2014).

Fora do hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida da *Leishmania* está confinado ao trato digestivo dos flebotomíneos. A localização precisa difere entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. As espécies do subgênero *Viannia* entram no intestino posterior antes de migrar para o intestino médio e, portanto, são chamados de parasitas peripilar. No entanto, a maioria das espécies de *Leishmania* (subgênero *Leishmania*) são parasitas suprapilar, pois seu desenvolvimento é restrito ao intestino médio (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). A saliva do vetor também contém várias moléculas com propriedades vasodilatadoras, anticoagulantes ou anti-inflamatórias. Essas moléculas são importantes para a alimentação sanguínea, mas também desempenham um papel crucial na transmissão da *Leishmania*. Ela possui características que modulam a resposta imune de um hospedeiro permitindo o estabelecimento da infecção por *Leishmania* (VOLF; HOSTOMSKA; ROHOUSOVA, 2008).

Figura 2. Flebotomínio vetor da leishmaniose



Fonte: Brasil, 2017.

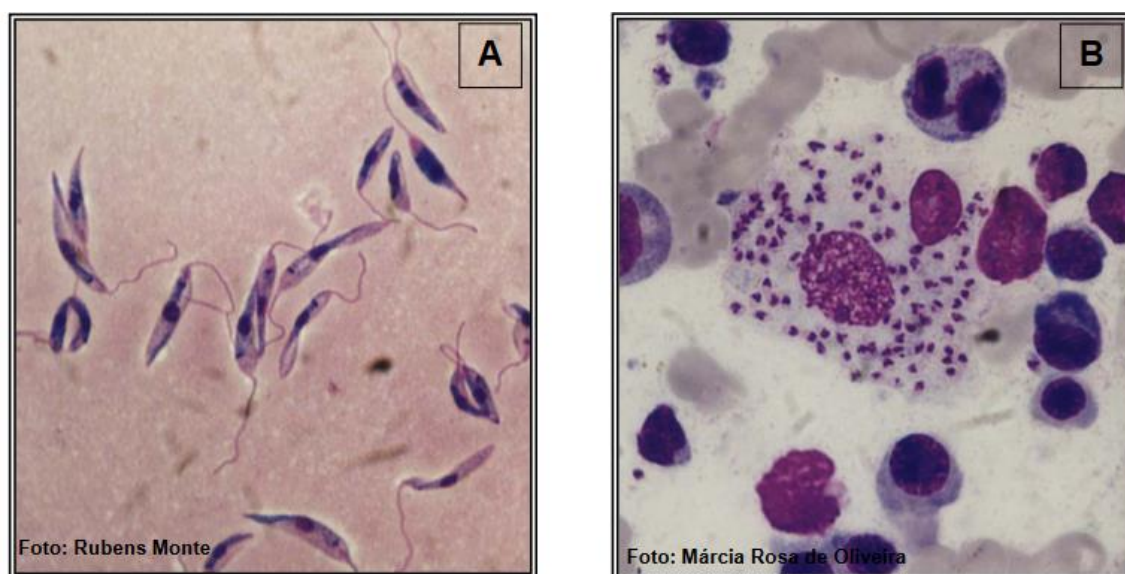
Apenas as fêmeas de flebotomíneos realizam repasto sanguíneo em mamíferos para

fazer as refeições necessárias para a conclusão do desenvolvimento do ovo. Alguns flebotomíneos têm uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo canídeos, roedores, marsupiais e hiracoides, enquanto outros se alimentam principalmente de humanos. Consequentemente, a leishmaniose humana pode ter padrões de transmissão zoonóticos ou antroponóticos. Em seu hospedeiro mamífero, os parasitas *Leishmania* vivem e se multiplicam em células fagocíticas dentro dos chamados fagolisossomos. Atualmente, existem 18 espécies diferentes de *Leishmania* descritas que são patogênicas para humanos (STEVERDING, 2017).

2.2 Ciclo biológico

A sobrevivência do parasita *Leishmania* depende do sucesso da transmissão zoonótica ou antroponótica entre o vetor e um reservatório. A transmissão zoonótica ocorre em ciclos domésticos, nos quais o cão é o reservatório principal, ou em ciclos silvestres, como nas florestas tropicais das Américas ou nos desertos da Ásia Central, onde a transmissão enzoótica ocorre entre animais selvagens, com humanos. Duas formas morfológicas principais são identificadas no ciclo de vida da *Leishmania*: a forma promastigota, flagelada e extracelular, de 15–20 μm de comprimento, e a forma amastigota, intracelular obrigatória, de 3–5 μm de comprimento presentes nas células da linhagem monócito-macrófago do hospedeiro mamífero (Figura 3). (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PACE, 2014)

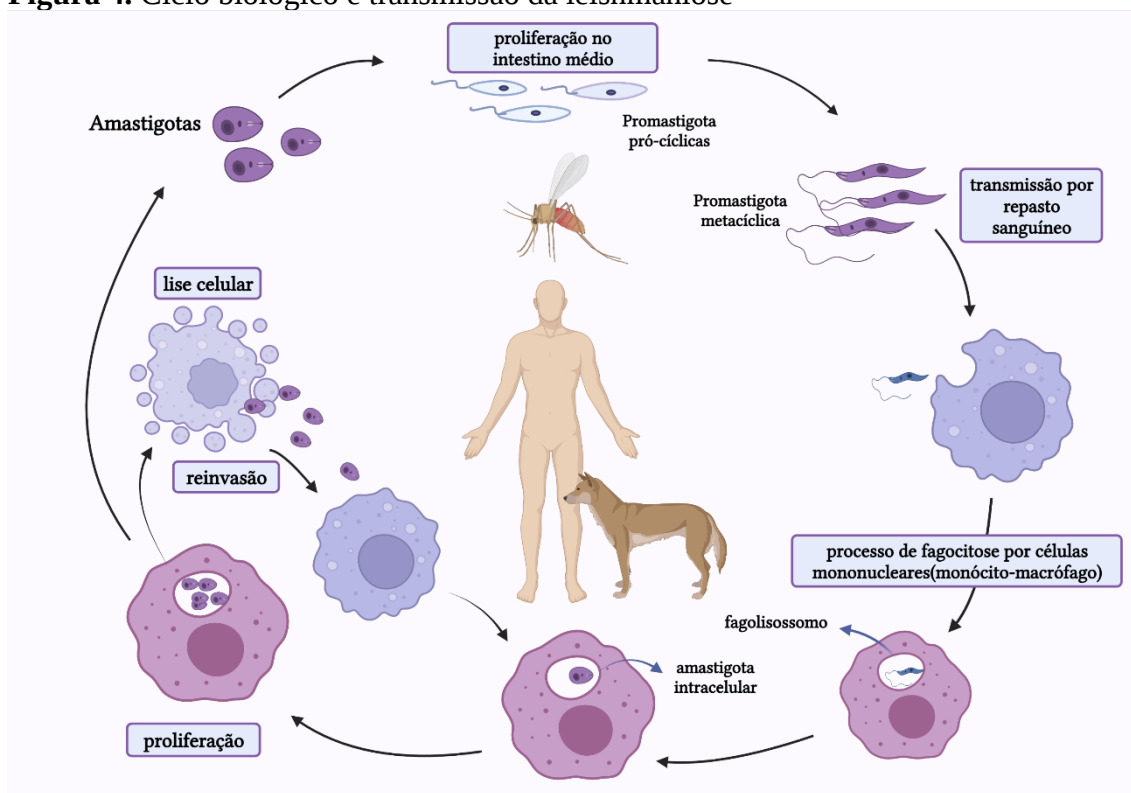
Figura 3. Formas promastigota e amastigota do gênero *Leishmania*.



Fonte: ROCHA, J.C. (2018). (A) Cultura de promastigotas de *L. infantum*. (B) Fotomicrografia de macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania*.

As *Leishmania* spp. possuem um ciclo de vida dimórfico (Figura 4), incluindo a forma promastigota metacíclica, sua forma mais infecciosa, na qual o parasita é transmitido pela picada do mosquito-palha fêmea infectado. As promastigotas são fagocitadas por células fagocíticas mononucleares do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Eles se diferenciam em amastigotas nessas células e que se desenvolvem e se multiplicam dentro do fagócito até serem liberados pela lise celular para infectar outros macrófagos, causando a doença. Os flebotomíneos ingerem as células infectadas durante o repasto sanguíneo (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; KAYE; SCOTT, 2011; PACE, 2014)

As amastigotas então se transformam em promastigotas dentro no intestino dos flebotomíneos. A alteração das condições no processo de deslocamento do hospedeiro mamífero para o intestino médio do mosquito (tal como diminuição da temperatura e aumento do pH) desencadeia na transformação morfológica e no desenvolvimento do parasita. No trato digestivo do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, forma avirulenta, fracamente móvel com um flagelo curto e que se replicam intensamente. Posteriormente os parasitas começam a retardar a sua replicação e passam a se diferenciar em nectomonada, de forte motilidade. Eles se movem em direção ao intestino médio anterior e depois se desenvolvem em leptomonadas, as quais se multiplicam intensamente resultando em um aumento da infecção no intestino anterior do inseto. Por fim, a *Leishmania* se transforma em estágios metacíclicos infecciosos. Metacíclicos são pequenas formas de rápida movimentação com flagelo alongado. A metaciclogênese em *Leishmania* é induzida in vitro por baixo pH e depleção de nutrientes (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KAUFER et al., 2017).

Figura 4. Ciclo biológico e transmissão da leishmaniose

Legenda: A forma promastigota procíclica de *Leishmania* spp. diferenciam-se em promastigotas metacíclicas infecciosas e não divisíveis no vetor, localizados prontos para transmissão na válvula estomodeal (uma invaginação do intestino anterior no intestino médio). Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita promastigotas metacíclicas, juntamente com proteofosfoglicanos derivados de parasitas imunomoduladores e vários componentes salivares. Promastigotas metacíclicos são então fagocitados por células fagocíticas no ambiente local. Após estabelecer uma residência intracelular, as promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas aflageladas. As amastigotas sofrem replicação dentro das células hospedeiras, que se rompem quando muitas amastigotas estão presentes, permitindo a reinfecção de fagócitos locais. O ciclo de transmissão está completo quando os fagócitos infectados são absorvidos por outro flebotomíneo com um novo repasto sanguíneo, e as amastigotas então se convertem em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo.

Fonte: Elaboração própria no site biorender.com

2.3 Epidemiologia da leishmaniose

A leishmaniose está disseminada em áreas tropicais e subtropicais e é encontrada em países da Europa, África, Ásia e América. No entanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem em apenas 13 países (Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria) (WHO, 2022).

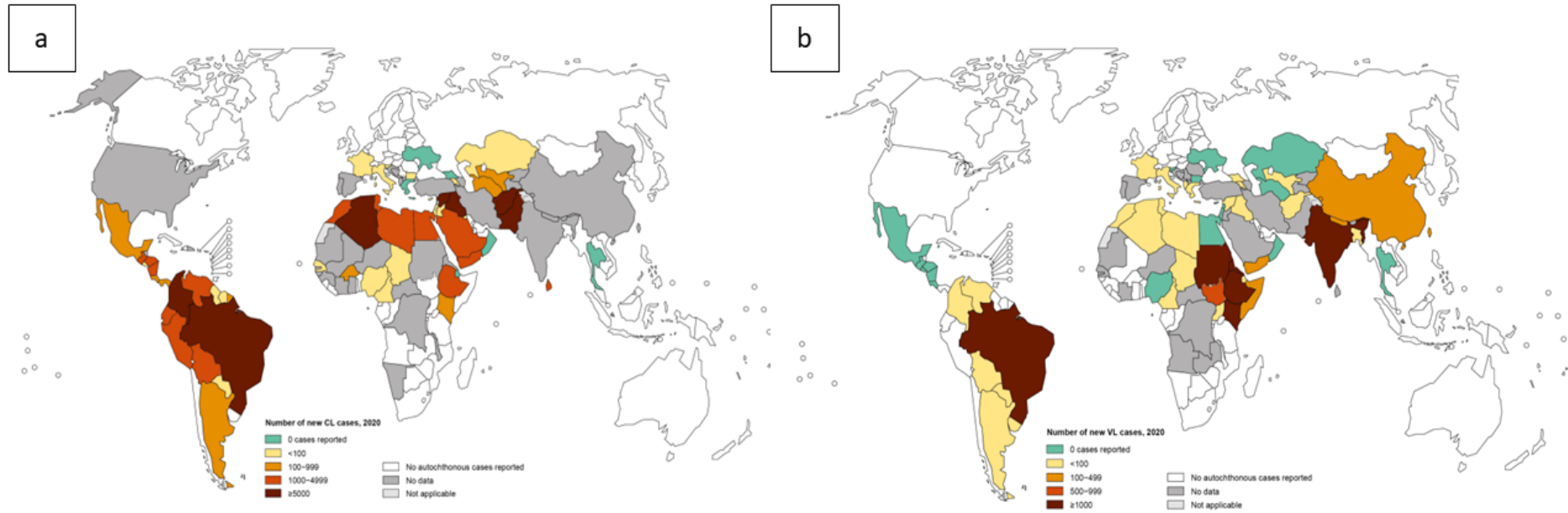
Estima-se que 0,7-1,2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT), ou leishmaniose cutânea, ocorram principalmente no litoral mediterrâneo, nas Américas e na Ásia ocidental, com cada região contribuindo com cerca de 30% dos casos, embora até 75% desses casos sejam encontrados no Brasil, Síria e Afeganistão. Cerca de 35.000 casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem anualmente, principalmente no Brasil, Peru e Bolívia (STEYERDING,

2017).

O número de casos mundiais de leishmaniose visceral é calculado para atingir até 200 a 400 milhares de pessoas por ano com uma porcentagem $> 90\%$ destes casos ocorrendo na Índia (principalmente no estado de Bihar, ao nordeste), Bangladesh, Brasil, Etiópia, Quênia, Somália, e Sudão. No entanto, a doença continua endêmica em mais de 60 países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se 500.000 casos de leishmaniose visceral todos os anos, além disso, cerca de 60.000 mortes devido a esta doença parasitária têm sido relatadas anualmente no mundo (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; PACE, 2014; WHO, 2021).

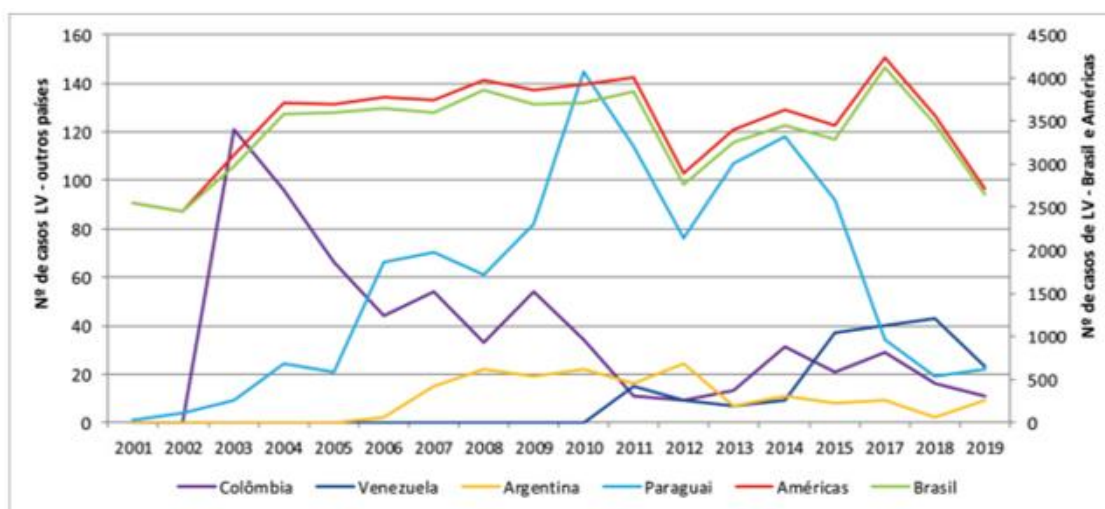
De acordo com a OMS, estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LT ocorram anualmente. Em 2019, 20.792 dos 22.145 (94%) novos casos notificados ocorreram em sete países (Figura 5), dentre os quais o Brasil se encontra como um dos países com maior prevalência dessa doença (Figura 6), sendo relatado também 2.529 casos para a LV e 15.485 para LT no ano de 2019, segundo o ministério da saúde (WHO, 2021). A LT ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, na média do país, predominam os maiores de 10 anos (92,5% do total de casos) e o sexo masculino (74% no ano de 2014) (BRASIL, 2017).

Figura 5. (A) Incidência da leishmaniose cutânea em todo o mundo no ano de 2020; (B) Incidência da leishmaniose visceral em todo o mundo no ano de 2020.



Fonte: WHO, 2021

Figura 6. Casos de leishmaniose visceral na região das Américas entre 2001-2019.



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses / Serviços de vigilância, 2020.

O verdadeiro número de casos da leishmaniose ainda é desconhecido devido à subnotificação da falta de sistemas de vigilância epidemiológica ou métodos de diagnóstico apropriados, onde a maioria dos dados de incidência disponíveis ainda é baseada em estimativas. A mortalidade resultante dessa doença é estimada em 10-20%, especialmente em áreas pobres sem assistência a serviços de saúde. Desde o início da pandemia de HIV na década de 1990, tem havido um aumento nos casos relatados de coinfeção *Leishmania*-HIV em áreas endêmicas, pois o HIV aumenta a suscetibilidade a infecção por LV. Os humanos são o principal reservatório da leishmaniose visceral para *L. donovani*. A doença é mais comum em vilas agrícolas, onde as casas geralmente possuem paredes de barro e piso de terra, e o gado é mantido sob o mesmo teto ou a uma curta distância, criando um nicho ecológico favorável para o vetor (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; STEVERDING, 2017).

O cão-doméstico (*Canis lupus familiaris*), na área urbana é o reservatório primário de *L. infantum*. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são o graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e na Amazônia. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia. (BRASIL, 2006). Já na leishmaniose tegumentar, reservatórios silvestres já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados,

quirópteros, e canídeos silvestres. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos como cães e gatos. LT nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes as da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2017).

2.3 Manifestações clínicas

A leishmaniose apresenta formas clínicas diferentes, onde o resultado de cada manifestação é determinado pela espécie do parasita infectante, pela suscetibilidade genética do hospedeiro e pela dependência das características da resposta imune mediada por células (BRASIL, 2017; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). De forma geral, a leishmaniose se divide em dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV).

A LT possui ampla distribuição mundial; no Brasil, a LT é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle. Mesmo com a diversidade de espécies de *Leishmania* envolvidas na LT, a manifestação clínica da doença depende não apenas da espécie envolvida, mas também do estado imunológico do indivíduo infectado. A LT divide-se em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LCD) e mucocutânea (LMC). No meio do espectro, a LC representa a manifestação clínica mais frequente (BRASIL, 2017). Nos países da América Latina, em especial, a LT é causada pelos complexos de espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

A leishmaniose tegumentar é a forma menos grave da doença e é causada por várias espécies, como *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo, enquanto a LC nas américas é causada por parasitas do complexo *L. mexicana* (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis*) ou o subgênero *Viannia* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*) em várias regiões da Central e América do Sul. A doença cutânea simples se apresenta como lesões ulcerativas ou nodulares singulares no local ou próximo ao local de exposição do inseto. Eles geralmente são encontrados em áreas descobertas do corpo, como rosto, antebraços e pernas, e evoluem ao longo de semanas a meses (AKHOUNDI et al., 2016; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Na LCD, como a causada por *L. amazonensis*, caracterizada por lesões nodulares de tamanho variável surgem frequentemente em vários locais, distantes do local de início da

exposição do inseto. Lesões cutâneas simples são geralmente autocuráveis, mas em alguns casos, como as causadas por *L. panamensis* e *L. braziliensis*, podem progredir para envolver tecido mucocutâneo (LMC). A LMC pode se manifestar de meses a anos após a resolução das lesões primárias. Muitas vezes, é uma infecção terrivelmente desfigurante, resultante da destruição local crônica de tecido do nariz, boca, oro e nasofaringe e pálpebras, e pode progredir para afetar a função respiratória e prejudicar a nutrição. Ela é encontrada em países da América do Sul, sendo a maioria das doenças encontrada no Brasil, Peru e Bolívia (AKHOUNDI et al., 2016; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

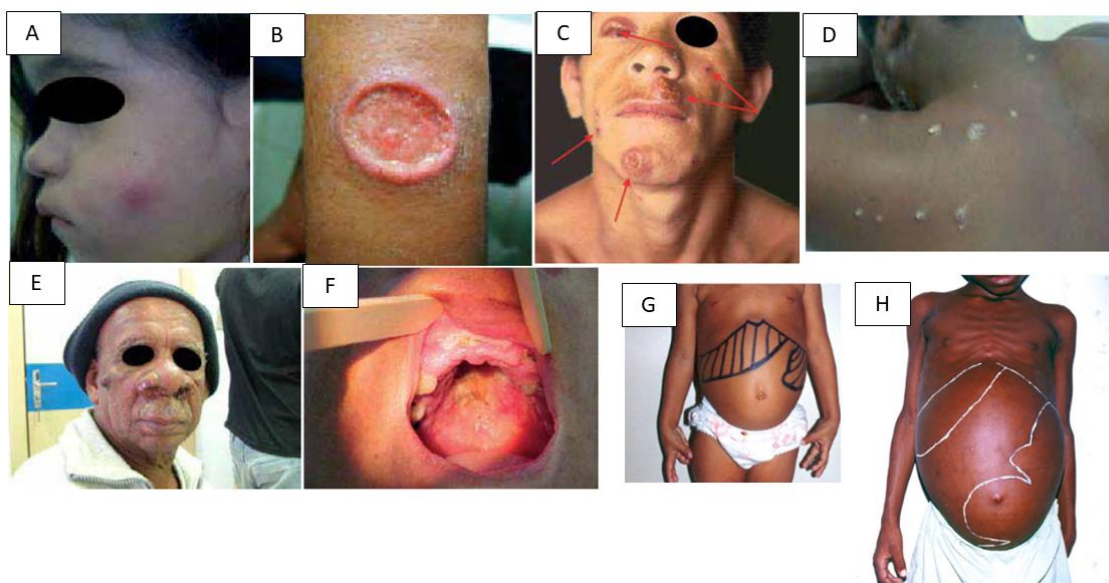
A forma mais grave das leishmanioses é a leishmaniose visceral, causada pelas espécies de *L. donovani*, presente na Ásia e África, e *L. infantum* na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul e América Central. Possui como principal reservatório o cão. A leishmaniose visceral também é conhecida como kala-azar (que significa febre negra em hindi) e afeta o fígado e o baço (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Como características clínicas dessa doença são o baço e fígado aumentados (hepatoesplenomegalia), perda de peso, febre irregular persistente, podendo atingir o sistema reticuloendotelial, sendo inevitavelmente fatal, se não tratada. Pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso são comuns, principalmente em pacientes que se tratados tardiamente. O início da leishmaniose visceral pode ser agudo ou insidioso, e o período de incubação é de 2 semanas a 8 meses. Sem tratamento, a doença costuma ser fatal em 2 anos, como resultado de infecção bacteriana secundária ou anemia grave, sendo ainda mais agravante em indivíduos imunossuprimidos. A coinfeção entre leishmaniose visceral e HIV é um dos maiores desafios para o controle dessa doença. HIV e *Leishmania* compartilham um mesmo mecanismo imunopatológico envolvendo macrófagos e células dendríticas, resultando na progressão acelerada de ambas as doenças devido ao aumento da replicação do patógeno (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Leishmaniose dérmica pós-calazar é uma manifestação cutânea que pode ocorrer após o tratamento da leishmaniose visceral por *L. donovani*. A fisiopatologia da leishmaniose dérmica pós-calazar está ligada a resposta imune contra parasitas dérmicos residuais, unidos a fatores de risco e tratamento ineficaz. A leishmaniose dérmica pós-calazar ocorre em 5–10% dos casos de leishmaniose visceral na Ásia, desenvolvendo-se 2–3 anos após o tratamento, ao passo que é observada em até 50% dos casos na África oriental, geralmente dentro de 1 ano de tratamento (ZIJLSTRA, 2016). Contudo as diferentes espécies de *Leishmania* sejam morfológicamente muito semelhantes, a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral, se manifesta de formas

diferentes dependendo dos tipos de células fagocíticas que são invadidas. Na LC, os parasitas infectam macrófagos residentes na pele. Quando a célula hospedeira está cheia de parasitas, há a lise celular e as amastigotas liberadas infectam macrófagos vizinhos. Na LV, entretanto, as amastigotas liberadas são disseminadas pela circulação sanguínea e infectam células do sistema fagocitário mononuclear (sistema reticuloendotelial) do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino (STEVERDING, 2017)

Figura 7. Formas clínicas da leishmaniose.



Legenda: (A) LCL, Lesão cutânea localizada em estágio inicial, com característica de placa infiltrativa (observar a ausência de ulceração nesta fase); (B) LCL, Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (C) LCD, LT – Forma cutânea disseminada, com acometimento facial, apresentando múltiplas lesões ulceradas com envolvimento de pálpebra; (D) LCL, apresentando múltiplas lesões pequenas e ulceradas nas costas; (E) LMC- Forma mucosa tardia –Edema nasal com áreas de ulceração – crostas no local e edema no lábio superior; (F) LCM- Forma mucosa tardia – Lesão ulcerada do palato mole, com bordas infiltradas recoberta por exsudato; (H) LV no período final, caracterizada pela febre contínua, desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca. Fonte: BRASIL (2017).

2.5 Diagnóstico da leishmaniose

Ensaios sorológicos estão disponíveis, incluindo teste de aglutinação direta, ELISA, imunofluorescência e *western blot*. Essas técnicas de detecção de anticorpos compartilham uma alta sensibilidade para doença visceral aguda, mas não são estritamente específicas para este estágio da doença. Os anticorpos diminuem lentamente após a cura e também estão presentes em um grande número de indivíduos infectados assintomáticos; portanto, os resultados sorológicos devem ser interpretados no contexto da história clínica. Os exames sorológicos, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são invariavelmente reativos e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativa (BRASIL, 2014; BURZA;

CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014).

Na leishmaniose tegumentar, as lesões cutâneas causadas por *Leishmania* podem ser confundidas com picadas de artrópodes infectados, impetigo, infecções dermatófitas, infecções micobacterianas cutâneas, esporotricose (especialmente se houver linfadenopatia local) e em adultos, doenças malignas da pele. O diagnóstico clínico deve ser complementado por pesquisa direta ou IDRM (Teste intradérmico Intradermoreação de Montenegro ou da *Leishmania*). Tendo em vista o número de doenças que faz diagnóstico diferencial com a LT, nos casos em que o diagnóstico não for conclusivo pelos métodos anteriores, o paciente deverá ser investigado por outros métodos de diagnósticos. A leishmaniose cutânea / PKDL (*post-kala-azar dermal leishmaniasis*) pode ser diagnosticada clinicamente, mas em caso de dúvida, a visualização de amastigotas na microscopia de esfregaços de pele em fenda ou biópsias é confirmatória. O ensaio de PCR pode diagnosticar em situações em que a carga parasitária pode ser baixa como na doença cutânea em imunossuprimidos ou em infecções mucosas. Como os anticorpos anti-*Leishmania*, que muitas vezes são positivos na doença cutânea, o teste cutâneo da *Leishmanina*, um marcador de hipersensibilidade do tipo retardado a *Leishmania*, não diferencia a exposição passada de doença ativa (BRASIL, 2014; PACE, 2014).

Na leishmaniose visceral, a esplenomegalia febril é uma característica de várias doenças infecciosas, porém a suspeita clínica de leishmaniose visceral precisa ser confirmada. O diagnóstico clássico é através da observação microscópica do estágio do parasita amastigota em amostras de tecido ou culturas. O aspirado de medula óssea e do baço geralmente mostram presença de formas amastigotas do parasita. A visualização de amastigotas no esfregaço de medula óssea é diagnóstica, mas tem uma sensibilidade de apenas 60-85%. Na forma oligossintomática, que apresenta poucos ou leves sintomas, a punção aspirativa de medula óssea pode ou não mostrar a presença da *Leishmania*, não sendo, a princípio, indicada a sua realização; a IDRM pode estar positiva e a sorologia é, invariavelmente, reagente. A sensibilidade depende do tecido: acima de 90% no baço, 50-80% na medula óssea e ainda mais baixa nos aspirados de linfonodo. As amostras de sangue têm baixa sensibilidade, exceto em pacientes coinfectados com HIV, que apresentam uma parasitemia mais elevada. Os aspirados esplênicos são considerados o padrão ouro, mas o procedimento apresenta risco de hemorragia alto (BRASIL, 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PACE, 2014).

2.6 Relação parasito x hospedeiro

As diversas manifestações clínicas da *Leishmania* são resultado da interação entre o tipo de espécie infectante e a resposta sistema imune do hospedeiro. Algumas espécies como a *Leishmania major*, por exemplo, causam manifestações cutâneas, enquanto que a *Leishmania infantum* resulta na leishmaniose visceral. Essa variabilidade é provavelmente secundária a diferenças genômicas adquiridas durante a evolução da *Leishmania*, tornando algumas espécies mais adaptadas para atingir a pele e outras para invadir órgãos viscerais (PACE, 2014). A partir da picada do flebótomo infectado, ocorre a inoculação de *Leishmania* junto de componentes da saliva desse vetor que irão desencadear uma resposta do hospedeiro ao agente infectante. Mecanismos de resposta imune inata a princípio é o ponto de partida da relação parasito e hospedeiro durante infecção.

As manifestações clínicas da leishmaniose também são influenciadas pela capacidade do hospedeiro de construir uma resposta imune inata e adaptativa eficaz, uma interação complexa e incompletamente elucidada que é amplamente determinada tanto por fatores genéticos quanto adquiridos. A imunidade inata e adaptativa têm um papel crucial nesta infecção. Uma imunidade inata é iniciada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK), citocinas e proteínas do sistema complemento (SCORZA et al., 2017).

Inicialmente durante a infecção, os parasitas são encontrados principalmente em neutrófilos e posteriormente em macrófagos. As promastigotas de *Leishmania* sobrevivem nos neutrófilos, mas não se diferenciam em amastigotas. Assim, a infecção de neutrófilos é transitória e após a apoptose dos neutrófilos, os parasitas podem infectar outras células fagocíticas subsequentemente, como monócito/macrófagos e células dendríticas. O macrófago é uma célula hospedeira importante para o estabelecimento da infecção e persistência do parasita (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Macrófagos e células dendríticas que fagocitam *Leishmania* ativam sua sinalização via TLR-9 e produzem interleucina IL-12, que estimula as células NK a produzir interferon-gama (IFN- γ). Na imunidade adaptativa, os linfócitos T CD4 + desempenham um papel crítico no controle da infecção por meio de uma interação com células apresentadoras de antígenos expostas aos protozoários de *Leishmania* que resultam na liberação de IFN-gama. O IFN- γ é uma citocina chave responsável pela resposta Th1 (linfócitos T do tipo “*t helper*”), perfil pró-inflamatório, e estimular macrófagos ativados a produzir ROS, *reactive oxygen species* (espécie reativa de oxigênio), e óxido nítrico sintase (iNOS), que convertem arginina em óxido nítrico resultando na morte intracelular de amastigotas. Condições imunossupressoras adquiridas

podem modular a expressão da leishmaniose (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021; PACE, 2014). A secreção de citocinas com perfil anti-inflamatório como interleucina-10 (IL-10), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) e Fator de Crescimento Transformador (TGF- β) está relacionado a um mecanismo de resistência da *Leishmania* dentro dos macrófagos. Essas citocinas reduzem a iNOS e levam à sobrevivência da *Leishmania* e sua proliferação dentro dos macrófagos (HAMIDI et al., 2021; ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Portanto, a imunidade inata e adaptativa têm um papel crucial nesta infecção. A ativação da imunidade celular é de suma importância na compreensão dos mecanismos celulares de defesa ao parasito. Compreender e identificar os fatores de risco pode ser importante para melhorar as estratégias terapêuticas e no desenvolvimento de vacinas.

2.7 Tratamento da leishmaniose

O tratamento medicamentoso para leishmaniose disponível no mercado é bastante limitado, em que os fármacos antimoniais pentavalentes (SbV), o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) têm sido considerados como fármacos de primeira escolha para o tratamento (Figura 8). Os derivados SbV só foram introduzidos a partir da década de 40, contudo no Brasil a única formulação disponível é o antimoniato meglumina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas, e estas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz, para evitar problemas na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2014; DE SOUZA et al., 2020; PONTE-SUCRE et al., 2017).

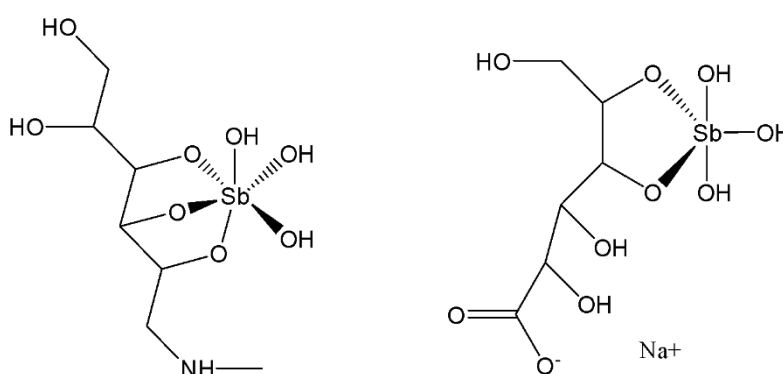
Esses compostos SbV possuem uma janela terapêutica estreita e alta toxicidade. Seu uso foi amplamente substituído na Índia, onde a resistência se tornou generalizada. No entanto, eles ainda estão em uso em outras regiões do mundo, incluindo América Latina e África Oriental (PONTE-SUCRE et al., 2017a). Os efeitos adversos dos antimoniais são bem conhecidos: toxicidade pancreática, artralgia, mialgias, dores abdominais, diarreia, e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária, erupções na pele, hepatotoxicidade (pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados), distúrbios cardiológicos, anorexia, náusea e vômito. Além disso, pacientes co-infectados com HIV/leishmaniose apresentam efeitos colaterais pronunciados, altas taxas de falha, recaída e aumento da mortalidade durante a terapia com SbV (COTA et al., 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018).

A via de administração parenteral destes medicamentos implica na necessidade de

profissional enfermeiro para realização de tal procedimento. Preconiza-se que todos os pacientes realizem o exame eletrocardiográfico (ECG) uma vez por semana (total de 3 ECGs por paciente) e uma cuidadosa ausculta cardíaca diária durante todo o tratamento, com o objetivo de detectar arritmias, o que exige a presença de um médico, trazendo um impacto orçamentário quando se trata do Sistema Único de Saúde no Brasil (CONITEC, 2018).

Apesar de ser o medicamento mais utilizado contra a leishmaniose, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está claro. Sugere-se que os SbV se comportariam como um pró-fármaco que sofre redução dentro da célula para a sua forma ativa de antimonial trivalente (SbIII), contendo um íon metálico com alta afinidade para ligantes com nitrogênio e sulfidrilas. Os mecanismos anti-*Leishmania* do SbIII provavelmente estão relacionados à sua interação com biomoléculas contendo sulfidrilas, incluindo tióis, peptídeos, proteínas e enzimas (FRÉZARD et al., 2013).

Figura 8. Estrutura do antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B), respectivamente



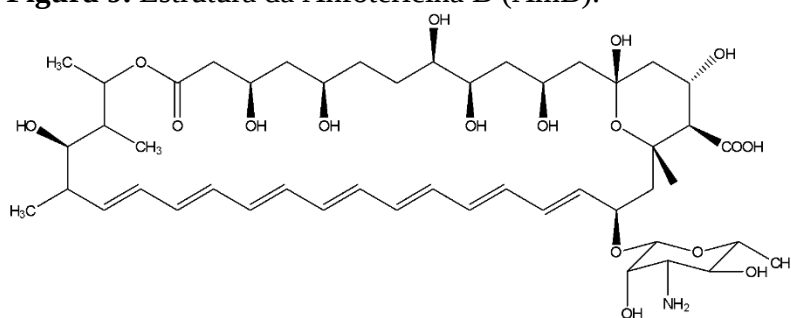
Fonte: FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009.

A anfotericina B (AmB) tem sido utilizada para o tratamento da leishmaniose e é o fármaco de escolha em algumas partes do mundo. Descoberta em 1956, é um anfifúngicomacrolídeopoliênico que se mostrou mais promissor contra a LV. Sua formulação lipossomal, Ambisome, foi usada na Índia para superar o número crescente de casos de LV. A AmB controla as infecções por *Leishmania* através de dois mecanismos distintos. A primeira inclui a auto-oxidação, levando à produção de radicais livres. O segundo mecanismo requer interação com o ergosterol presente na membrana de *Leishmania*, modificando a permeabilidade da membrana celular, que conseqüentemente promove um influxo de íons no parasita, tanto promastigotas quanto amastigotas, levando a morte celular (GOTO; LINDOSO, 2010; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018).

Em casos de pacientes com qualquer grau de insuficiência renal, o fármaco de escolha

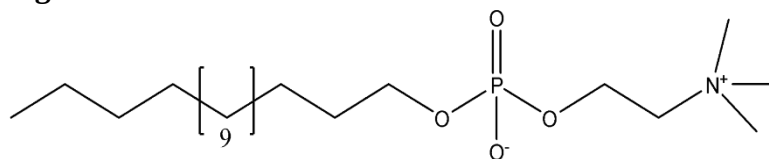
é o desoxicolato de anfotericina B (Figura 9) ou sua fórmula lipossomal. Diante da ausência de estudos conclusivos sobre a teratogenicidade dos antimoniais no período gestacional, a anfotericina B também é fármaco de escolha para tratamento da leishmaniose durante a gravidez (WHO, 2021). Ainda assim, a Anfotericina B é altamente tóxica, exigindo administração intravenosa, e é contraindicada em cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas. Os efeitos adversos mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (GOTO; LINDOSO, 2010).

Figura 9. Estrutura da Anfotericina B (AmB).



Fonte: (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

A miltefosina constitui o único tratamento oral disponível para tratamento da leishmaniose, o que facilitaria o acesso e a adesão ao tratamento da doença, visto que o paciente poderia ser tratado em sua própria residência e o medicamento poderia ser dispensado logo após o diagnóstico. Porém, apresenta como critério de exclusão a teratogenicidade. A miltefosina (Figura 10) pode provocar danos ao feto, incluindo morte fetal em animais; portanto, não deve ser utilizada por gestantes e na lactação. A miltefosina é um fármaco antineoplásico e sua atividade anti-*Leishmania* foi identificada pela primeira vez na década de 1980. Este fármaco elimina o parasita *in vitro* e *in vivo*, alterando as vias de sinalização e a síntese da membrana celular, levando à apoptose. Os efeitos adversos da miltefosina incluem alterações gastrointestinais e, menos frequentemente, hepatotoxicidade (ROATT et al., 2020; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Figura 10. Estrutura da Miltefosina.

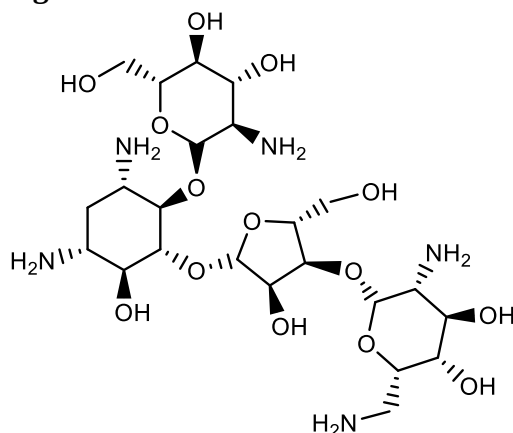
Fonte: NAGLE et al., 2014.

Este medicamento é comercializado em duas apresentações: 10 mg e 50 mg do fármaco em cápsulas. Atualmente, o medicamento ainda não possui registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), razão pela qual, o Ministério da Saúde (MS) a adquire via excepcionalidade de importação intermediada pela Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS/OMS. A Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde deliberou a incorporação da miltefosina no SUS como uma das opções de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar (CONITEC, 2018).

Além disso, foi relatado a combinação entre o AmBisome em baixa dosagem (30mg/kg) e a Miltefosina (100mg/dia) para o tratamento da leishmaniose visceral em pacientes coinfectados com HIV na Etiópia durante 28 dias. Os resultados foram promissores, a estratégia de tratamento com o regime de combinação mostrou a maior eficácia documentada nos pacientes tratados (DIRO et al., 2019).

Já a paromomicina, é um antibiótico aminoglicosídeo que interfere na síntese de proteínas e modifica a fluidez da membrana mitocondrial inibindo a respiração celular. Os aminoglicosídeos são eficazes contra várias espécies bacterianas e também estão sendo usados por via oral contra parasitas entéricos, como ameba, giárdia e tênia. Esse fármaco tem sido utilizado no tratamento tópico e sistêmico para LC e de uso sistêmico para LV em algumas regiões da Índia. A paromomicina foi licenciada pelo governo indiano para tratamento da LV, no entanto, ela apresentou eficácia limitada como monoterapia na África Oriental. Os efeitos adversos da terapia sistêmica incluem dor e queimação no local da aplicação, baixa hepatotoxicidade e ototoxicidade (ROATT et al., 2020; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018).

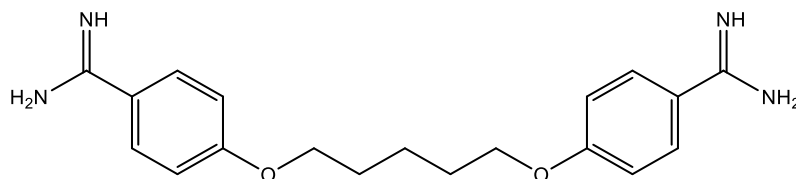
Figura 11. Estrutura da Paromomicina.



Fonte: NAGLE et al., 2014.

Quanto a posologia dos tratamentos (Quadro 1), na leishmaniose tegumentar do Novo Mundo, a maioria dos pacientes é tratada com SbV 20 mg/kg/dia por 20 dias (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Na leishmaniose visceral, durante décadas foi tratada com monoterapia com antimonial pentavalente, e o aumento da falta de resposta na Índia levou a recomendações de dosagem aumentadas, por injeção intramuscular ou infusão intravenosa ao longo de 28-30 dias. Os efeitos cardiotoxicos são particularmente evidentes na coinfeção HIV-leishmaniose visceral (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021). Já a miltefosina foi registrada pela primeira vez para o tratamento da LV na Índia após um ensaio clínico de fase III, no qual a dose de 50-100 mg/dia por 28 dias resultou em uma taxa de cura de 94% (ROATT et al., 2020)..

Outro fármaco utilizado na clínica é o Isotionato de pentamidina (Figura 12). Ele foi sintetizado pela primeira vez no final da década de 1930 e inicialmente utilizado para o tratamento da LV antes da década de 1950; e então, posteriormente no tratamento da forma resistente da leishmaniose tegumentar no final da década de 1970. De acordo com a maioria das diretrizes, ainda é a opção de primeira linha para *L. guyanensis* e *L. panamensis*. Além disso, é recomendado pela OMS para LC difusa causada por *L. aethiopica* (PICCICA et al., 2021). O isotionato de pentamidina é administrado por via intramuscular ou, de preferência, por infusão intravenosa. Seu mecanismo de ação se ocorre pela inibição da síntese de DNA do parasita, modificando a morfologia do cinetoplasto, que promove a fragmentação do sistema mitocondrial, eliminando-o. Hipoglicemia e hiperglicemia são os principais efeitos adversos da pentamidina, no qual limitam o seu uso (GOTO; LINDOSO, 2010; NEVES et al., 2011; BHATTACHARYA et al, 2004; SUNDAR et al, 2006).

Figura 12. Estrutura molecular da Pentamidina.

Fonte: CROFT et al., 2006.

Quadro 1. Estratégias convencionais para o tratamento da leishmaniose recomendadas pela Organização Mundial da Saúde

Leishmaniose visceral	
<i>Leishmania</i> spp.	Abordagem terapêutica
<i>L. donovani</i> no subcontinente indiano	Anfotericina B lipossomal: dose de 3-5 mg/kg diariamente por infusão administrada durante um período de 3-5 dias (dose total de 15 mg/kg) ou 10 mg/kg como dose única por infusão
<i>L. donovani</i> na África Oriental	Antimoniais pentavalentes (20 mg SbV/kg/dia por via intramuscular ou intravenosa) + paromomicina (15 mg (11 mg base)/kg/dia por via intramuscular), ambos por 17 dias
<i>L. infantum</i> : Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul	Antimoniais pentavalentes (20 mg SbV/kg/dia por via intramuscular ou intravenosa) por no máximo 30 dias, não ocorrendo intervalos superiores a 72 horas entre as doses.
Leishmaniose cutânea*	
<i>Leishmania</i> spp.	Abordagem terapêutica
<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i>	Terapia local: pomada de paromomicina a 15%/cloreto de metilbenzetônio a 12% duas vezes ao dia por 20 dias ou antimoniais intralesionais (1 a 5 ml por sessão) a cada 3 a 7 dias (1 a 5 sessões) Terapia sistêmica: antimoniais pentavalentes (como acima) por 10 a 20 dias
<i>L. aethiopica</i>	Terapia sistêmica: antimoniais pentavalentes (como acima) por 10-20 dias + paromomicina (como acima) por 60 dias ou mais para tratar a leishmaniose cutânea difusa
<i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L.</i>	Terapia local: pomada de paromomicina a

<i>panamensis</i> , <i>amazonensis</i> , <i>Venezuelensis</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L.</i>	15%/cloreto de metilbenzetônio a 12% duas vezes ao dia por 20 dias Terapia sistêmica: Antimoniato de meglumina: 15mg SbV/kg/dia por 20 dias endovenosa ou intramuscular Anfotericina B lipossomal: dose total de 20mg a 40mg/kg (LCL) e 35-40mg/kg (LCD) Desoxicolato de anfotericina B: dose total de 25mg a 40mg /kg
---	--	--

Fonte: (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017; ROATT et al., 2020) adaptado.*A estratégia de tratamento mais utilizada para LC. No entanto, o tratamento da LC varia de observação, localidade, terapia local ou sistêmica, dependendo da gravidade das lesões, espécie etiológica e seu potencial para evoluir para leishmaniose mucosa.

2.8 Resistência à fármacos e o incentivo a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e o desenho racional de fármacos para leishmaniose

É notório que nas últimas décadas a resistência a medicamentos tem apresentado sérios desafios em seu uso para o tratamento da leishmaniose. Em geral, a resistência é definida como um declínio na eficácia de um fármaco contra uma população de microrganismos previamente susceptíveis a esse composto. Esta definição pressupõe que a susceptibilidade original da população é conhecida, o que nem sempre é o caso da *Leishmania* (PONTE-SUCRE; 2003). Grande parte dos pacientes com LV no subcontinente indiano já apresentaram resistência aos antimoniais, o que levou à proibição desses fármacos em Bihar, Índia . (BARRETT et al., 2019; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018).

Além da resistência, a toxicidade hepática e renal geram consequências na saúde desses pacientes ao longo da vida. Seis décadas de uso de antimoniais proporcionaram ao parasita tempo suficiente para desenvolver mecanismos de resistência, incluindo prevenção da ativação desses fármacos, diminuição da absorção no parasita, aumento do efluxo do fármaco e alta carga de tóxicos nos macrófagos, o que aumenta o estresse oxidativo na célula hospedeira. (BARRETT et al., 2019; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2018).

As propriedades farmacocinéticas de um fármaco também podem determinar a sua eficácia, pois os locais de infecção na leishmaniose englobam os órgãos viscerais (medula óssea, fígado e baço), a pele ou a mucosa nasal. Os estudos a respeito do metabolismo desses fármacos são limitados. Estudos experimentais sugerem que a própria infecção na LV pode alterar o metabolismo do fármaco ao diminuir os níveis de citocromo P450 no tecido hepático,

por exemplo (COOMBS et al., 1990; SAMANTA et al., 2003).

A falha no tratamento e a resistência à fármacos diz respeito a fatores do hospedeiro (na interação imune-resposta do fármaco no hospedeiro ou estado nutricional), do parasita (por exemplo, se o parasita reside ou não em tecidos não acessíveis aos fármacos) e ao meio ambiente influenciando os resultados do tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; PONTE-SUCRE et al., 2017b). Ademais, as diferenças entre indivíduos estão presentes na maioria dos fármacos, e respostas estratificadas são claramente observadas para as leishmanioses. Exemplos incluem a comparação de crianças *versus* adultos ou homens *versus* mulheres (DORLO et al., 2012, 2014; OSTYN et al., 2014).

Não obstante, a resistência aos fármacos utilizados é um determinante fundamental do resultado do tratamento, e entender os mecanismos pelos quais os parasitas se tornam resistentes aos medicamentos é essencial (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Tem sido relatado que os parasitas de *Leishmania* resistentes aos Antimoniais (SbIII) possuem algumas vias de mecanismos de resistência como: diminuição da absorção do fármaco por regulação negativa dos transportadores aquaporina (AQP1); no seu mecanismo de ação, o antimônio pentavalente (SbV) deve ser reduzido à sua forma trivalente (SbIII) para a atividade. Parte dessa redução ocorre dentro do macrófago hospedeiro, e o SbIII resultante entra através do transportador de membrana AQP1. A superexpressão de AQP1 torna os parasitas hipersensíveis a SbIII, enquanto a deleção do gene os torna resistentes, e níveis reduzidos de expressão de AQP1 também estão relacionados à resistência (MANDAL et al., 2010; MARQUIS et al., 2005).

Outro mecanismo que acontece a inibição da ação dos antimoniais através da formação de um complexo tiol-SbIII, sequestrando conjugados tiol-metal em vesículas intracelulares, inativando-o. Ademais, permitindo a ação da tripanotona, uma importante molécula envolvida na resposta antioxidante; o aumento do efluxo dos SbIII pela superexpressão de transportadores ABC que transportam o complexo tiol-SbIII em direção às vesículas que são secretadas via exocitose. A superexpressão de transportadores ABC confere resistência antimonial tanto em amastigotas quanto em promastigotas, sequestrando conjugados tiol-metal em vesículas intracelulares. Por fim, a remodelação do metabolismo lipídico, que tem sido documentado em parasitas resistentes a SbIII, provavelmente para otimizar o metabolismo energético e modificar a composição da membrana celular (BASU et al., 2008; BERG et al., 2013; GUTIERREZ GUARNIZO et al., 2021; JEDDI; PIARROUX; MARY, 2011; KARAMYSHEVA; GUARNIZO; KARAMYSHEV, 2020)

Ademais, Gutierrez e colaboradores (2021) relataram que parasitas resistentes e sensíveis a SbIII mostraram mudanças significativas na composição de metabólitos, como prolina e lactato, o que sugere-se que o desenvolvimento de resistência ao SbIII envolve uma resposta otimizada ao estresse osmótico/oxidativo induzido pelo fármaco, bem como um rearranjo do metabolismo celular necessária para manter a resposta antioxidante ativa. (GUTIERREZ GUARNIZO et al., 2021)

Quanto a paromomicina, tem-se um alcance de ação relativamente restrito a espécies de *Leishmania*, e em relação à resistência no campo não é clara, embora isolados resistentes derivados de laboratório tenham sido criados (PONTE-SUCRE et al., 2017). Já é relatado os primeiros casos de falha no tratamento com a Anfotericina B na Índia, e em caso de coinfeções HIV-*Leishmania* (MORIZOT et al., 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017; PURKAIT et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2011). Também em estudos de laboratório, já foi possível selecionar a resistência Anfotericina B em várias espécies de *Leishmania*, e as formas promastigota e amastigota do parasita resistente ao Anfotericina B foram selecionadas (PURKAIT et al., 2012).

Os mecanismos moleculares que causam resistência aos antileishmânicos, o uso adequado dos medicamentos adicionais disponíveis, bem como a necessidade urgente de consolidar estratégias de monitoramento da eficácia dos medicamentos, vigilância epidemiológica e políticas locais (PONTE-SUCRE et al., 2017). O acesso a medicamentos para o tratamento das leishmanioses é um desafio para os países subdesenvolvidos que têm o maior número de casos. Embora esforços tenham sido feitos pela OMS, organizações não-governamentais e indústrias para melhorar o acesso a medicamentos, o problema do acesso a medicamentos persiste (WHO, 2021). No contexto dos sistemas de saúde enfraquecidos em muitos destes países, vários fatores contribuem para a falta de acesso a medicamentos, dentre os quais:

- Os medicamentos são relativamente caros e, portanto, muitas vezes inacessíveis;
- Os protocolos nacionais de tratamento geralmente não refletem nos desenvolvimentos mais recentes, e poucos ou nenhum destes tratamentos estão incluídos na lista de medicamentos essenciais nacionais;
- Medicamentos para os quais os preços preferenciais foram negociados para países de baixa renda nem sempre são registrados pelas empresas desses países, pois não há mercado lucrativo.
- O fornecimento de medicamentos não é contínuo. A maioria dos medicamentos para a leishmaniose é produzida por apenas um único fabricante. Além de problemas com a qualidade, baixa capacidade de produção e falta de uma previsão adequada de

necessidades (resultando em longos prazos de entrega de encomendas) causam regularmente rupturas de estoque em países endêmicos. Não há estoques centrais que possam ser acessados nesses casos, e não há plataforma para indicar as necessidades de drogas. Sendo assim um grande desafio na estimativa da quantidade necessária globalmente e no planejamento adequado da produção de drogas.

A *iniciativa* Medicamentos para Doenças Negligenciadas, (DNDi sigla em inglês de Drugs for Neglected Diseases *initiative*) é uma organização sem fins lucrativos de Pesquisa e desenvolvimento (P&D) orientada pelas necessidades dos pacientes, que desenvolve tratamentos seguros, eficazes e acessíveis para milhões de pessoas em situação vulnerável que são afetados por doenças negligenciadas.

No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), por exemplo, integra no grupo DNDi e atua como observador permanente da iniciativa com uma equipe local permanente e diversos consultores (iDND, 2021). O principal objetivo é investigar sobre as condições e necessidades dos pacientes, estabelecer parcerias, implementar projetos e promover treinamento e capacitação de recursos humanos, para conduzir atividades pré-clínicas e clínicas de Pesquisa e Desenvolvimento na região visando melhores e novos tratamentos para os pacientes de doenças negligenciadas nos países da América Latina que concentram os esforços até o momento. Além disso, as Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo (PDP) estratégico do país busca estimular o desenvolvimento da rede de produção pública no País e do seu papel estratégico para o SUS, e reduz a dependência frente a produtos importados.

A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos evoluíram para um campo científico interdisciplinar, que funciona para integrar diversas disciplinas, como biologia, química, modelagem matemática, farmacocinética e ciências da computação, em uma tentativa de fornecer medicamentos novos e mais eficazes (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Retoma-se então a importância no desenvolvimento e na descoberta de novos candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose, eles devem ser eficazes, baratos, não teratogênicos e não apresentar efeitos colaterais adversos (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021), que proporcionem ao Ministério da Saúde a redução de gastos, e o acesso a população de forma mais efetiva.

2.9 Guanidina e seus derivados

As guanidinas são frequentemente usadas como base para a síntese de compostos

orgânicos. Compostos orgânicos que contêm o grupo guanidina em sua estrutura podem ser encontrados na natureza, como por exemplo no aminoácido arginina, bem como em muitos alcalóides naturais. Nas últimas décadas, o interesse em moléculas sintéticas e fármacos com grupamentos de guanidina aumentou exponencialmente (KIM; SEMENYA; CASTAGNOLO, 2021b).

Do mesmo modo, as guanidinas têm sido exploradas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças infecciosas e não infecciosas devido as suas características estruturais e moleculares. Características essas como a capacidade de realizar ligações de hidrogênio e de protonar em pH fisiológico no contexto de interação com alvos biológicos. Portanto, não é surpreendente que o grupo funcional guanidina encontre ampla aplicação na química medicinal e que as moléculas contendo guanidina sejam amplamente utilizadas. Agentes antimicrobianos, como os antibióticos estreptomicina, trimetoprima e clorexidina ou o antimalárico proguanil, contêm um grupo guanidina, e mirtapazina, fármaco antidepressivo derivado de guanidina (KIM; SEMENYA; CASTAGNOLO, 2021b; MUGURUZA et al., 2013; MUTTATHUKATTIL et al., 2019).

A presença de uma carga positiva, por exemplo, pode favorecer a ligação desses derivados de guanidina a alvos específicos ou levar à ruptura das membranas celulares em geral e da parede celular, em bactérias, por meio forte interação eletrostática entre suas cargas positivas e o envelope eletronegativo das bactérias. Essa ligação imediata aos componentes da membrana citoplasmática ou da parede celular leva à perda das biofunções dos fosfolipídios ou à ruptura da membrana e, eventualmente, à morte celular (PASERO et al., 2018).

Os derivados de guanidina tem mostrado potencial atividade para patógenos como bactérias, atuando como potenciais moduladores da resistência a antibióticos no tratamento de infecções resistentes por *Staphylococcus aureus* (DANTAS et al., 2018), atividade antifúngica (BAUGH et al., 2021; MANETTI et al., 2009), atividade antimalárica (LIU et al., 2011) e atividade antiparasitária in vitro contra *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi* (MARTINS et al., 2016).

Os compostos de guanidina investigados no presente estudo são compostos promissores para o tratamento da leishmaniose, pois já demonstraram potencial atividade *in vitro* e *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019). Quanto a síntese das guanidinas tri-substituídas, elas são produto da junção entre tioureias com benzilaminas, formando os compostos da série LQOFG estudados.

2.10 Selenoglicolicamidas e seus derivados

O elemento selênio (Se), foi descoberto em 1818 e é um oligoelemento essencial para o corpo realizar funções como crescimento, metabolismo e equilíbrio hormonal. No final da década de 1970 devido às descobertas de diversas enzimas que continham esse elemento em suas estruturas, suas atividades foram sendo relatadas, principalmente em enzimas antioxidantes. O selênio é conhecido principalmente por seu efeito antioxidante; pode servir como antioxidante para remediar doenças relevantes ao estresse oxidativo. A partir daí, cresceu o interesse pela pesquisa de compostos contendo selênio, com potencial atividade biológica (BAQUEDANO, et al., 2016; DE SOUSA LUIS et al., 2019).

O selênio existe no corpo humano na forma de selenoproteínas, que podem ser derivadas do selênio orgânico ou inorgânico ingerido. O selênio orgânico (principalmente selenometionina) e o selênio iônico (por exemplo, selenito e selenato) são altamente biodisponíveis, mas o selênio elementar é difícil de absorver pelo trato gastrointestinal, a menos que seja nanodimensionado. Atualmente, esse composto não é apenas utilizado como suplemento nutricional para prevenção e tratamento de doenças, mas também aplicado para liberação de drogas na forma de nanopartículas para potencializar os agentes terapêuticos veiculados (GUAN et al., 2018).

Esse elemento está presente em enzimas, em especial na Glutathione peroxidase (GPx) que está envolvida na degradação de hidroperóxidos de fosfolipídios nas biomembranas de células de mamíferos e, conseqüentemente, protegendo as membranas celulares da peroxidação lipídica (NOGUEIRA; BARBOSA; ROCHA, 2021). Os compostos organosselênio estão emergindo como uma nova classe de antioxidantes, atuando como imitadores da glutathione peroxidase (SINGH; KUNWAR, 2021). Estudos mostraram que o selênio, sozinho ou em combinação com outros antioxidantes, pode ter efeitos antitumorais, prevenindo a angiogênese e metástase em câncer de mama, próstata, colorretal, melanoma, fígado e pulmão, por exemplo (DE QUEIROZ et al., 2020).

A evidência de que compostos com comprovada atividade antiproliferativa contra o câncer foram escolhidas para testes como agentes leishmanicidas e demonstraram exibir efeitos potentes e seletivos contra algumas espécies de *Leishmania* (MARTÍN-MONTES et al., 2017). A atividade anti- *Leishmania* de compostos de selênio já foi relatada na literatura (BAQUEDANO et al., 2016; MARTÍN-MONTES et al., 2017; MORENO et al., 2011)

Uma série do grupo de compostos deste estudo em questão, duas séries de selenetos derivados de cloretos de N-fenilacetamidas e 7-cloro-quinolina, já apresentou atividade anti-*Leishmania* em questão para as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani*.

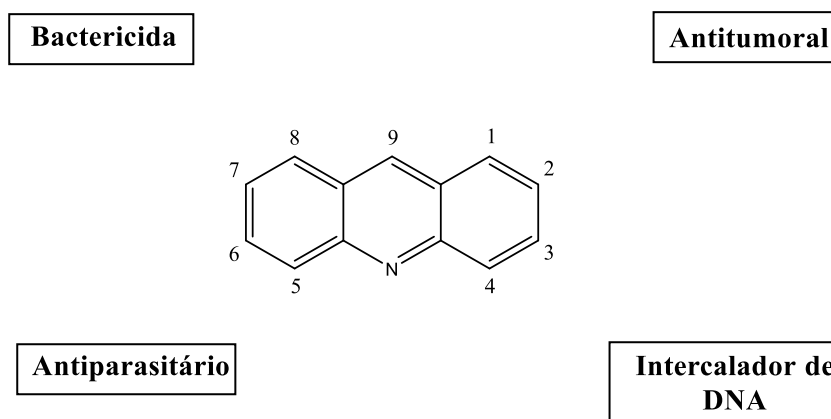
(HUANG et al., 2021).

2.11 Acridina e seus derivados

A acridina é um tipo de composto aromático policíclico com estrutura π -conjugada. Possui um único anel planar, heterocíclico contendo nitrogênio, sendo três anéis aromáticos com um deles heteroaromático (figura 13), e também podem ser chamados de dibenzo[*b,e*]piridina, benzo[*b*] quinolina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaaantraceno (GAO et al., 2015; SÁNCHEZ, 2006; SCHMIDT; LIU, 2015; ZHANG et al., 2014).

A acridina e seus derivados foram utilizados primeiramente como corante até o final do século XIX, porém foi a partir da Primeira Guerra Mundial, que suas propriedades farmacológicas foram avaliadas. Devido a essas propriedades moleculares, esses compostos atraíram o interesse de químicos medicinais em todo o mundo. Derivados de acridina e acridona também foram relatados para atuar em diferentes tipos de alvos moleculares terapeuticamente comprovados em células tumorais. Atualmente, mais e mais derivados de acridina vem sendo desenvolvidos como fármacos quimioterápicos (CHARMANTRAY et al., 2001; GAO et al., 2015; YADAV et al., 2022).

Figura 13. Estrutura química da acridina e suas atividades biológicas.



Fonte: SCHMIDT; LIU, 2015.

Os compostos acridínicos compartilham a propriedade comum da intercalação de DNA. Isto ocorre devido à presença do grupo cromóforo que dá a estas moléculas uma estrutura planar que lhes permite ligarem-se ao DNA por empilhamento entre pares de bases. Esta capacidade de intercalação confere às moléculas uma alta afinidade ao DNA, que geralmente é considerado como o alvo biológico para agentes anticâncer. A capacidade de causar um grande número de rupturas no DNA estimula processos metabólicos como recombinação e mutação, que desencadeia a morte celular (Apoptose) (CHARMANTRAY et al., 2001; LANG et al., 2013;

OLSZEWSKA et al., 2014; ZHAO et al, 2013). Ademais tem sido relatado a capacidade de induzir à inibição de enzimas nucleares como as topoisomerasas I e II (RAZA et al., 2012; YADAV et al., 2022)

A modificação química das acridinas, tais como a introdução de substituintes ou anéis heterocíclicos confere aos derivados acridínicos sintetizados a capacidade de intercalar o DNA, e além de interferir em vários processos metabólicos em procariotas e eucariotas, podendo exercer uma poderosa toxicidade a parasitas como *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, também proporcionando uma melhor relação estrutura-atividade com o receptor molecular desejado (ALMEIDA et al, 2015; BARROS et al., 2012; CHAUHAN et al., 2013; GAO et al, 2015; PATEL et al., 2010).

Devido ao exposto, a busca por novos fármacos, sua avaliação biológica contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*; citotoxicidade sobre células de mamíferos e possíveis mecanismos de ação, se tornam importantes para a pesquisa de novas biomoléculas, que possibilitem o avanço na busca de atividade anti-*Leishmania* e menores efeitos colaterais.. Assim, os resultados deste trabalho poderão nortear a ampliação de conhecimentos e potencial para o desenvolvimento de novos bioprodutos que possam beneficiar diretamente a área das doenças causadas por *Leishmania*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a atividade biológica dos compostos sintéticos derivados de acridina, guanidina e selenoglicolicamidas sobre as formas de *Leishmania (L). infantum*.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos sintéticos derivados de guanidina e selenoglicolicamidas sobre as formas promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos sintéticos derivados de guanidina e selenoglicolicamidas sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*;
- Analisar se compostos sintéticos derivados de guanidina e selenoglicolicamidas induzem morte por apoptose/necrose em formas promastigotas de *L. infantum*;
- Analisar se compostos sintéticos derivados de guanidina e selenoglicolicamidas induzem morte por apoptose/necrose em formas amastigotas de *L. infantum*;
- Investigar o efeito citotóxico dos compostos sintéticos derivados de acridina, guanidina e selenoglicolicamidas sobre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis e sobre os eritrócitos humanos;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos sintéticos derivados de acridina, guanidina e selenoglicolicamidas;
- Avaliar a indução da síntese de óxido nítrico pelo compostos mais promissor sob monócitos infectados por *Leishmania infantum*.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

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

4.2 Parasitos e manutenção das culturas *in vitro*

A cepa de referência *Leishmania (Leishmania) infantum* [IOC/L0579(MHOM/BR/1974/PP75)], foi obtida da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), localizada no Rio de Janeiro – RJ. A espécie de *Leishmania* foi enviada com o certificado de autenticação (**ANEXO A**) para o Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal da Paraíba.

As formas promastigotas da *Leishmania infantum* foram mantidas *in vitro* em meio NNN (cultivo de Trypanosomatídeos), preparado a partir do ágar base para ágar sangue (Blood agar base- Acumedia- cat. 7266a) (ZELEDÓN, 1996), água destilada e sangue humano heparinizado; juntamente ao 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 1-2% de urina masculina humana, denominado neste trabalho de meio Schneider suplementado. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 26 ± 1 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (DBO) e repicadas semanalmente, em meio Schneider suplementado, não ultrapassando vinte repiques, para manutenção das culturas. Todos os meios preparados foram realizados teste de esterilidade por no mínimo 24 horas antes do uso.

As culturas de formas promastigotas em início de fase estacionária, de 4 a 6 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. Com a mesma finalidade, as formas promastigotas também foram criopreservadas em 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA) e 70% do meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (Cultilab, São Paulo, Brazil), sendo armazenadas em freezer a -80 °C. 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 $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3 Obtenção das formas amastigotas axênicas

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, à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a $112 \times g$, 25°C , lavadas em PBS 1X (PBS – NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 9 mM, Na_2HPO_4 1 mM, pH 7,4), desprezado o sobrenadante, e ressuspensas em meio Schneider suplementado, pH 5.5, suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL). Com o objetivo de otimizar os ensaios *in vitro*, a forma amastigota axênica ou amastigota-like representa a forma intracelular desse parasito sendo obtido por transformação em laboratório, por diferenças de temperatura e/ou pH do meio de cultura, sem a necessidade de infecção em animal para a extração dessas formas amastigota. Partindo desse ponto, as células foram então incubadas a 37°C em estufa DBO por 24 horas para diferenciação em formas amastigotas. A morfologia característica de amastigota foi analisada sob microscopia óptica antes de cada experimento.

4.4 Fármaco de referência

A anfotericina B (Anforicin B® – Cristália, São Paulo, Brazil), que é um medicamento prescrito para o tratamento da leishmaniose, foi utilizada no presente estudo como medicamento anti-*Leishmania* de referência. Uma solução estoque de Anfotericina B, apresentada da forma de pó liofilizado, foi preparada na concentração de 10 mg/mL solubilizada em DMSO como solução-estoque. A seguir, esta solução foi diluída com o meio de cultura apropriado até a concentração necessária para os testes, não ultrapassando a concentração final máxima de 0,5% de DMSO nas soluções teste.

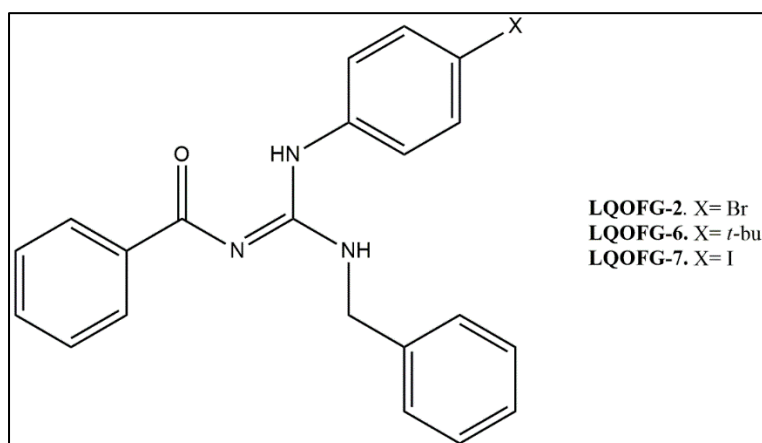
4.5 Derivados de guanidina estudados

Quatorze compostos de guanidina foram sintetizados no LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA FINA (LQOF), sob responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Rene Pérez Gonzalez no Departamento de Química e Biologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia,

Universidade Estadual Paulista – UNESP. Sendo destes 14 compostos sintéticos (tabela 1), dentre estes, 3 já publicados a sua síntese de acordo com o protocolo descrito por Espírito Santo e colaboradores (2019) (LQOFG-G2, LGOFG-6 e LGOFG-7) descritos na figura 14, onde os demais compostos estudados estão sob sigilo de pesquisa.

Todos os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter soluções estoque (20 mg/mL). Para obter as concentrações finais dos fármacos nos ensaios, as soluções-estoque foram diluídas a partir da solução-estoque apropriada e diluída nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO.

Figura 14. Estrutura molecular dos derivados de guanidina.



Legenda: (Z) N-((benzilamino) ((4 bromofenil)amino)metileno)benzamida (**LQOFG-2**). (Z) N-((benzilamino) ((4-(terc-butil)fenil)amino)metileno)benzamida (**LQOFG-6**). (Z) N-((benzilamino) ((4-iodofenil)amino)metileno)benzamida (**LQOFG-7**). Fonte: (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019)

Tabela 1. Série de compostos derivados de guanidina estudados

Compostos (código)	Massa molecular (g/mol)
LQOFT-1	335.98 g/mol
LQOFT-2	411.89 g/mol
LQOFT-3	257.06 g/mol
LQOFG-29	465.14 g/mol
LQOFG-30	484.97 g/mol
LQOFG-31	457.11 g/mol
LQOFG-32	474.99 g/mol
LQOF-G33	394.04 g/mol
LQOFS-7	447.16 g/mol
LQOFS-8	482.19 g/mol
LQOFS-9	329.14 g/mol

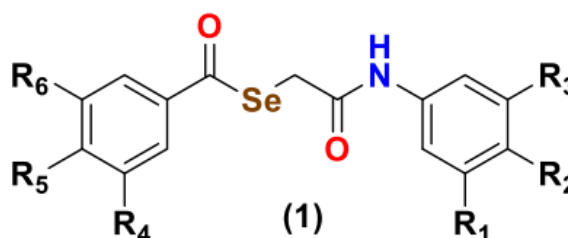
LQOFG-2	408.07 g/mol
LQOFG-6	386.22 g/mol
LQOFG-7	456.05 g/mol

4.6 Derivados de selenoglicolicamidas estudados

As amostras dos compostos sintéticos foram sintetizadas e cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica, coordenado pelo professor Prof. Dr. Petrônio Filgueiras Athayde Filho, da Universidade Federal da Paraíba.

Foram utilizados inicialmente 9 compostos, os quais apresentam solubilidade em DMSO, à 25 °C e 1 atm. Para os testes *in vitro* as substâncias foram solubilizadas em DMSO a fim de se obter soluções-estoque de 20 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO. A **Tabela 2** demonstra a massa molecular e a estrutura química dos compostos testados.

Figura 15. Estrutura molecular base das selenoglicolicamidas



Fonte: (DE SOUSA LUIS et al., 2019).

Tabela 2. Série de compostos selenoglicolicamidas estudados

Compostos (código)	Massa molecular (g/mol)
MSe 10	332,26 g/mol
MSe 11	374,24 g/mol
MSe 13	394,75 g/mol
MSe 16	362,28 g/mol
MSe 17	376,27 g/mol
MSe 18	410,71 g/mol
MSe 19	410,75 g/mol

MSe 20	376,31 g/mol
C4CB	324,37 g/mol

4.7 Derivados espiro-acridínicos estudados

Foram utilizados uma série de derivados espiro-acridínicos previamente sintetizados, fazendo parte do acervo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, no Campus V, de João Pessoa, sob coordenação do prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, investigado a atividade anti-*Leishmania infantum* nas formas promastigotas e amastigotas axênicas anteriormente por Almeida (2018). Suas características físico-químicas e a estrutura molecular se encontram dispostas na Tabela 3 e Figura 16.

Foram utilizados inicialmente 10 compostos, os quais apresentam solubilidade em DMSO, à 25 °C e 1 atm. Para os testes *in vitro* as substâncias foram solubilizadas em DMSO a fim de se obter soluções-estoque de 20 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-estoque foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingirem as concentrações desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO. A **Tabela 3** demonstra a massa molecular e a figura 16 a estrutura química dos compostos testados.

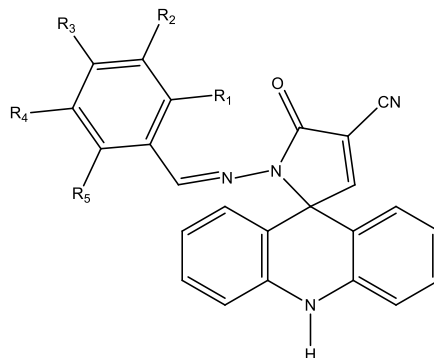
Tabela 3. Compostos da série AMTAC sintetizados e suas respectivas especificações

Composto	PM	FM
*AMTAC 01	376,3950	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O
AMTAC 06	410,8551	C ₂₄ H ₁₅ ClN ₄ O
AMTAC 07	394,4005	C ₂₄ H ₁₅ FN ₄ O
AMTAC 08	445,3002	C ₂₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O
AMTAC 09	485,3321	C ₂₅ H ₁₇ BrN ₄ O ₂
AMTAC 10	445,3002	C ₂₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O
AMTAC 11	419,4778	C ₂₆ H ₂₁ N ₅ O
AMTAC 13	421,4076	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃
AMTAC 14	421,4076	C ₂₄ H ₁₅ N ₅ O ₃
AMTAC 16	436,4620	C ₂₆ H ₂₀ N ₄ O ₃

Fonte:(ALMEIDA, 2016)*

Legenda: , PM – Peso molar, FM – Fórmula molecular

Figura 16. Estrutura química dos derivados espiro-acridínicos e as respectivas substituições no anel aromático.



Quadro 2. Substituições no anel aromático das espiro-acridinas.

Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
AMTAC 01	-H	-H	-H	-H	-H
AMTAC 06	-H	-H	-Cl	-H	-H
AMTAC 07	-H	-H	-F	-H	-H
AMTAC 08	-Cl	-H	-Cl	-H	-H
AMTAC 09	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H
AMTAC 10	-Cl	-H	-H	-H	-Cl
AMTAC 11	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	-H
AMTAC 13	-NO ₂	-H	-H	-H	-H
AMTAC 14	-H	-H	-NO ₂	-H	-H
AMTAC 16	-H	-OCH ₂ CH ₃	-OH	-H	-H

Fonte:(ALMEIDA, 2016)

4.8 Atividade anti-*Leishmania infantum* dos compostos avaliados sobre formas promastigotas de *L. infantum*

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos testados foi avaliada utilizando o teste colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT - Amresco, Ohio, EUA) sobre as formas promastigotas da espécie *L. infantum*. Em placas de cultivo de 96 poços, foram adicionados 1×10^6 promastigotas/poço contendo 100 µL de meio Schneider suplementado, e em seguida as soluções estoques dos compostos avaliados foram adicionadas às placas, em triplicata, atingindo concentrações seriadas de 400 a 0,78 µg/mL; e a anfotericina B como controle positivo, de 10 a 0,039 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa de DBO à 26 °C. Ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS

(salina fosfatada tamponada) a uma concentração final de 5 mg/mL e incubadas por mais 4 horas em estufa DBO à 26 °C. Em seguida foram adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sódio (DSS) a 10%. A placa foi incubada até dissolução completa do formazan e por último, foi realizado a leitura em espectrofotômetro 540 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800) (RODRIGUES et al., 2015). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular e em valores de concentração inibitória média, onde foi inibido 50% do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀), sendo o controle negativo realizado em meio Schneider suplementado a 0,5% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade celular dos parasitos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes.

4.9 Atividade anti-*Leishmania* dos compostos avaliados sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum*

A atividade anti-*Leishmania* sob formas amastigotas axênicas dos compostos avaliados segue o protocolo conforme o item 4.8, ajustadas na quantidade de 1×10^6 *Leishmanias*/poço, contendo 100 µL de meio Schneider suplementado e diferentes concentrações seriadas de 400 a 0,78 µg/mL para e a Anforericina B como controle positivo, de 10 a 0,039 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa DBO 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 permaneceu por um período de horas, *overnight*, até dissolução completa do formazan e então foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O controle negativo foi realizado com meio Schneider a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitos. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular e em valores de concentração efetiva sobre 50% de amastigotas (CE₅₀).

4.10 Material biológico para avaliação da citotoxicidade dos compostos estudados.

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis (n = 9), em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para ensaios com eritrócitos ou heparina para os ensaios em células mononucleares do sangue periférico ou *human peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). O sangue de indivíduos saudáveis voluntários foram

processados para os testes de citotoxicidade frente PBMC humano e frente a eritrócitos humanos, como também para a avaliação da taxa de infecção em monócitos humanos. Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa. Essa tese de doutorado faz parte de um projeto maior na área de pesquisa em leishmanioses, intitulado como “Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática”, o qual foi aprovado, pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) – CEP/HULW (Número do Parecer 404.854 / 2013 e CAAE: 17813013.8.0000.5183 (**ANEXO B**)).

Para avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos, utilizou-se o ensaio colorimétrico do MTT para as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) (MACIEL et al., 2014) e o modelo de citotoxicidade empregando eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O⁺ (LÖFGREN et al., 2008).

4.11 Citotoxicidade frente a eritrócitos humanos

Na avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos humanos com tipo sanguíneo O⁺, coletado com anticoagulante EDTA de voluntários saudáveis (n = 3). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, foram adicionados os compostos a serem analisados em concentrações seriadas de 400 a 3,12 µg/mL para os derivados de guanidina, espiro-acridinas e selenoglicolocamidas, e de 50 a 3,12 µg/mL para a Anfotericina B, diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 hora a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 112 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços, sendo submetido à espectrofotometria com comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. O ensaio foi feito em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em concentração hemolítica média (CH₅₀), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (JAIN et al., 2015).

4.12 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico foram coletados 20mL de sangue humano de voluntários saudáveis ($n = 3$) em tubos anticoagulante contendo heparina, o qual foi diluído no mesmo volume em PBS. Montou-se o gradiente para a centrifugação utilizando o Ficoll, vertendo o sangue gentilmente, em tubos cônicos de 50 mL contendo o Ficoll Paque Plus® (GE Healthcare, Chicago, E.U.A). Centrifugou-se a 2000 rpm (ou 400g), por 40 minutos à temperatura 20°C. Nesse método de separação, as hemácias e granulócitos possuem uma densidade maior que o Ficoll®, e posicionam-se abaixo da camada desse reagente, enquanto que as células mononucleares e as plaquetas foram coletadas no topo da camada de Ficoll por apresentarem uma baixa densidade. Assim, os anéis de PBMC's foram coletados e transferidos para um tubo cônico de 15 mL estéril, completando o volume com PBS 1x estéril para lavagem das células, seguido de centrifugações a 1300 RPM por 10 minutos a 4 °C, completando um ciclo de 3 lavagens para retirada de plaquetas residentes. Após o decarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640, e a viabilidade destas foi observada a partir da contagem das células em corante Azul de Trypan 0,4% (diluição 1:20) na câmara de Neubauer e determinação do número de células viáveis na suspensão celular (MACIEL et al., 2014).

4.12.1 Ensaio de citotoxicidade em PBMC pelo método colorimétrico com MTT

Em placa de 96 poços foram ajustadas as PBMC em uma quantidade de 1×10^6 célula/mL, sendo incubadas com os compostos sintéticos de guanidina e acridínicos que possuíram melhor atividade anti-*Leishmania* das séries estudadas, atingindo concentrações seriadas de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 1,56 e 0,78 µg/mL ; e Anforericina B de 50 a 0,039 µg/mL, completando o volume de 200 µL com meio RPMI 1640 suplementado [5% SFB, 1% L-glutamina e 1% de antibiótico (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL - Gibco, BR)]. A placa ficou incubada durante 24 horas em uma estufa a temperatura de 37 °C com 5% de CO₂.

Ao final da incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 RPM a 25°C por 5 min para centrifugação de 100 µL sobrenadante e foi adicionado 10 µL de MTT diluído em PBS 1x a uma concentração final de 5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa a 37 °C, CO₂ 5%, e em seguida as placas foram centrifugadas novamente para retirada de todo o sobrenadante e adicionado 200 µL DMSO em cada poço para solubilização do formazan em agitador de placa por 15 minutos. Por último, foi realizado a leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800). O controle negativo foi realizado com meio RPMI 1640

suplementado a 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade dos parasitos e os resultados foram expressos em valores de concentração citotóxica para 50% das PBMC (CC₅₀).

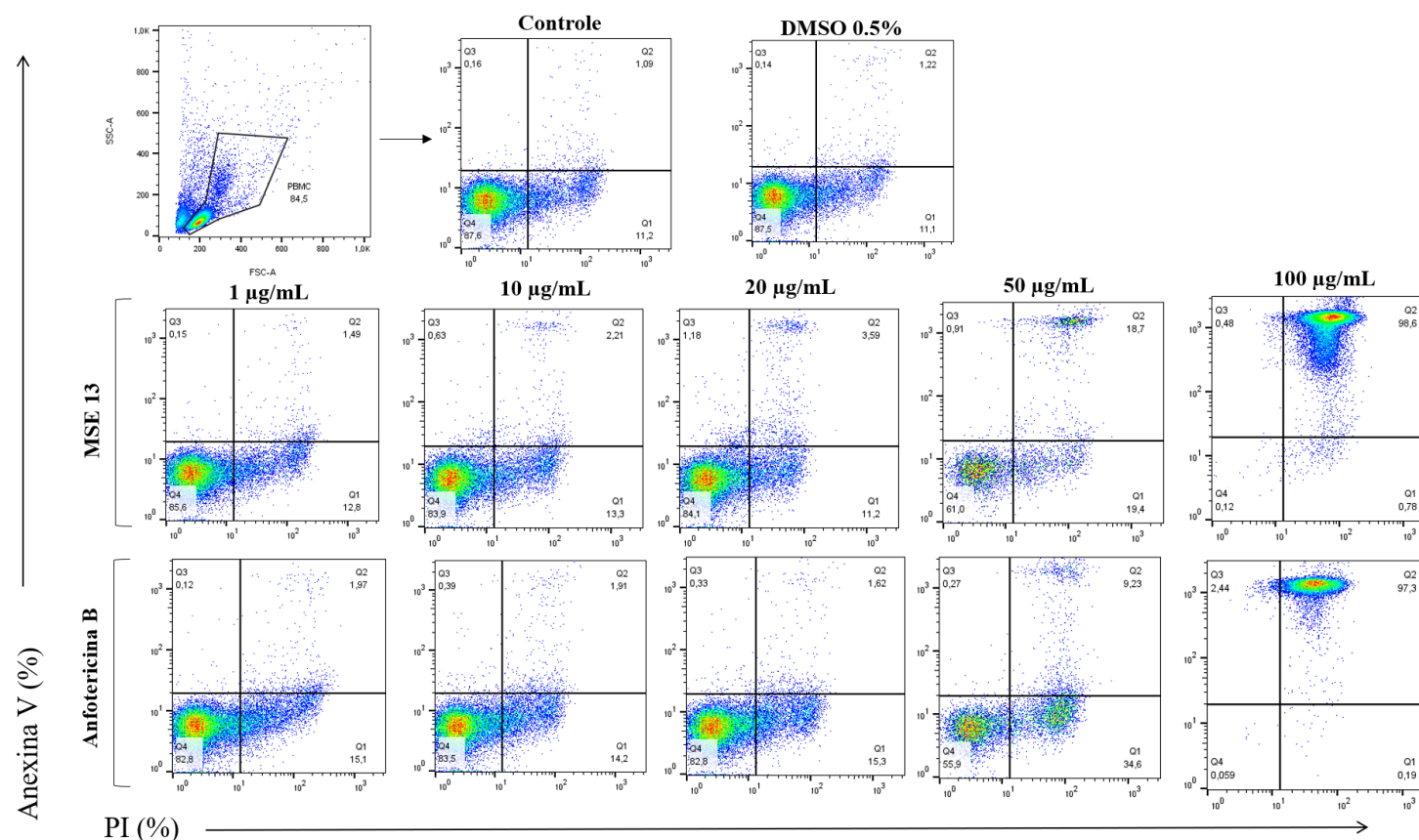
4.12.2 Avaliação de morte celular em células mononucleares do sistema periférico humano por citometria de fluxo.

As células mononucleares do sistema periférico foram obtidas seguindo o protocolo 4.12. Este ensaio foi realizado para avaliação da toxicidade do composto mais promissor do grupo das selenoglicolicamidas. $2,5 \times 10^5$ células/poço foram tratadas com a MSe 13 e Anfotericina B nas concentrações de 100, 50, 20, 10 e 1 µg/mL., além do controle de veículo (DMSO a 0.5%), diluído em meio RPMI-1640 e o controle sem tratamento (apenas células e meio de cultura) (ANDRÉ et al., 2020). Utilizando a citometria de fluxo avaliou-se a dupla marcação por Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) /Iodeto de Propídio, ou *Propidium Iodide* (PI) (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para a avaliação do perfil de morte celular das PBMC's (MARINHO et al., 2014), seguindo as instruções do fabricante. As células foram incubadas com os compostos por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Após o período de tratamento, as placas foram centrifugadas a 1300rpm 4°C durante 8 minutos, desprezando o sobrenadante e ressuspendidas para um volume de 100 µl de binding buffer 1x (10µM HEPES, 140mM NaCl, e 2.5mM CaCl₂), ph 7.4 contendo o mix de anexina V-FITC e IP (5 µg/mL) em todos os poços da placa.

As células foram então incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente, transferidos para os tubos de leitura e adicionados 300µl de *binding buffer* 1x. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para análise dos dados foram mensurados 30.000 eventos, utilizado o *software FlowJo* 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

O ensaio de morte celular por citometria de fluxo com os marcadores anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI- PerCP-Cy5) caracterizam células apoptóticas em estado inicial [anexina V (+)/PI (-)], células apoptóticas em estado tardio [anexina V (+)/PI (+)], bem como células em necrose [anexina V (-)/PI (+)] e células viáveis [(anexina V (-)/PI (-)]. A Figura a seguir representa a estratégia de análise utilizada (figura 17).

Figura 17. Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de células mononucleares do sistema periférico tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B



Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo em PBMC's de doadores saudáveis (n=3). As células foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença do composto MSe 13 e anfotericina B nas concentrações de 1, 10, 20, 50 e 100 µg/mL. O quadrante Q1– representa o percentual de células em apoptose inicial, Q2 – células em apoptose tardia, Q3 – células em estado de necrose e Q4 – células viáveis.

4.13 Determinação do índice de seletividade dos compostos avaliados

O índice de seletividade (IS) é o valor que indica quantas vezes um composto teste é mais seletivo para o parasito *Leishmania spp.* do que para a célula mamífera (PBMC ou eritrócitos), calculado a partir dos resultados de CI_{50} , CE_{50} , CC_{50} , CH_{50} . Dessa forma o cálculo do IS é determinado pela razão da CI_{50} ou CE_{50} por cada CC_{50} e CH_{50} .

4.14 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas de *L.*

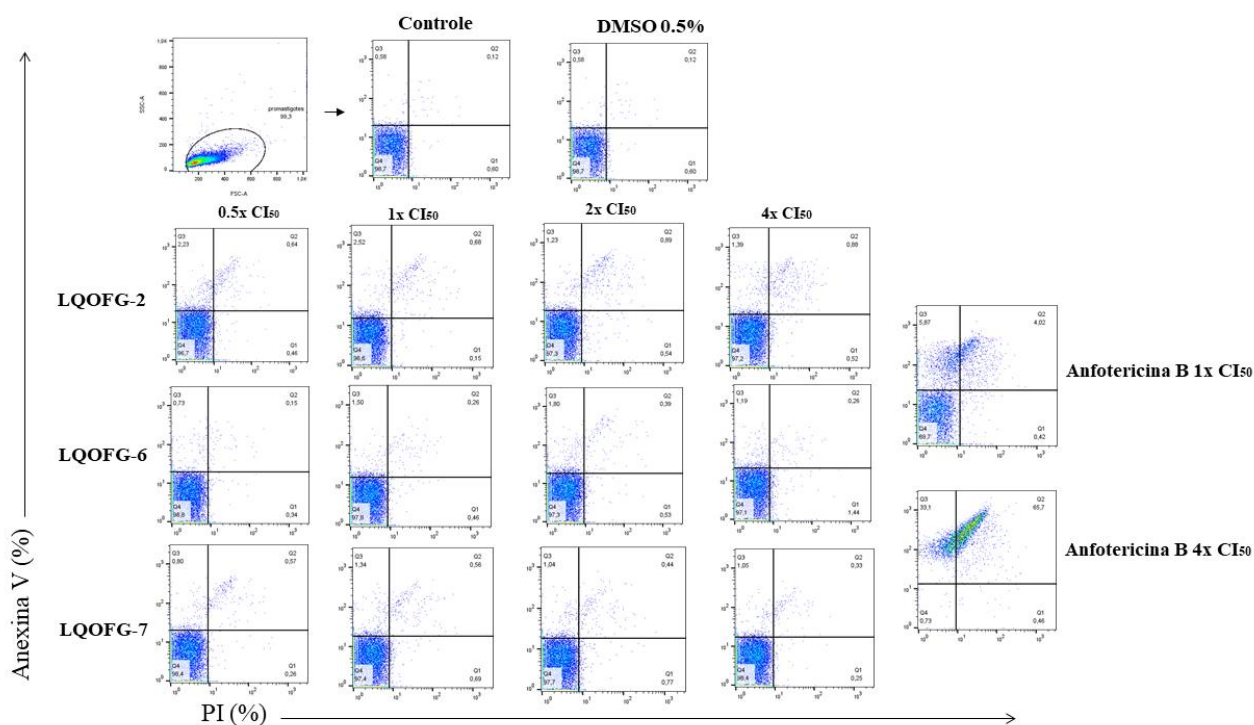
infantum expostas aos compostos avaliados (LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13)

Utilizando a citometria de fluxo avaliou-se a dupla marcação por Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) /Iodeto de Propídio (PI), para a avaliação do perfil de morte celular das formas promastigotas de *L. infantum*, seguindo as instruções do fabricante (MARINHO et al., 2014). Dessa forma, os compostos avaliados foram analisados quanto a sua toxicidade relacionada à necrose, apoptose inicial e apoptose tardia. As formas promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento (1×10^6 *Leishmania*/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13 e anfotericina B, utilizada como controle positivo, nas concentrações de 0.5x, 1x, 2x e 4x os valores da CI_{50} correspondente a cada espécie, por 24 h a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de tratamento, as formas promastigotas foram lavadas três vezes em PBS gelado e ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação a anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, e 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4). Em seguida adicionou-se 2,5 μL de anexina V-FITC e as células foram incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram marcadas com IP (PerCP-Cy5) (5 $\mu\text{g/mL}$) e avaliadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o software FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

No dot plot, o percentual celular é apresentado em cada quadrante, onde o quadrante 1 (Q1) – células em apoptose inicial com padrão de marcação [anexina V (+)–PI (-)], (Q2) – células em apoptose final com padrão [anexina V (+)–PI (+)], (Q3) – células em necrose com padrão anexina–/IP+ e (Q4)- representa o percentual de células viáveis [(anexina V (-)–PI (-)].

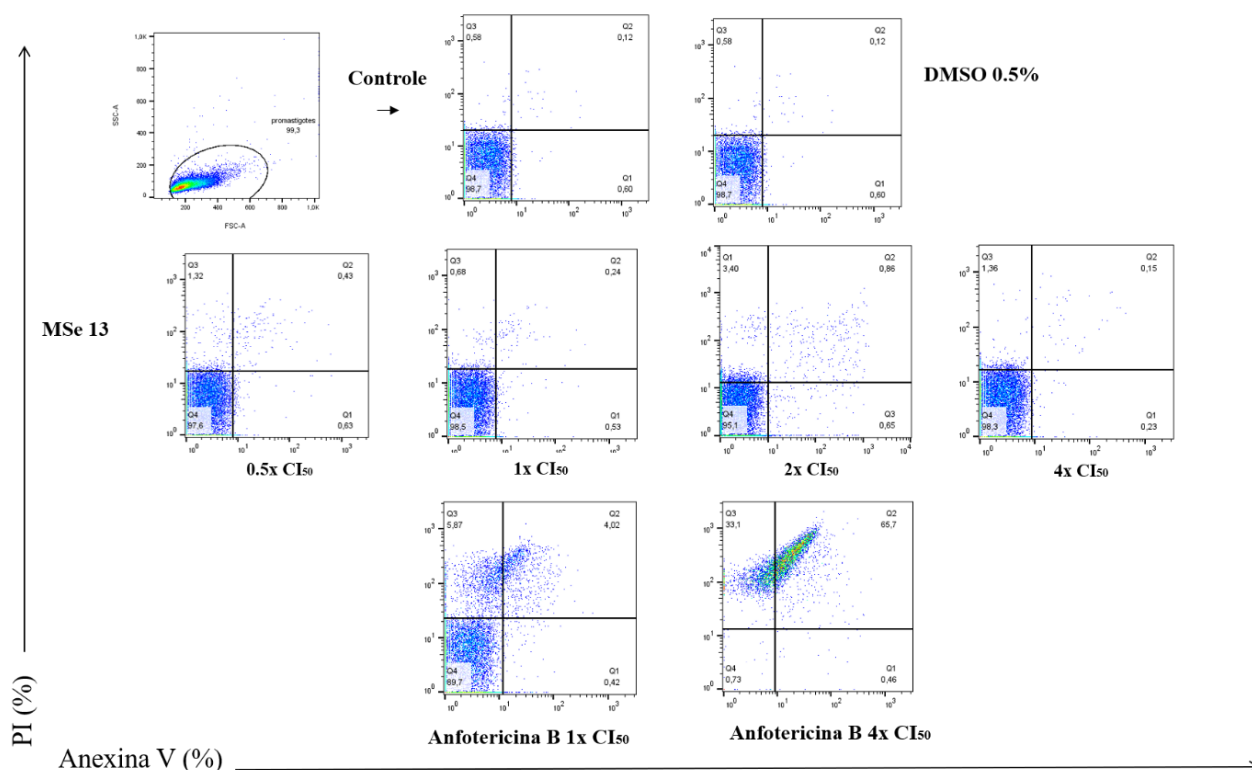
Figura 18. Estratégia de análise da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de

promastigotas de *L. infantum* tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B



Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo. As promastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 26 °C por 24 h na ausência ou presença dos compostos de guanidina ou anfotericina B em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CI₅₀. Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo. O quadrante 1 (Q1) – células em apoptose inicial com padrão de marcação [anexina V (+)/PI (-)], (Q2) – células em apoptose final com padrão [anexina V (+)/PI (+)], (Q3) – células em necrose com padrão anexina V (-)/PI (+) e (Q4)- representa o percentual de células viáveis [(anexina V (-)/PI (-)].

Figura 19. Estratégia de análise avaliação de morte celular por apoptose/necrose de promastigotas de *L. infantum* tratadas com a selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B



Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo. Formas promastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 26 °C por 24 h na ausência ou presença de tratamento, com selenoglicolicamida MSe 13 ou anfotericina B em concentrações de 0.5x, 1x, 2x ou 4x CI₅₀. Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo.

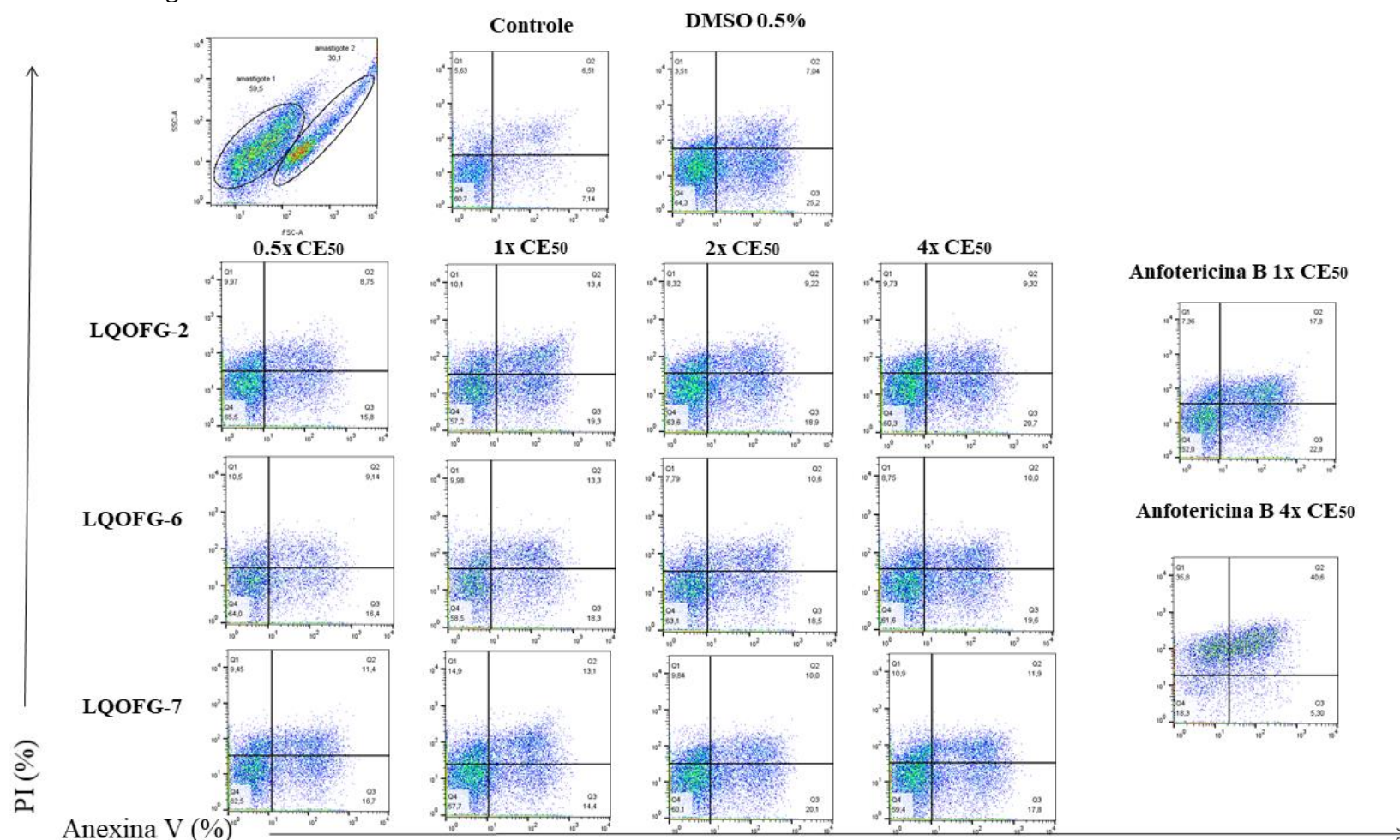
4.15 Avaliação do perfil de morte celular de formas amastigotas axênicas de *L. infantum* expostas aos compostos avaliados (LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13)

Utilizando a citometria de fluxo avaliou-se a dupla marcação por Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) /Iodeto de Propídio (PI) (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para a avaliação do perfil de morte celular das formas amastigota axênica de *L. infantum*, seguindo as instruções do fabricante (MARINHO et al., 2014). Dessa forma, os compostos avaliados foram analisados quanto a sua toxicidade relacionada à necrose, apoptose inicial e apoptose tardia. As formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária (1×10^6 *Leishmania*/poço) foram incubadas com os compostos sintéticos LQOF-G2, LQOF-G6, LQOF-G7 e MSe-13 e Anfotericina B, utilizada como controle positivo, nas concentrações de 0.5x, 1x, 2x e 4x os valores da CE₅₀ correspondente a

cada espécie, por 24 h a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de tratamento, as formas promastigotas foram lavadas três vezes em PBS gelado e ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação a anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, e 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4). Em seguida adicionou-se 2,5 μL de anexina V-FITC e as células foram incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram marcadas com PI (5 $\mu\text{g/mL}$) e avaliadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o software FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

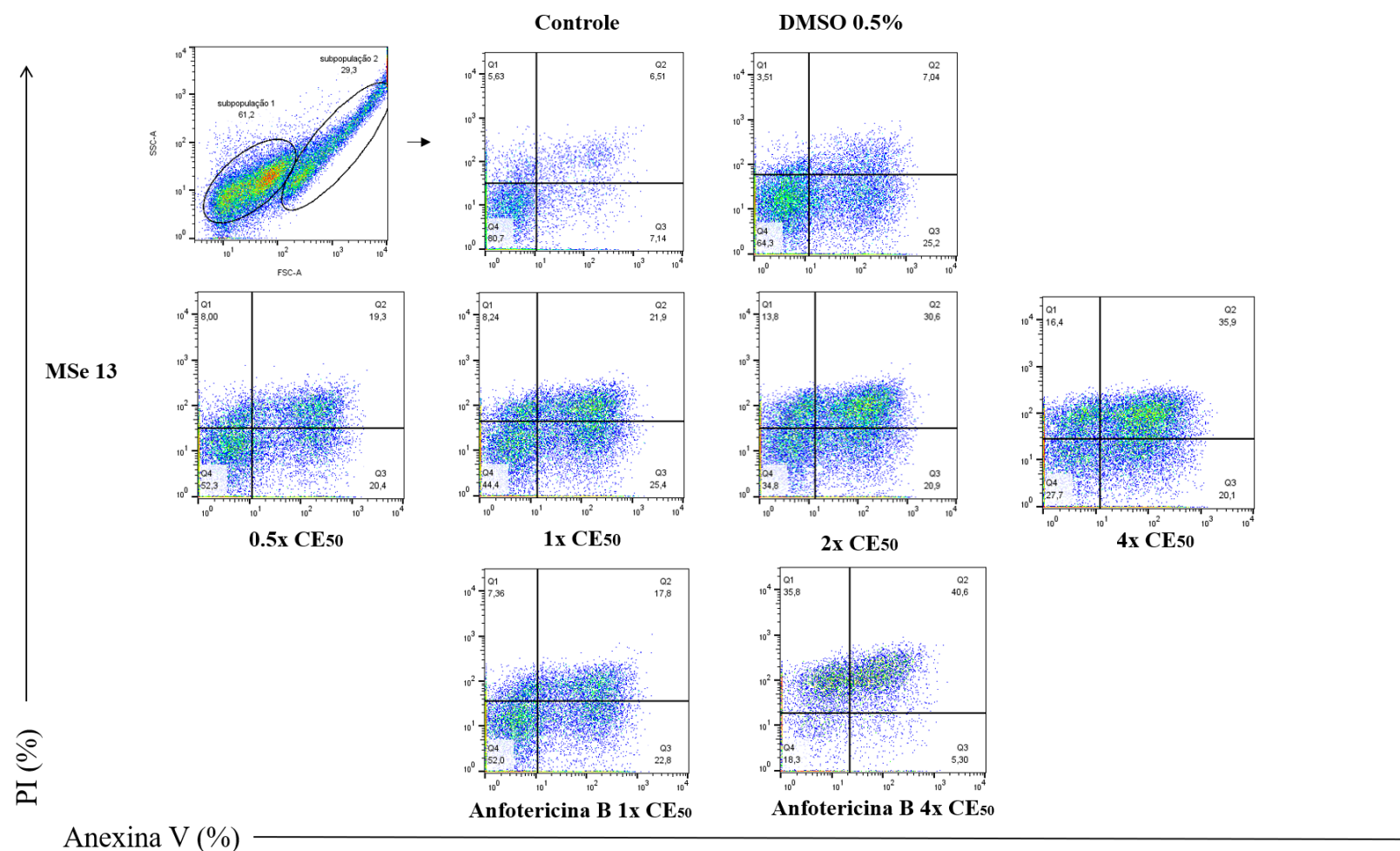
Anexina V e PI discriminam entre células apoptóticas em estado inicial [anexina V (+)/PI (-)], células apoptóticas em estado tardio [anexina V (+)/PI (+)], bem como entre células em necrose [anexina V (-)/PI (+)] e células viáveis [(anexina V (-)/PI (-)]. Duas subpopulações observadas no dotplot FSC-A versus SSC-A foram classificadas em subpopulações de amastigotas 1 e amastigotas 2. As figuras a seguir representam a estratégia de análise usadas para os ensaios de morte celular em amastigotas com os derivados de guanidina e selenoglicolicamida.

Figura 20. Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de *L. infantum* (sub-população 1) tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B



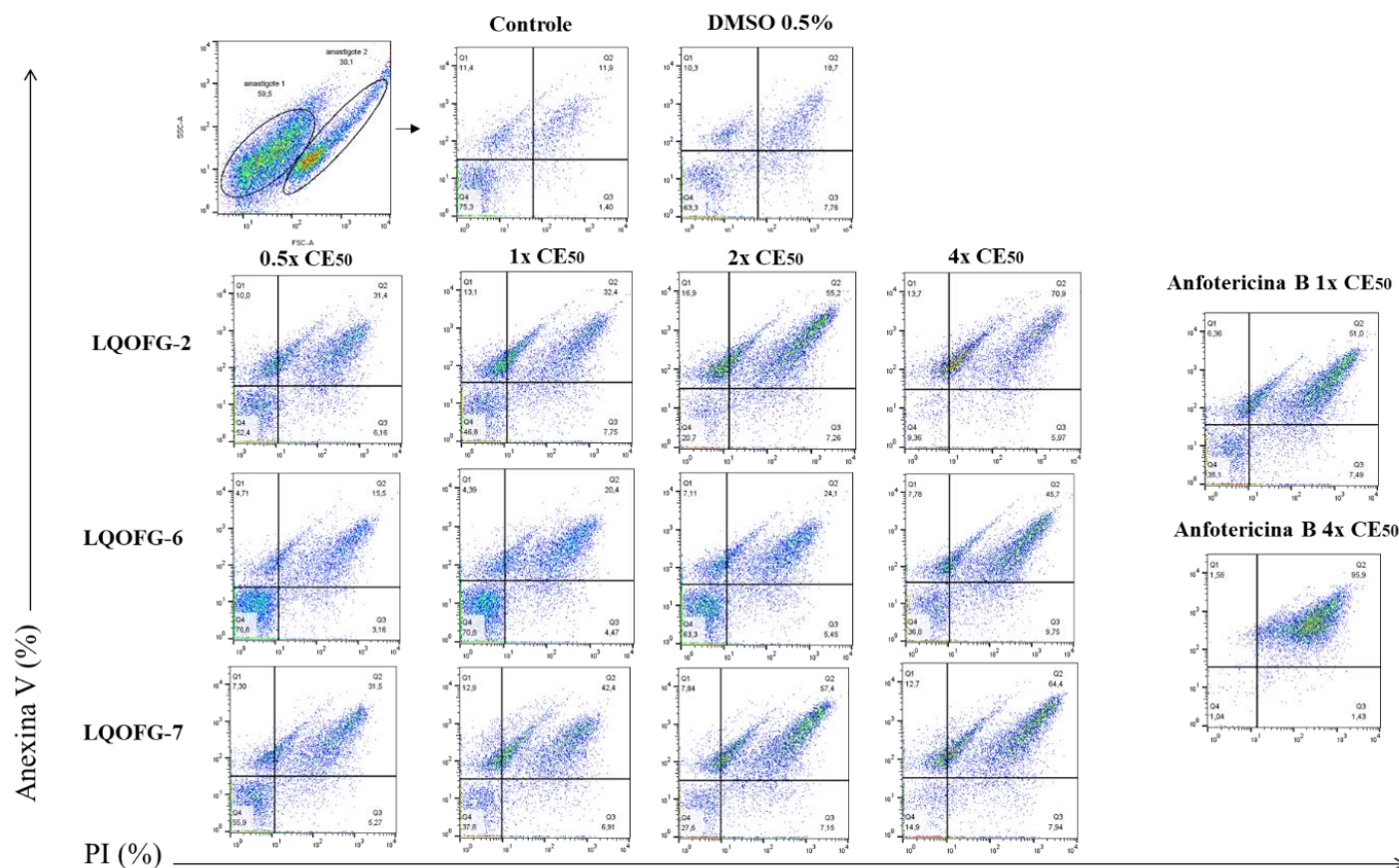
Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo na subpopulação denominada amastigota 1. As amastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença dos compostos de guanidina ou anfotericina B em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CE₅₀. Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo.

Figura 21. Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de *L. infantum* (sub-população 1) tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B



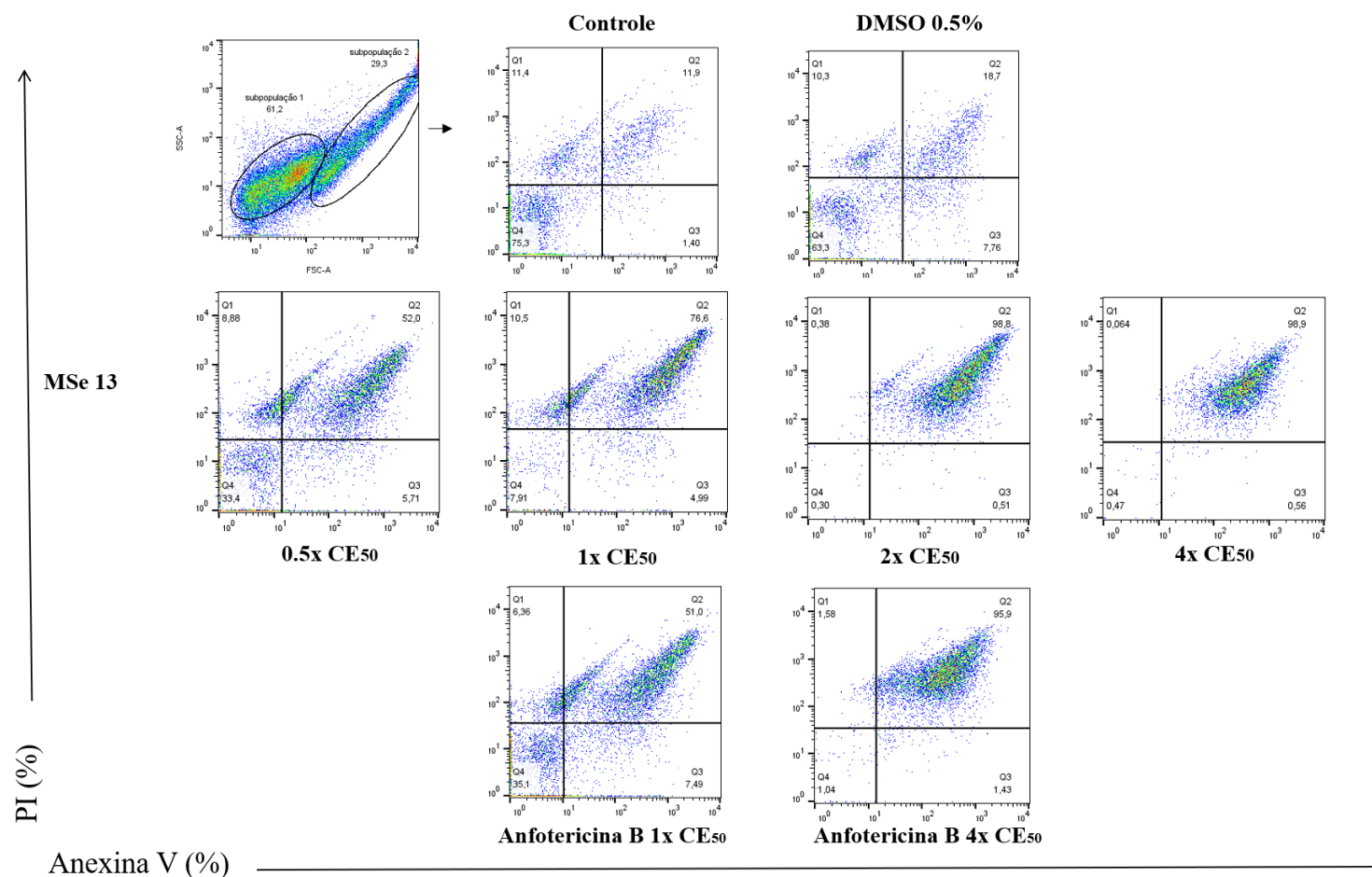
Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo na subpopulação denominada amastigota 1. As amastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença do composto MSe 13 em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CE₅₀ e anfotericina B 1x ou 4x CE₅₀. Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo

Figura 22. Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de *L. infantum* (sub-população 2) tratadas com os derivados de guanidina e Anfotericina B



Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo na subpopulação denominada amastigota 2. As amastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença dos compostos de guanidina ou anfotericina B em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CE₅₀. O quadrante 1 (Q1) – células em apoptose inicial com padrão de marcação [anexina V (+)/PI (-)], (Q2) – células em apoptose final com padrão [anexina V (+)/PI (+)], (Q3) – células em necrose com padrão anexina V (-)/PI (+)] e (Q4)- representa o percentual de células viáveis [(anexina V (-)/PI (-)].

Figura 23. Dot plots representativos da avaliação de morte celular por apoptose/necrose de amastigotas de *L. infantum* (sub-população 2) tratadas com selenoglicolicamida MSe 13 e Anfotericina B



Legenda: Estratégia de análise do ensaio de morte celular por citometria de fluxo na subpopulação denominada amastigota 2. As amastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença do composto MSe 13 em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CE50 e anfotericina B 1x ou 4x CE50 . Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo.

4.16. Avaliação da taxa de infecção de monócitos humanos por *L. infantum* e indução da síntese de óxido nítrico tratados com LQOFG-7 e controles.

As formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* foram marcadas com Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína ou *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit). A solução de CFSE foi adicionada aos parasitos em uma concentração final de 5 mM. A suspensão foi incubada por 15 minutos em estufa a 5% de CO₂, 37 °C e lavadas 3 vezes em tampão PBS (10% SBF) para retirada do excesso de CFSE que não fixaram aos parasitos. Paralelamente, foram coletados amostras de sangue de voluntários saudáveis (n=5), em tubos com anticoagulante heparina para extração das células mononucleares do sistema periférico que seguiram todos os passos do protocolo 4.12.

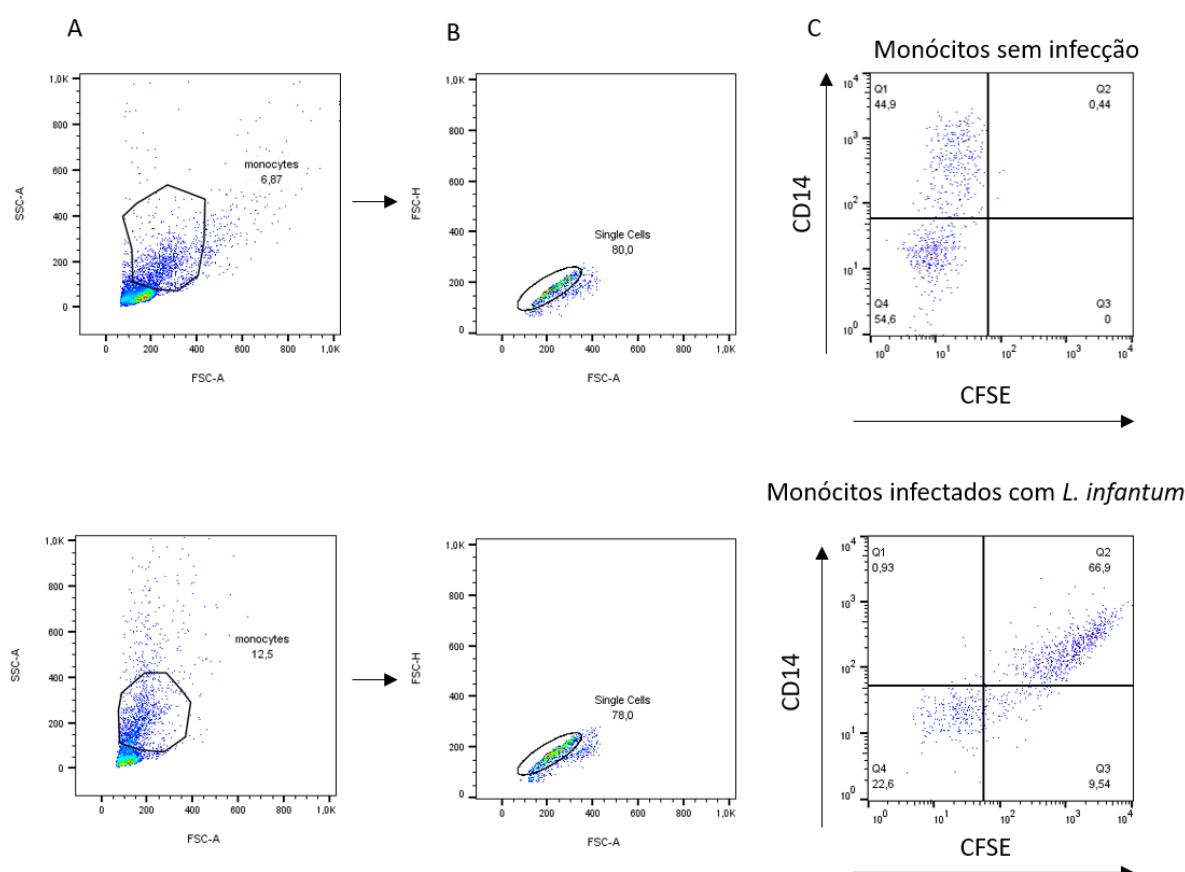
Após a obtenção de PBMC, a infecção de monócitos por *L. infantum* marcadas com CFSE ocorreu na proporção de 1 monócito:10 *Leishmania* no período de tempo de 3 horas, mantidas em estufa a 5% CO₂ e 37 °C. Após o tempo de infecção, essas células passaram por um processo de lavagem três vezes com PBS 1x. Após a infecção e obtenção do PBMC, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (2,5 x 10⁵ células/poço) e incubadas com LQOFG-7 e anfotericina B na concentração de 1x o valor de EC50, nas condições em meio de cultura RPMI-1640 e com estímulo do lipopolissacarídeo (LPS) (lipopolissacarídeo derivado de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich O111:B4) a 100 ng/mL onde avaliou-se diferentes condições, células em cultura sem infecção e com infecção por *L. infantum*. (BARTOSH; YLOSTALO, 2014; LAPARA; KELLY, 2010; SCHILDBERGER et al., 2013).

As placas foram então incubadas por 24 h em estufa de a 5% de CO₂ a 37 °C. Após o tempo de tratamento, a placa foi centrifugada a 200 g, por 8 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para medição de produção de nitrito. Para a marcação dos monócitos foi adicionado o anticorpo de superfície CD14 (PERCP-Cy5.5; clone MΦP9), já diluído, conforme titulação padronizada, em um volume final de 40 µL, seguindo o protocolo de marcação foi realizada a lavagem das células adicionando 150 µL de tampão PBS gelado em cada poço. As placas foram novamente centrifugadas, durante 10 minutos a 4 °C. Ao final da centrifugação, estas foram vertidas para retirar o sobrenadante e, em seguida, por fim ressuspensas as células ao adicionar 100 µL de tampão PBS e 100 µL de solução de formaldeído 4%, para então posterior leitura dos ensaios em citômetro de fluxo FACSCANTOII (BD FACSCanto® II - BD

Biosciences, San Jose, CA, EUA), onde foram adquiridos 30 mil eventos. O *software* FlowJo v.10.8.1® foi utilizado como programa para análise dos dados obtidos (MAGALHÃES et al., 2015).

Inicialmente, para a identificação da população celular de monócitos, utilizou-se o gráfico de perfil de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) baseando-se em conhecimento prévio da localização dessas células (**Figura 24A**). Em seguida, após a seleção da população de monócitos, essas células foram visualizadas no gráfico FSC-H x FSC-A no formato *single cells* (**Figura 24B**). Por fim, foi visualizado a população CD14+ (canal PERCP-Cy5.5) versus CFSE (FITC) (**Figura 24C**), identificando assim os monócitos infectados por *Leishmania infantum*.

Figura 24. Estratégia de análise por citometria de fluxo do ensaio de infecção



Fonte: Elaboração própria. (A) As células foram visualizadas no gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi realizado um gate amplo em torno da população de monócitos, excluindo a maioria dos debris e linfócitos. (B) células foram visualizadas no gráfico FSC-H x FSC-A no formato *single cells*. (C) Por último, as células CD14+ foram visualizadas no gráfico CFSE vs. CD14+, identificando assim os monócitos infectados por *Leishmania infantum*.

A produção de NO pode ser avaliada indiretamente pela produção de nitrito pelo método de Griess (GREEN et al., 1982) no sobrenadante do ensaio de avaliação da taxa de infecção de

monócitos. Para a realização do ensaio da medição o nitrito na amostra, foi adicionado um volume de R1 igual a 50% do volume da amostra coletado no sobrenadante, neste caso foi adicionado 50 μ L por poço. Imediatamente após a adição de R1, foi adicionado um volume de R2 igual ao volume de R1 adicionado à reação. A placa foi incubada 10 minutos para que a cor se desenvolvesse e a leitura da absorbância foi lida a 540 nm. Como teste estatístico, foi utilizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle. A concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva-padrão nitrito de sódio (NaNO_2) partindo de concentrações seriadas de 200 a 0.19 μ M.

4.17. Análise estatística

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata, em pelo menos três experimentos independentes. O software *GraphPad Prism* versão 8.0 (San Diego, CA) foi utilizado para o cálculo da CI_{50} , CE_{50} , CC_{50} e CH_{50} com limite de confiança de 95%. O mesmo programa foi utilizado para as comparações entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Todas essas análises tiveram como nível máximo necessário para a significância estatística um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.1 RESULTADOS: DERIVADOS DE GUANIDINA

5.1.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos derivados de guanidina sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos derivados de guanidina foi avaliada em ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Foi realizado o *screening* onde no total de 14 compostos sintéticos avaliados (Tabela 1- tópico 4.5), dentre estes, 6 compostos apresentaram perfil de inibição do crescimento do parasito nas concentrações avaliadas (Tabela 4), sendo possível o cálculo da CI_{50} desses compostos.

Os compostos LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, LQOFG-29, LQOFG-32 e LQOFG-33 apresentaram concentrações de CI_{50} de, $5,14 \pm 0,25$; $9,42 \pm 0,76$; $10,76 \pm 0,64$; $71,22 \pm 4,81$; $57,37 \pm 1,83$ e $32,36 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Enquanto que o CI_{50} para anfotericina B, fármaco de referência, foi de $1,41 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes. Dessa forma, após a triagem, observou-se que os compostos que apresentaram melhor atividade foram LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 (Figura 14). A partir de então esses foram os derivados de guanidina escolhidos para o prosseguimento dos ensaios posteriores.

Tabela 4. Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI_{50}) de *Leishmania infantum* após 72 h de incubação com os compostos derivados de guanidina e fármaco de referência

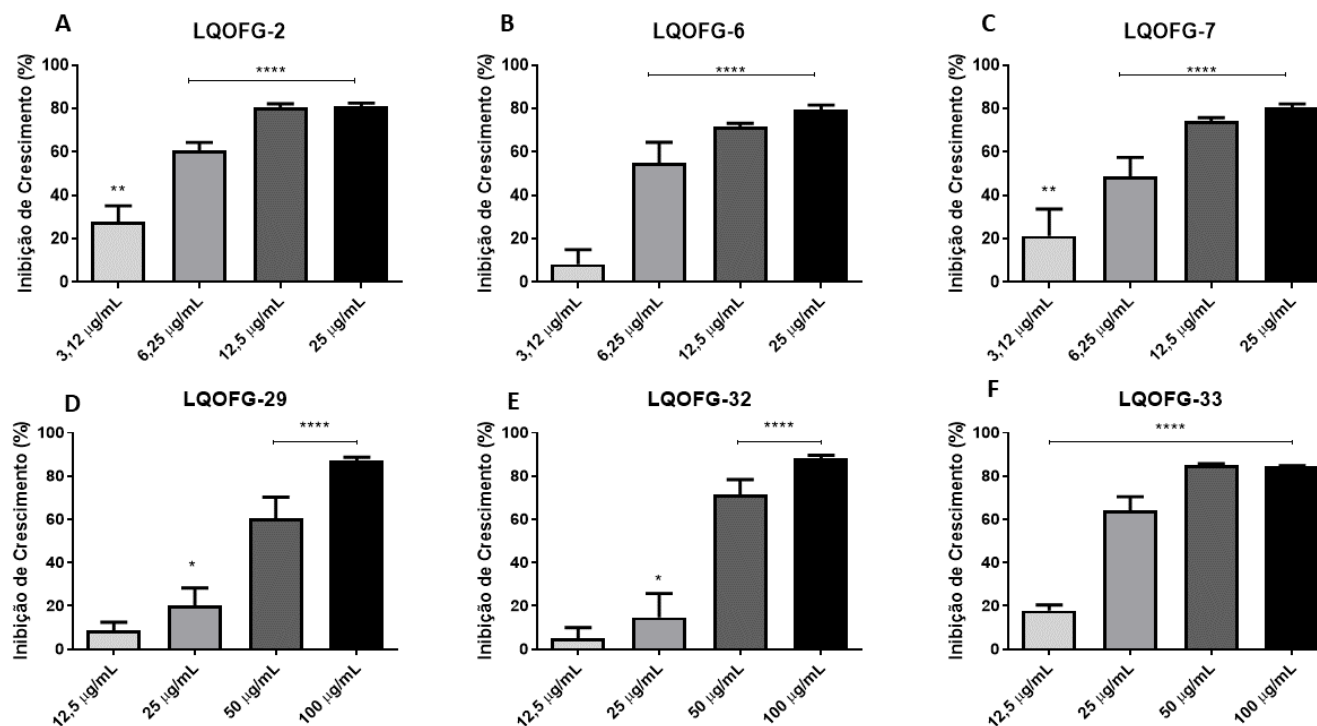
Compostos	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (μM)
LQOFG-2	5.14 ± 2.05	12.7
LQOFG-6	9.42 ± 1.86	24.4
LQOFG-7	10.76 ± 1.27	23.6
LQOFG-29	71.22 ± 4.81	153.1
LQOFG-30	N.a.	N.a.
LQOFG-31	N.a.	N.a.
LQOFG-32	57.37 ± 1.39	158.4
LQOFG-33	32.36 ± 1.84	68.1
LQOFT-1	N.a.	N.a.
LQOFT-2	N.a.	N.a.
LQOFT-3	N.a.	N.a.
LQOFS-7	N.a.	N.a.
LQOFS-8	N.a.	N.a.

LQOFS-9	N.a.	N.a.
Anfotericina B	1.41 ± 0.23	1.5

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média ± erro padrão da média da CI₅₀ calculada ao menos em três experimentos independentes. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism* 8.0. N.a = composto não ativo na maior concentração testada.

A Figura 25 representa a atividade antileishmania dos compostos derivados de guanidina sob as formas promastigotas de *L. infantum* após 72h de tratamento, em porcentagem de inibição de crescimento, que determinaram os respectivos valores de CI₅₀ na Tabela 4. Esses compostos apresentaram uma inibição de maneira dependente de concentração para as concentrações analisadas, respectivamente, quando comparadas ao controle (100% de viabilidade celular). Comparando-se a porcentagem de inibição do crescimento de promastigotas, observou-se que os derivados LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7, que apresentam como grupo substituinte o elemento bromo (-Br), o grupo t-butil e iodo (-I) respectivamente, obtiveram melhor atividade inibitória em todas as concentrações apresentadas (3,12 a 25 µg/mL) (Figura 25A, 25B e 25C), sendo estas, bem inferiores às concentrações testadas dos demais derivados LQOFG-29, LQOFG-32 e LQOFG-33 (12,5 a 100 µg/mL) (Figura 25D, 25E e 25F). Em 12,5 µg/mL, por exemplo, para os compostos LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 (Figura 25), foi observada uma inibição de 80,44 ± 1,77; 71,67 ± 1,53 e 74,28 ± 1,53% ($p < 0,0001$), respectivamente. Já para os compostos LQOFG-29, LQOFG-32 e LQOFG-33 (Figura 25D, 25E e 25F), na concentração de 50 µg/mL, a porcentagem de inibição de crescimento representada foi de 60,29 ± 9,99; 71,29 ± 7,11 e 85,09 ± 0,76 %, respectivamente.

Figura 25. Efeito dos compostos derivados de guanidina LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, LQOFG-29, LQOFG-32 e LQOFG-33 sobre a inibição de crescimento após 72 h de tratamento em formas promastigotas de *L. infantum*

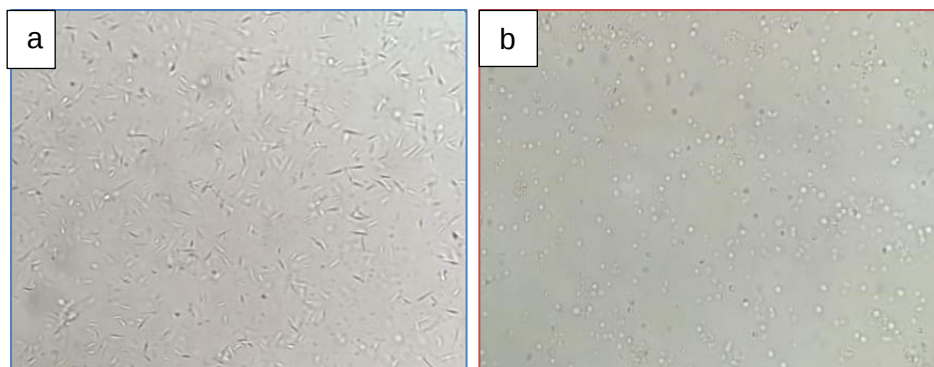


Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 7.0 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações compostos derivados de guanidina LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 a 26 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle negativo (CTL-) DMSO 0,5% como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle.

5.1.2 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos derivados de guanidina sobre as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*

Os compostos derivados de guanidina que obtiveram melhores índices de inibição de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum*, portanto os compostos LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7, juntamente com o fármaco de referência Anfotericina B, foram avaliados quanto a atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*. A partir dos ensaios *in vitro* pelo método de MTT, como descrito no tópico 4.3, obtemos a concentração citotóxica desses compostos, juntamente ao controle positivo para amastigotas axênicas de *L. infantum* (Figura 26).

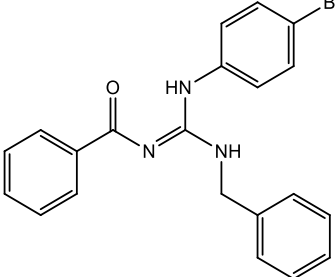
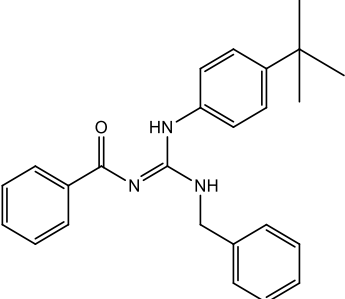
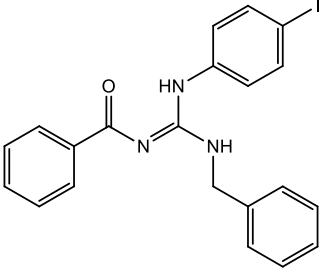
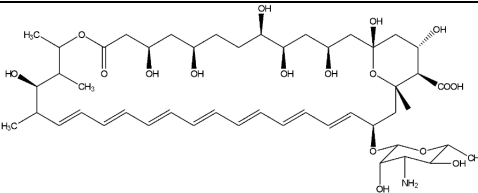
Figura 26. Processo de transformação *in vitro* da forma promastigota (a) em amastigota axênica (b).



Fonte: Laboratório de Imunologia das doenças infecciosas (LABIDIC). Observação por microscopia óptica, aumento 40x.

Os compostos LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7, apresentaram atividade citotóxica para as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum* em valores de $10,59 \pm 1,22$ (26,1 μM), $8,15 \pm 1,13$ (21,1 μM) e $8,46 \pm 1,23$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (18,6 μM), respectivamente. A anfotericina B apresentou valor de CE_{50} de $0,32 \pm 1,29$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,3 μM) (Tabela 5; Figura 27). Na concentração de 12,5, LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 apresentaram toxicidade de 57.71%, 59.88% e 58.02%, respectivamente, em relação ao controle. O composto bioativo derivado de guanidina, com substituição na posição *para*, sendo R= I (iodo), LQOFG-7, apresentou melhor resultado para tal atividade.

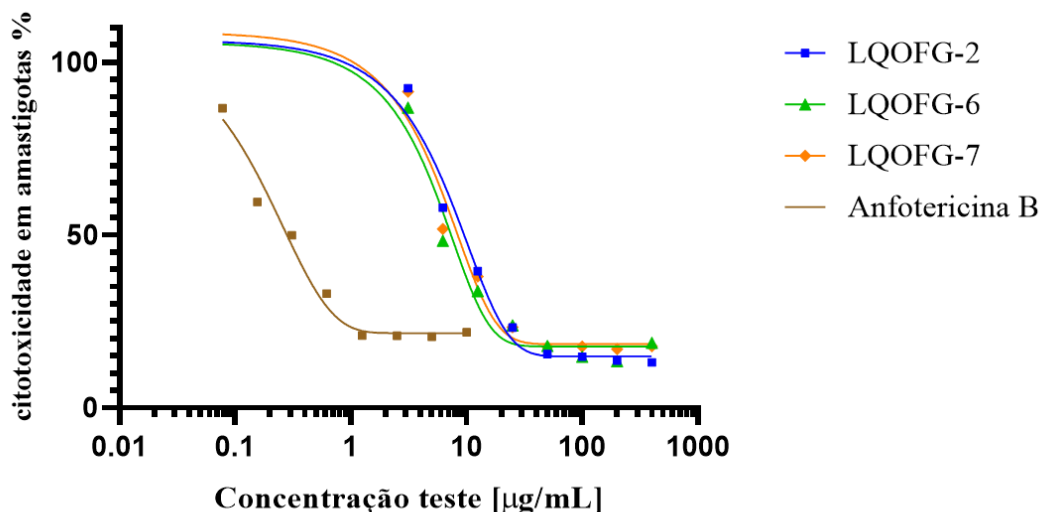
Tabela 5. Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE_{50}) de *Leishmania infantum* após 24 h de incubação com os compostos derivados de guanidina e fármaco de referência

Compostos	Estrutura molecular	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} (μM)
LQOFG-2		$10,59 \pm 1,22$	26,1
LQOFG-6		$8,15 \pm 1,13$	21,1
LQOFG-7		$8,46 \pm 1,23$	18,6
Anfotericina B		$0,32 \pm 1,29$	0,3

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média da CE_{50} calculada ao menos em três experimentos independentes. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism* 8.0.

A figura abaixo representa o efeito citotóxico desses derivados de guanidina sobre formas amastigotas axênicas de *L. infantum* após 24h de tratamento. O gráfico apresenta-se num modelo não-linear de curva dose-resposta em escala de Log na base 10 nas concentrações em $\mu\text{g/mL}$, juntamente com o fármaco controle, a anfotericina B. Pode-se observar a diminuição da viabilidade celular das amastigotas a medida que as doses desses compostos foram aumentando. Contudo, a anfotericina ainda apresentou melhor perfil de atividade citotóxica ($CE_{50} = 0,32 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$).

Figura 27 . Citotoxicidade dos derivados de guanidinas (LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7) e Anfotericina B sob a forma amastigota axênica de *L. infantum* após 24 h de tratamento.



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 5.5 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações do composto LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7, juntamente com o controle positivo, a anfotericina B, a 37 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle negativo (CTL-) DMSO 0,5% como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo.

5.1.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos de guanidina em células de mamíferos e índice de seletividade

5.1.3.1 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

A citotoxicidade frente a eritrócitos humanos dos compostos derivados de guanidina (LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7) mais promissores para atividade antiamastigota foi avaliada *in vitro* e os resultados estão descritos na Tabela 6. Os compostos avaliados não alteraram de forma significativa a viabilidade dessas células em nenhuma das concentrações testadas, tendo uma $CH_{50} > 400$ µg/mL, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular. O fármaco de referência avaliado, anfotericina B, apresentou atividade hemolítica com uma CH_{50} de 6.52 ± 2.09 µg/mL ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade desse fármaco (Tabela 6).

Tabela 6. Citotoxicidade em células humanas e índice de seletividade dos derivados guanidina e anfotericina B

Citotoxicidade			Atividade anti- <i>Leishmania</i>					
Compostos	PBMC	Eritrócitos	Promastigotas			Amastigotas		
	CC ₅₀	CH ₅₀	CI ₅₀	IS _{pbmc}	IS _e	CE ₅₀	IS _{pbmc}	IS _e
LQOFG-2	127.1 ± 3.23	>400	5.14 ± 2.05	24.72	>77.82	10.59 ± 1.22	12.00	>37.77
LQOFG-6	>400	>400	9.42 ± 1.86	>42,46	>42.46	8.15 ± 1.13	>49.08	>49.08
LQOFG-7	340.4 ± 3.58	>400	10.76 ± 1.27	31.63	>37.17	8.46 ± 1.23	40.23	>47.28
Anfotericina B	53.88 ± 3.59	6.52 ± 2.09	1.41 ± 0.23	38.21	4.62	0.32 ± 1.29	168.37	20.37

Fonte: dados próprios. Valores em µg/mL. IS_{pbmc} (índice de seletividade com células mononucleares do sistema periférico-PBMC). IS_e (índice de seletividade com eritrócitos). Os valores representam a média calculada em ao menos três experimentos independentes em triplicata ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o programa *GraphPad Prisma* 8.0.

Os compostos derivados de guanidina apresentaram um índice de seletividade na relação entre o CH₅₀/CI₅₀ de IS_e >77,82, >42,46 e > 37,17 para LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 respectivamente. E na relação CH₅₀/CE₅₀ com valores de IS_e 24,72; 42,46 e 31,63. Sendo assim mais seletivos a sua ação anti-*Leishmania* não apresentando toxicidade em hemácias na maior concentração testada.

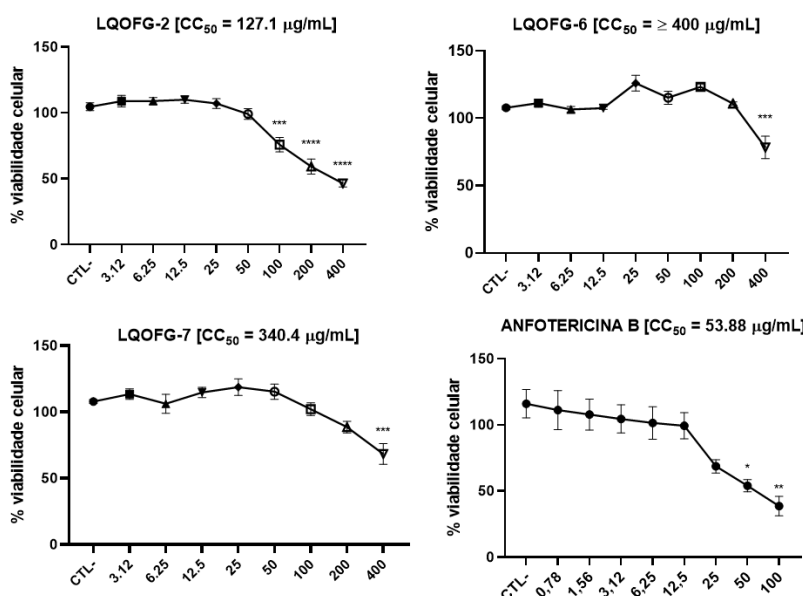
5.1.3.2 Citotoxicidade frente a células mononucleares de sangue periférico humano

Seguindo a investigação da atividade citotóxica dos compostos mais promissores do grupo das guanidinas, foi avaliado a citotoxicidade dos derivados LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 frente a células mononucleares do sangue peripérico humano, ou *human peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Após a extração das PBMC's de doadores voluntários saudáveis, seguindo o protocolo descrito no tópico 4.12, onde essas células incluem linfócitos [células T, células B e células NK (*natural killers*)], monócitos e células dendríticas cuja frequências dessas populações variam entre os indivíduos, mas normalmente os linfócitos estão

na faixa de 70 a 90%, os monócitos de 10 a 20%, enquanto as células dendríticas são raras, representando apenas 1 a 2% (KLEIVELAND; KLEIVELAND, 2015). Essas células foram plaqueadas em meio RPMI expostas aos compostos, além da Anfotericina B. A viabilidade celular das PBMCs foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento para o cálculo do CC_{50} cujos valores estão descritos na tabela 6.

A Figura 28 representa o gráfico de citotoxicidade dos derivados de guanidina e anfotericina B sobre as PBMC de doadores saudáveis. Os compostos LQOFG-2 e LQOFG-7 apresentaram seus CC_{50} nos valores de 127.1 ± 3.23 e 340.4 ± 3.58 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para o composto LQOFG-6 não foi possível calcular o valor de seu CC_{50} , sendo maior que 400 $\mu\text{g/mL}$, a maior concentração testada. O valor de CC_{50} da Anfotericina B foi de 53.88 ± 3.59 $\mu\text{g/mL}$, sendo o fármaco de referência mais citotóxico que os compostos de guanidina estudados. Portanto destaca-se a baixa citotoxicidade dos mesmos frente as células mononucleares do sistema periférico humano. Na concentração teste de 50 $\mu\text{g/mL}$ por exemplo, os compostos LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7 apresentaram uma viabilidade de 99.09 ± 4.00 ; 115.3 ± 4.80 e 115 ± 5.69 % em relação ao controle; e a Anfotericina B no valor de $53.90 \pm 4.6\%$.

Figura 28. Citotoxicidade dos compostos derivados de guanidina (LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7) e Anfotericina B sob células mononucleares do sistema periférico após 24 h de tratamento.



Fonte: Elaboração própria. As células mononucleadas do sistema periférico humano foram cultivados em meio

RPMI 1640, suplementado a 10% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações dos compostos LQOFG-2; LQOFG-6 e LQOFG-7, juntamente com a anfotericina B, a 37 °C, 5% CO₂. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle negativo (CTL-) como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle negativo.

5.1.4 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas e amastigota axênica de *L. infantum* expostas os derivados de guanidina LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7

Com a finalidade de identificar o mecanismo de ação das substâncias deste estudo, avaliamos a morte celular do parasita, utilizando a citometria de fluxo. O mecanismo de morte celular foi identificado utilizando os marcadores anexina V-FITC e IP, avaliando os estágios de morte celular em parasitas expostos a compostos de guanidina (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; JAIN; JAIN, 2018).

Primeiramente, o ensaio de morte celular foi realizado para promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos de guanidina por 24 horas, nas concentrações de 0,5, 1x, 2x e 4x CI₅₀. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B nas concentrações 1x e 4x CI₅₀. As células tratadas com meio de cultura sem fármaco foram considerados o controle negativo e DMSO a 0.5% também foi analisado como controle de veículo.

Os resultados mostram que não houve diferença estatisticamente significativa para os derivados de guanidina (LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7) para nenhum dos marcadores. Não houve diferença significativa no perfil de morte celular entre o grupo controle negativo e o grupo DMSO a 0.5%, demonstrando que a concentração utilizada do solvente DMSO não interfere nos ensaios de citotoxicidade realizados nesse estudo, mantendo a viabilidade celular. A anfotericina B apresentou apoptose tardia para $4.30 \pm 0,28\%$ na concentração 1x CI₅₀ e $65.83 \pm 1.85\%$ na concentração de 4x CI₅₀. A porcentagem que caracteriza desintegração da membrana [anexina V (-)-PI (+)], ou seja, necrose celular, foi de $7.64 \pm 1.17\%$ em 1x CI₅₀ e $33.10 \pm 1.90\%$ em 4x CI₅₀ (valor $p \leq 0,0001$).

Tabela 7. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h.

	% Células		
	Anexina +/PI-	Anexina+/PI+	Anexina-/PI+
Controle	0.89 ± 0.15	0.25 ± 0.07	0.71 ± 0.09
DMSO 0.5%	0.62 ± 0.06	0.60 ± 0.08	0.83 ± 0.01
LQOFG-2 0.5x CI₅₀	0.27± 0.09	0.55 ± 0.04	1.69 ± 0.28
LQOFG-2 1x CI₅₀	0.12 ± 0.02 ^a	0.41 ± 0.14	2.07 ± 0.23
LQOFG-2 2x CI₅₀	0.35 ± 0.01	0.78 ± 0.15	1.52 ± 0.24
LQOFG-2 4x CI₅₀	0.34 ± 0.09	0.63 ± 0.12	1.79 ± 0.59
LQOFG-6 0.5x CI₅₀	0.65 ± 0.19	0.18 ± 0.01	0.85 ± 0.09
LQOFG-6 1x CI₅₀	0.46 ± 0.13	0.20 ± 0.03	1.47 ± 0.21
LQOFG-6 2x CI₅₀	0.51 ± 0.08	0.32 ± 0.06	1.37 ± 0.22
LQOFG-6 4x CI₅₀	0.91 ± 0.34	0.20 ± 0.03	1.06 ± 0.07
LQOFG-7 0.5x CI₅₀	0.28 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.87 ± 0.17
LQOFG-7 1x CI₅₀	0.77 ± 0.04	0.41 ± 0.08	1.19 ± 0.12
LQOFG-7 2x CI₅₀	0.76 ± 0.10	0.26 ± 0.09	1.37 ± 0.22
LQOFG-7 4x CI₅₀	0.39 ± 0.08	0.18 ± 0.07	1.06 ± 0.07
Anfotericina B 1x CI₅₀	0.67 ± 0.27	4.30 ± 0.28 ^d	7.64 ± 1.17 ^d
Anfotericina B 4x CI₅₀	0.27 ± 0.09	65.83 ± 1.85 ^d	33.10 ± 1.90 ^d

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em promastigotas ± S.E.M de três experimentos independentes em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. Controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. Controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. Controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

Os mesmos parâmetros experimentais para o ensaio de morte celular foram utilizados para avaliar morte celular em as amastigotas axênicas de *L. infantum*: amastigotas em sua fase estacionária foram tratadas por 24 horas a 37°C, nas concentrações de 0.5, 1, 2 e 4x CE₅₀. Como controle positivo foi utilizado o fármaco Anfotericina B nas concentrações de 1x e 4x CE₅₀. O DMSO foi testado a 0.5% e, como controle negativo, células em meio schneider sem tratamento.

Duas subpopulações observadas no *dotsplot* FSC-A versus SSC-A foram classificadas em subpopulações de amastigotas 1 e amastigotas 2. Na subpopulação 1, observamos um perfil de células viáveis em sua maior proporção por não expressar os marcadores de morte celular [anexina V (-)–PI (-)]. Porém o composto LQOFG-7 na concentração de 2x CE₅₀, induziu

apoptose inicial em $21,43 \pm 1,00\%$ em relação ao controle. A anfotericina B induziu um perfil típico de apoptose inicial ($24,25 \pm 0,95\%$) e tardia ($15,85 \pm 1,25\%$) na concentração de 1x CE₅₀, morte celular por necrose ($35,53 \pm 1,10\%$) na concentração de 4x CE₅₀ (tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de *Leishmania infantum* tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h para sub-população 1.

% células (sub-população amastigota 1)			
	Anexina+/PI-	Anexina+/PI+	Anexina-/PI+
Células	12.45 $\pm$ 2.70	7.06 $\pm$ 0.81	5.24 $\pm$ 0.39
DMSO 0.5%	15.90 $\pm$ 2.10	6.08 $\pm$ 1.06	3.99 $\pm$ 0.48
LQOFG-2 0.5x CE₅₀	16.20 $\pm$ 2.03	8.57 $\pm$ 0.18	9.75 $\pm$ 0.97
LQOFG-2 1x CE₅₀	18.60 $\pm$ 0.85	9.46 $\pm$ 2.06	7.31 $\pm$ 1.42
LQOFG-2 2x CE₅₀	16.60 $\pm$ 1.39	7.90 $\pm$ 0.82	9.26 $\pm$ 0.54
LQOFG-2 1x CE₅₀	16.77 $\pm$ 2.15	8.02 $\pm$ 0.87	10.58 $\pm$ 0.43
LQOFG-6 0.5x CE₅₀	17.30 $\pm$ 1.76	10.76 $\pm$ 1.72	10.69 $\pm$ 0.99
LQOFG-6 1x CE₅₀	16.17 $\pm$ 1.27	10.47 $\pm$ 1.64	12.09 $\pm$ 1.07
LQOFG-6 2x CE₅₀	16.80 $\pm$ 0.95	10.87 $\pm$ 0.14	8.16 $\pm$ 0.77
LQOFG-6 4x CE₅₀	20.47 $\pm$ 0.97	11.68 $\pm$ 2.45	4.47 $\pm$ 2.31
LQOFG-7 0.5x CE₅₀	16.60 $\pm$ 2.24	10.76 $\pm$ 1.51	9.34 $\pm$ 0.99
LQOFG-7 1x CE₅₀	16.27 $\pm$ 1.23	9.94 $\pm$ 2.00	12.40 $\pm$ 1.32
LQOFG-7 2x CE₅₀	21.43 $\pm$ 1.00 ^a	13.10 $\pm$ 2.52	7.87 $\pm$ 1.31
LQOFG-7 4x CE₅₀	19.63 $\pm$ 0.29	11.90 $\pm$ 0.89	7.67 $\pm$ 0.55
Anfotericina B 1x CE₅₀	24.25 $\pm$ 0.95 ^b	15.85 $\pm$ 1.25	9.32 $\pm$ 1.76
Anfotericina B 4x CE₅₀	7.21 $\pm$ 1.07	38.75 $\pm$ 1.85 ^d	35.53 $\pm$ 1.10 ^d

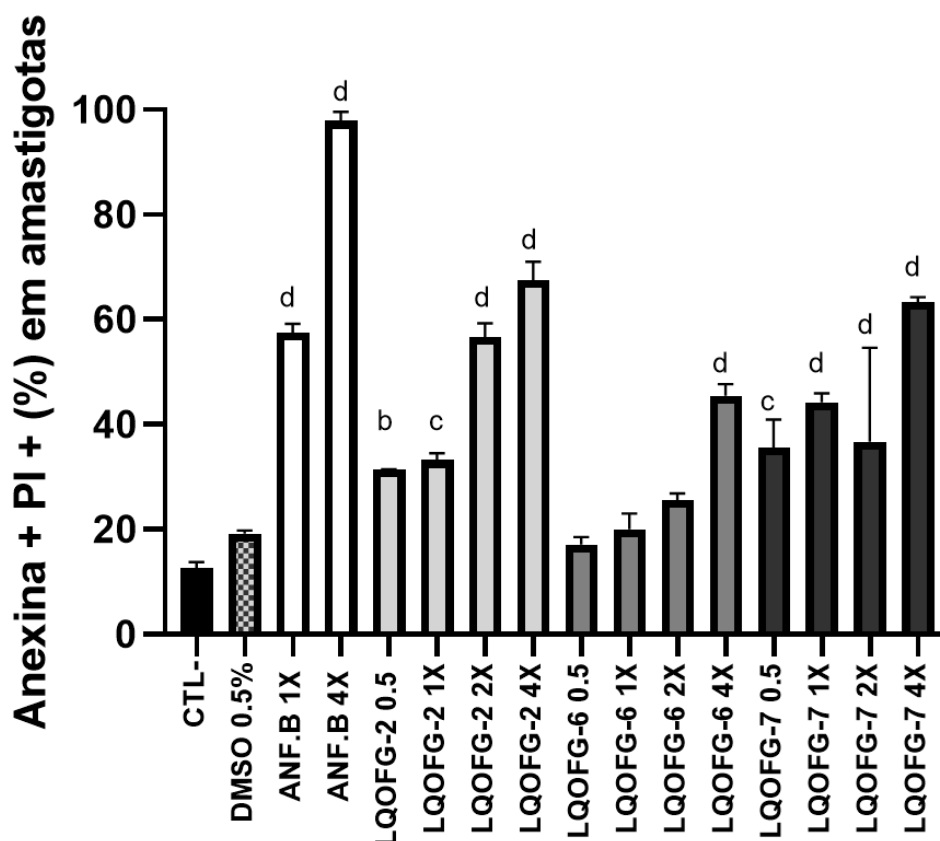
Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em amastigota axênica $\pm$ SEM em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

Já na subpopulação 2, os resultados que caracterizam de morte celular do parasita, ou seja, apoptose inicial [anexina V (+)–PI (–)], células apoptóticas tardia [anexina V (+)–PI (+)], e morte celular por necrose [anexina V (–)–PI (+)], são apresentados na Tabela 9 e Figura 24. Não houve diferença estatística entre o controle negativo (não tratado) e DMSO 0.5%. Os compostos derivados de guanidina induziram morte por apoptose tardia, anexina V (+)–PI (+) (Figura 29; Tabela 9), em todas as concentrações testadas para LQOFG-2, com percentual de

morte variando de $31,43 \pm 0,03$ ($p < 0,01$); $33,23 \pm 0,73$ ($p < 0,01$); $56,27 \pm 1,51$ ($p < 0,0001$) e $67,50 \pm 2,05$ ($p < 0,0001$) % para 0,5, 1x, 2x e 4x seu CE_{50} respectivamente. Para o composto LQOFG-6, o perfil de morte por apoptose foi significativo em 4x com porcentagem de $45,47 \pm 1,30$ % ($p < 0,0001$).

O tratamento com LQOFG-7 resultou em morte celular estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas, com percentuais de $35,53 \pm 3,13^c$; $44,20 \pm 1,01^d$; $36,70 \pm 10,35^d$ e $63,27 \pm 0,59^d$ %, também demonstrados na Figura 25. Não houve diferença significativa para o entre o controle negativo e tratamento, tanto DMSO 0.5% e derivados de guanidina, para a condição Anexina -/PI+, com exceção da Anfotericina B em 4x EC_{50} . A anfotericina B apresentou um percentual de apoptose tardia de $57,50 \pm 1,72\%$ na concentração 1x EC_{50} e $97,87 \pm 1,01\%$ na concentração 4x EC_{50} .

Figura 29. Morte celular por apoptose de formas amastigotas axênicas de *L. infantum* expostas aos compostos derivados de guanidina (LQOFG-2; LQOFG-6 e LQOFG-7), Anfotericina B e controles.



Legenda: As amastigotas de *L. infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na ausência ou presença dos compostos de guanidina ou anfotericina B (ANF. B) em concentrações de 0,5, 1x, 2x ou 4x CE₅₀. Foi realizada coloração com anexina V/PI (iodeto de propídio) e as amostras analisadas por citometria de fluxo (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo [CLT- (células sem tratamento)]. ANF (anfotericina B).

Tabela 9. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de *Leishmania infantum* tratados com os derivados de guanidina e anfotericina B por 24h para subpopulação 2.

% Células (subpopulação amastigota 2)			
	Anexina+/PI-	Anexina+/PI+	Anexina-/PI+
Controle	1.99 ± 0.29	12.63 ± 0.68	15.57 ± 0.33
DMSO 0.5%	5.86 ± 0.59	24.25 ± 5.55	13.00 ± 2.26
LQOFG-2 0.5x CE₅₀	5.68 ± 0.29 ^a	31.43 ± 0.03 ^b	13.20 ± 1.62

LQOFG-2 1x CE₅₀	8.13 ± 0.84 ^d	33.23 ± 0.73 ^c	11.97 ± 0.66
LQOFG-2 2x CE₅₀	7.68 ± 0.39 ^d	56.27 ± 1.51 ^d	15.93 ± 1.02
LQOFG-2 4x CE₅₀	7.55 ± 1.18 ^d	67.50 ± 2.05 ^d	13.80 ± 1.47
LQOFG-6 0.5x CE₅₀	3.62 ± 0.39	17.10 ± 0.80	13.20 ± 1.62
LQOFG-6 1x CE₅₀	4.05 ± 0.22	20.00 ± 1.74	6.57 ± 1.20
LQOFG-6 2x CE₅₀	5.72 ± 0.20 ^a	25.50 ± 0.80	7.15 ± 0.21
LQOFG-6 4x CE₅₀	9.06 ± 0.70 ^d	45.47 ± 1.30 ^d	8.14 ± 0.78
LQOFG-7 0.5x CE₅₀	5.56 ± 0.46 ^a	35.53 ± 3.13 ^c	9.83 ± 1.27
LQOFG-7 1x CE₅₀	5.84 ± 0.57 ^b	44.20 ± 1.01 ^d	13.53 ± 0.32
LQOFG-7 2x CE₅₀	10.02 ± 1.53 ^d	36.70 ± 10.35 ^d	5.63 ± 1.24
LQOFG-7 4x CE₅₀	8.01 ± 0.14 ^d	63.27 ± 0.59 ^d	12.27 ± 0.48
Anfotericina B 1x CE₅₀	4.73 ± 0.97	57.50 ± 1.72 ^d	11.52 ± 1.89
Anfotericina B 4x CE₅₀	0.60 ± 0.42	97.87 ± 1.01 ^d	0.96 ± 0.33 ^d

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em amastigotas-subpopulação 2 ± S.E.M em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

5.1.5 Avaliação da taxa de infecção e indução da síntese de óxido nítrico mediante infecção de monócitos humanos por *Leishmania infantum*

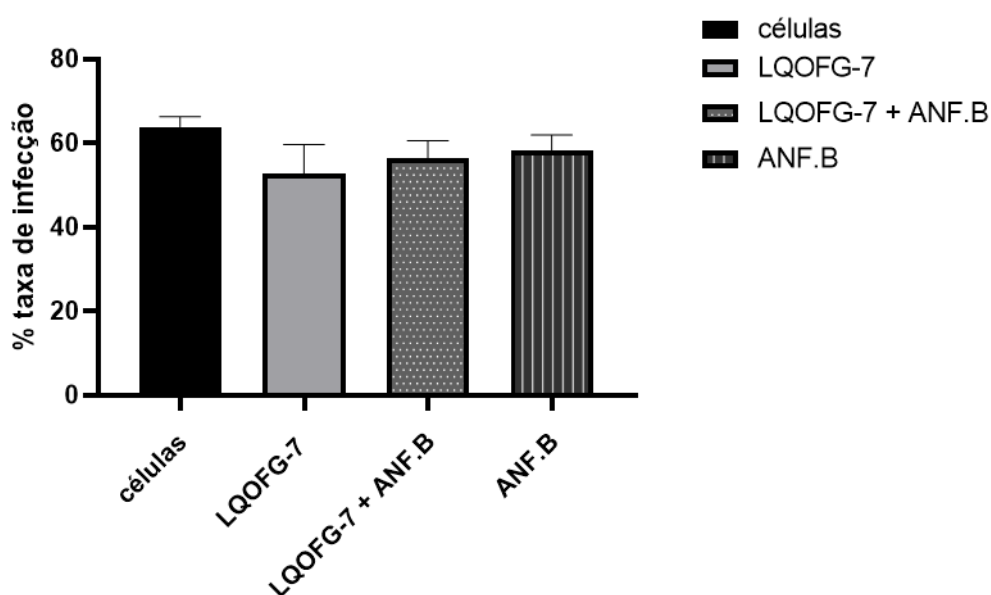
Como o derivado de guanidina LQOFG-7 foi o composto mais ativo com base em sua atividade anti-*Leishmania*, baixa toxicidade em PBMCs humanos e capacidade de induzir a morte por apoptose em amastigotas de *L. infantum*, este composto foi selecionado para investigar a influência na infecção de monócitos humanos com a forma promastigota de *L. infantum* além da produção de espécies reativas de nitrogênio.

Para determinar a taxa de infecção e determinar a produção de nitrito após 24 h, PBMCs de indivíduos saudáveis (n=5) foram tratados com LQOFG-7 na concentração no valor de seu respectivo CE₅₀, (8.46 µg/mL) nos ensaios *in vitro*. A anfotericina B como fármaco de referência (0.32 µg/mL). Ademais, também foi utilizado como controle positivo e estímulo representando um ambiente inflamatório, o LPS a 100ng/mL e o controle negativo (células sem tratamento).

Não houve diferenças significativas nas taxas de infectividade entre as células de controle não tratadas (63.90 ± 2.42%) e as células infectadas tratadas com LQOFG-7 (52.73 ± 6.98%), Anfotericina B (58.23 ± 3.72%) ou LQOFG-7 + Anfotericina B (56.43 ± 4.22%) (Figura 30). Os resultados referentes à indução da síntese de óxido nítrico em monócitos

humanos nas condições com infecção e sem infecção, por um período de 24 horas estão presentes na Figura 31. Após realizar o protocolo de infecção descritos no tópico 4.16, as células (PBMC) foram tratadas em diferentes condições e o sobrenadante oriundo da cultura após 24h de tratamento foi coletado para medição de nitrito.

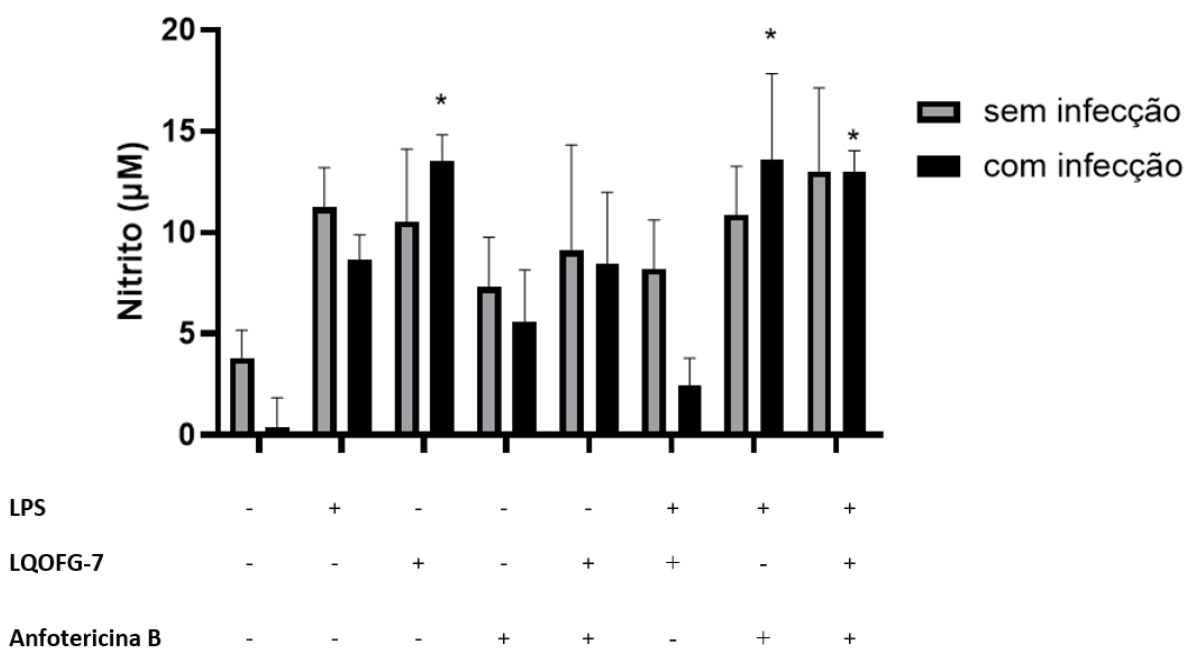
Figura 30. Efeito do composto LQOFG-7 e anfotericina B sobre a taxa de infecção de monócitos por *Leishmania infantum* após 24 h de tratamento



Fonte: Dados próprios. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram incubadas com monócitos humanos a 37 °C por 24 h na presença da LQOFG-7 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de seus CE₅₀. As formas promastigotas foram marcadas com CFSE (Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) e os monócitos com CD14 e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. ANF.B representa Anfotericina B.

Observou-se um aumento significativo na produção de nitrito em monócitos infectados tratados com LQOFG-7 ($13,5 \pm 1,30 \mu\text{M}$) em comparação com o grupo infectado sem tratamento ($0,367 \pm 1,48 \mu\text{M}$). Não houve diferença significativa entre as células tratadas com LPS e o tratamento com LQOFG-7 em ambas as condições. Na condição monócitos sem infecção tratados com LQOFG-7, houve uma produção de nitrito no valor de $10,5 \pm 3,58 \mu\text{M}$. A partir deste ensaio, temos que o derivado de guanidina LQOFG-7 induziram à produção de nitrito em PBMCs. Observa-se também uma baixa produção de nitrito por monócitos infectados com *L. infantum* e sem tratamento ($0,367 \pm 1,48 \mu\text{M}$) em relação a condição sem infecção ($3,81 \pm 1,36 \mu\text{M}$). Já os monócitos tratados LPS produziram nitrito no valor de $8,67 \pm 1,23 \mu\text{M}$ na infecção e $11,2 \pm 1,96 \mu\text{M}$ em monócitos não-infectados com *L. infantum*.

Figura 31. Níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *Leishmania infantum* tratados com LQOFG-7 e controles



Fonte: Elaboração própria. Os níveis de nitrito foram dosados pela reação de Griess, a partir dos sobrenadantes coletados do ensaio de taxa de infecção de monócitos com *L. infantum* no sangue periférico de indivíduos saudáveis. * $P < 0.05$ em relação ao controle (sem tratamento). O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey foi realizado para comparar os grupos com o controle.

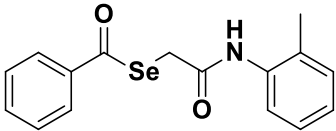
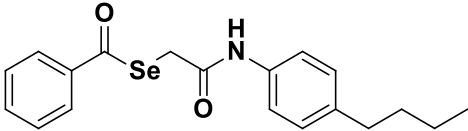
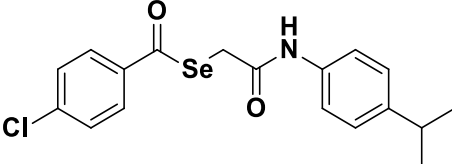
Também foi avaliado o efeito do tratamento com a Anfotericina B (EC50) na produção de nitrito. Não houve aumento significativo na produção de nitrito em monócitos infectados tratados com anfotericina B ($5,49 \pm 2,55 \mu\text{M}$) comparados com o controle sem tratamento. No entanto, os monócitos ativados por LPS [anfotericina (+); LPS (+)] exibiram um aumento significativo na produção de nitrito ($13,6 \pm 4,25 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$) em comparação com células infectadas não tratadas ($0,367 \pm 1,48 \mu\text{M}$). Além disso, avaliou-se a possibilidade um efeito sinérgico entre o tratamento com anfotericina B e LQOFG-7 e como resultado temos que houve um aumento na produção de nitrito ($p < 0,05$; $13,0 \pm 1,04 \mu\text{M}$) nos monócitos ativados por LPS. Por fim partindo desse ensaio, temos que o derivado de guanidina LQOFG-7 aparenta induzir e/ou restituir a produção de óxido nítrico por células mononucleares do sistema periférico humano.

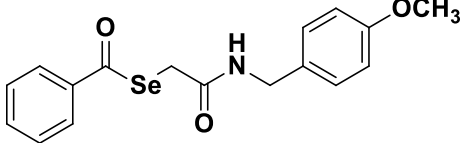
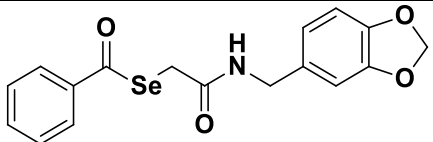
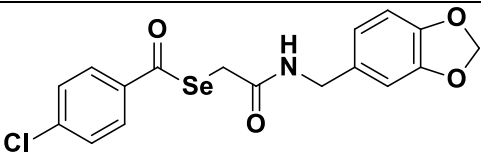
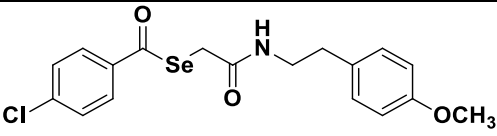
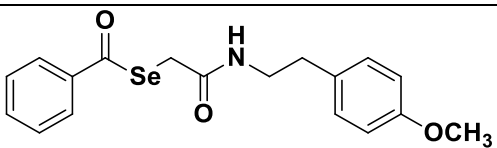
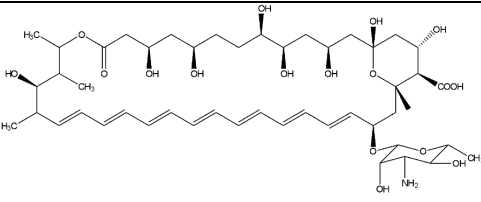
5.2 RESULTADOS: SELENOGLICOLICAMIDAS

5.2.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* das selenoglicolicamidas sobre as formas promastigotas de *Leishmania infantum*

A atividade anti-*Leishmania* dos compostos selenoglicolicamidas foi avaliada em ensaios *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*. O screening dos derivados de selênio foi feito inicialmente com 9 compostos (Tabela 2). O composto C4CB (composto de partida na síntese), não apresentou atividade na maior concentração testada (400 µg/mL). Portanto destes, 8 compostos apresentaram perfil inibitório nas concentrações testadas, sendo possível o cálculo da CI₅₀ desses compostos. As concentrações citotóxicas de inibição (CI₅₀) dos compostos MSe 10, MSe 11, MSe 13, MSe 16, MSe 17, MSe 18, MSe 19 e MSe 20 foram em µg/mL de 20,50 ; 1,34; 4,83 ; 57,57 ; 68,96 ; 32, 51 ; 2,89 e 34,75 , respectivamente. Na tabela 10 temos a atividade das selenoglicolicamidas nas formas promastigotas junto com a fórmula estrutural de cada composto. Destaca-se a expressiva atividade anti-*Leishmania* dos composto MSE 11, MSE 13 e MSE 19, sendo assim estes os escolhidos para o prosseguimento dos ensaios posteriores para investigação das atividades propostas neste trabalho.

Tabela 10. Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀) de *Leishmania infantum* após 72 h de incubação com os compostos selenoglicolicamidas e fármaco de referência

Compostos	Estrutura molecular	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µM)
MSe 10		20.50 ± 1.57	61,7
MSe 11		1.34 ± 1.41	3,6
MSe 13		4,83 ± 0.64	12,2

MSe 16		57.57 ± 9.98	158,9
MSe 17		68.96 ± 11.73	183,3
MSe 18		32.51 ± 2.07	79,2
MSe 19		2.89 ± 1.71	7,0
MSe 20		34.75 ± 2.10	92,3
Anfotericina B		1.41 ± 2.96	1,5

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média ± erro padrão da média da CI_{50} calculada ao menos em três experimentos independentes. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism* 8.0.

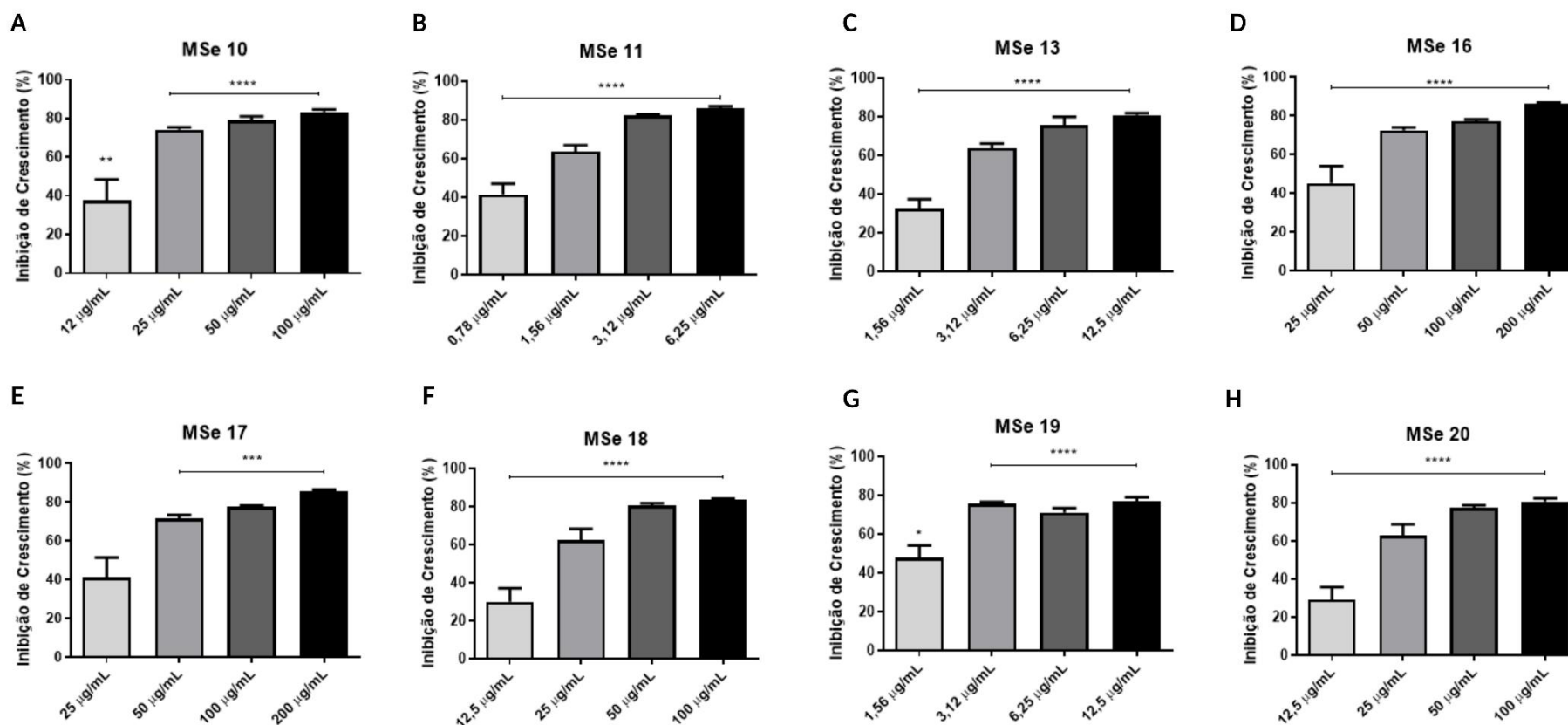
A figura 32 (A a H) representa o efeitos dos compostos selenoglicolicamidas (MSe 10, MSe 11, MSe 13, MSe 16, MSe 17, MSe 18, MSe 19 e MSe 20) na porcentagem de inibição de crescimento sob as formas promastigotas de *L. infantum* após 72h de tratamento, que determinaram os respectivos valores de CI_{50} na tabela 10. Esses compostos apresentaram uma capacidade inibitória de maneira dependente de concentração para as concentrações analisadas, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (0% de inibição).

Destaca-se a atividade anti-*Leishmania* dos compostos MSe 11, MSe 13 e MSe 19 representados na figura 32B, 32C e 32G, onde na concentração de 3,12 µg/mL apresentou porcentagem de inibição de crescimento $82,36 \pm 0,65$; $63,77 \pm 2,05$ e $75,82 \pm 0,91\%$

($p < 0,0001$) respectivamente. A MSe 11, MSe 13 e MSe 19 apresentaram como grupos substituintes o butil ($-C_4H_9$), isopropil ($-C_3H_7$) e metoxila ($-OCH_3$) em R2. Já os compostos MSe 17 e MSe 18 possuem o anel metilenodioxi em sua estrutura, e adição do elemento cloro em R5 na MSe 18, conferiu CI_{50} de $32,51 \pm 2,07$ $\mu\text{g/mL}$. Na concentração 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma porcentagem de inibição de $41,15 \pm 10,26$ e $62,55 \pm 5,79\%$, respectivamente (Figura 32E e 32F). Quanto a MSe 19 (Figura 32G) e MSe 20 (Figura 32H) nota-se que ao adicionar um grupo cloro em R5, houve um aumento na capacidade de inibição de crescimento, o que refletiu no seu valor de CI_{50} que foi de 2,89 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 10). Na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ a MSe 19 inibiu em $77,08 \pm 2,09\%$; enquanto que a MSe 20 apresentou percentual de inibição de $29,30 \pm 6,66\%$.

Comparando-se o grau de inibição do crescimento de promastigotas, observou-se que os compostos de selênio MSe 11, MSe 13 e MSe 19 apresentaram atividade antipromastigota em todas as concentrações testadas (1,56 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$), sendo estas, bem inferiores às concentrações testadas das demais selenoglicolicamidas (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$). Diante dos resultados avaliados, de acordo com atividade anti-promastigota em *L. infantum* das selenoglicolicamidas, foram selecionados os três compostos mais bioativos para os ensaios seguintes, em busca de novos compostos promissores para o seguimento do estudo. Estes compostos foram as selenoglicolicamidas MSe 11, MSe 13 e MSe 19 com seus CI_{50} de $1,34 \pm 1,41$; $4,83 \pm 0,64$ e $2,89 \pm 1,71$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 32. Efeito dos compostos seleniglicolicamidas MSe 10, MSe 11, MSe 13, MSe 16, MSe 17, MSe 18, MSe 19 e MSe 20 sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento.

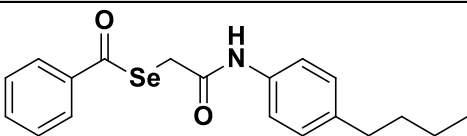
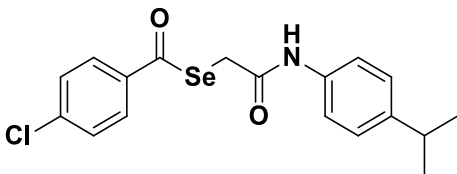
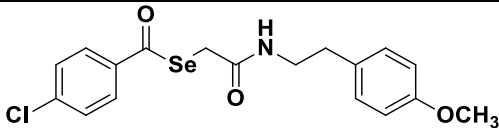
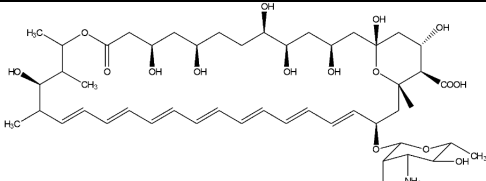


Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 7.0 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações compostos seleniglicolicamidas MSe 10, MSe 11, MSe 13, MSe 16, MSe 17, MSe 18, MSe 19 e MSe 20 a 26 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle negativo (CTL-) DMSO 0,5% como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle.

5.2.2 Avaliação da atividade anti-*Leishmania* das selenoglicolicamidas sobre amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*

Os compostos selenoglicolicamidas MSe 11, MSe 13 e MSe 19 foram selecionados após os ensaios da avaliação da atividade anti-*Leishmania* em promastigotas de acordo com seus respectivos CI_{50} , obtendo melhores respostas. Os 3 compostos bioativos foram assim avaliados juntamente com o fármaco de referência, a Anfotericina B, quanto a atividade anti-*Leishmania* sobre as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*. A partir dos ensaios *in vitro* pelo método de MTT, como descrito no tópico 4.3, obtemos a concentração citotóxica desses compostos, juntamente ao controle positivo para amastigotas axênicas de *L. infantum*, representados na tabela 11.

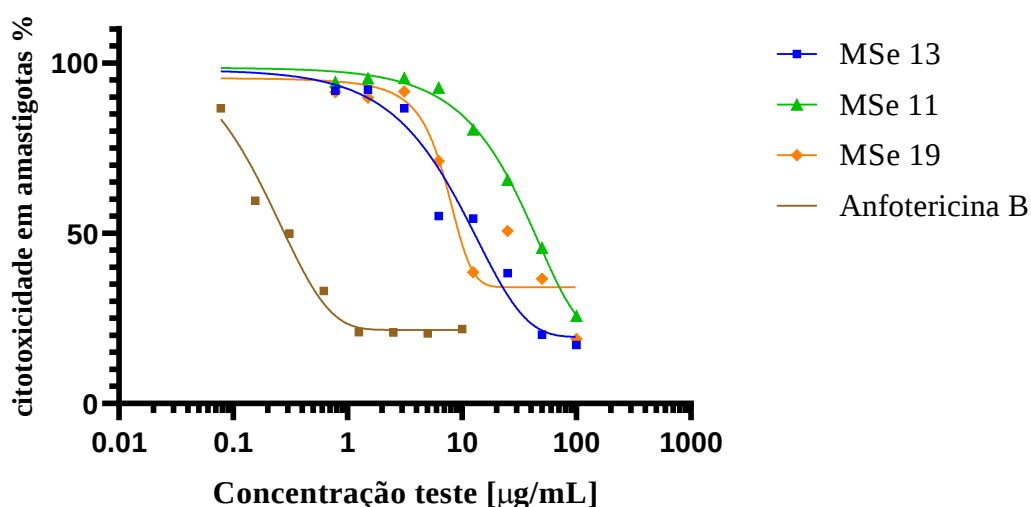
Tabela 11. Concentração efetiva sobre 50% da população de formas amastigotas axênicas (CE_{50}) de *Leishmania infantum* após 24 h de incubação com os compostos selenoglicolicamidas e fármaco de referência

Compostos	Estrutura molecular	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} (μM)
MSe 11		$46,08 \pm 1,73$	123,1
MSe 13		$14,59 \pm 1,44$	37,0
MSe 19		$119,20 \pm 1,51$	290,2
Anfotericina B		$0,32 \pm 1,29$	0,3

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da CE_{50} calculada ao menos em três experimentos independentes. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão não-linear com o programa *GraphPad Prism* 8.0.

Os compostos selenoglicolicamidas obtiveram valores de CE_{50} de 46.08 ± 1.73 ; 14.59 ± 1.44 e 119.20 ± 1.51 $\mu\text{g/mL}$ para MSe 11, MSe 13 e MSe 19, e o fármaco de referência (como controle positivo), a anfotericina B com valor de CE_{50} 0.32 ± 1.29 $\mu\text{g/mL}$. Observa-se que a atividade citotóxica foi menos expressiva em comparação a atividade anti-*Leishmania* na forma promastigota descrita no tópico 5.2 dos compostos testados. Todavia a selenoglicolicamida MSe 13 obteve melhor atividade citotóxica nas formas amastigota axênica de *Leishmania infantum* (tabela 11), com perfil de atividade farmacológica dependente de concentração. Seus valores de percentagem de citotoxicidade foram de 20.18 ± 1.47 ; 38.31 ± 4.61 ; 56.18 ± 2.3 ; 60.36 ± 3.85 %, para as concentrações testadas 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Figura 33 . Citotoxicidade dos compostos selenoglicolicamidas (MSe 11, MSe 13 e MSe 19) e Anfotericina B sob a forma amastigota axênica de *L. infantum* após 24 h de tratamento.



Fonte: Elaboração própria. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider pH 5.5 e 20% de SFB e incubados na presença de diferentes concentrações do composto MSe 11, MSe 13 e MSe 19, juntamente com o controle positivo, a anfotericina B, a 37 °C. A citotoxicidade dos parasitos foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolium brometo (MTT) após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes.

A Figura 33 representa o gráfico de curva dose-resposta dos compostos selenoglicolicamidas testados nas concentrações seriadas de 100 a 0.78 $\mu\text{g/mL}$ e a anfotericina B nas concentrações de 10 a 0.078 $\mu\text{g/mL}$. Nos dados demonstrados temos uma regressão do tipo não-linear. A MSe 11, MSe 13 e MSe 19 apresentaram como grupos substituintes o butil

(-C₄H₉), isopropil (-C₃H₇) e metoxila (-OCH₃) em R₂, respectivamente. O composto com o grupo isopropil (MSe 13) substituído apresentou melhor resposta na citotoxicidade em amastigotas axênicas (CE₅₀= 14.59 ± 1.44 µg/Ml), portanto sendo o mais promissor do grupo analisado.

5.2.3 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas e amastigota axênica de *L. infantum* expostas a selenoglicolicamida MSe 13

De modo semelhante, seguindo o tópico 5.5, foi investigado o perfil de morte celular das formas promastigota e amastigota axênica de *Leishmania infantum* tratadas com a selenoglicolicamida MSe 13 e controles, utilizando a citometria de fluxo com anexina V-FITC e marcação PI para identificar os estágios de morte celular em parasitas expostos a selenoglicolicamida MSe 13.

Primeiramente, o ensaio de morte celular foi realizado para promastigotas de *L. infantum* tratadas com o composto MSe 13 por 24 horas, nas concentrações de 0.5x, 1x, 2x e 4x CI₅₀. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B nas concentrações 1x e 4x CI₅₀. As células em meio de cultura e sem tratamento foram considerados o controle negativo e DMSO a 0.5% também foi testado como grupo controle.

Como resultados, demonstrados em porcentagem de morte celular descritos na tabela 12, vimos que não houve diferença estatisticamente significativa entre células sem tratamento e o composto MSe 13 nas concentrações testadas para os parâmetros entre células apoptóticas em estado inicial [anexina V (+)/PI (-)], células apoptóticas em estado tardio [anexina V (+)/PI (+)]. Contudo, a selenoglicolicamida na concentração 4x seu valor de CI₅₀ ocasionou morte celular por necrose [anexina V (-)/PI (+)] em 3.71 ± 0.32 % (p<0.05; tabela 12). O fármaco de referência, a anfotericina B, apresentou diferença estatística nas concentrações testadas para os parâmetros de morte celular por apoptose tardia e necrose, como já descrito no tópico anterior. Não houve diferença estatística significativa também entre o controle sem tratamento e células expostas a DMSO 0.5% para nenhum dos parâmetros.

Tabela 12. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratados com selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h.

% Células			
	Anexina +/PI-	Anexina+/PI+	Anexina-/PI+
Controle	0.89 ± 0.15	0.25 ± 0.07	0.71 ± 0.09
DMSO 0.5%	0.62 ± 0.06	0.60 ± 0.08	0.83 ± 0.01
MSe 13 0.5x CI₅₀	0.22 ± 0.03	0.28 ± 0.03	1.16 ± 0.43
MSe 13 1x CI₅₀	0.54 ± 0.05	0.39 ± 0.08	1.02 ± 0.19
MSe 13 2x CI₅₀	0.73 ± 0.14	1.35 ± 0.06	3.44 ± 0.26
MSe 13 4x CI₅₀	0.43 ± 0.13	0.11 ± 0.02	3.71 ± 0.32 ^a
Anfotericina B 1x CI₅₀	0.67 ± 0.27	4.30 ± 0.28 ^d	7.64 ± 1.17 ^d
Anfotericina B 4x CI₅₀	0.27 ± 0.09	65.83 ± 1.85 ^d	33.10 ± 1.90 ^d

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em promastigotas ± S.E.M de três experimentos independentes em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. Controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. Controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. Controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

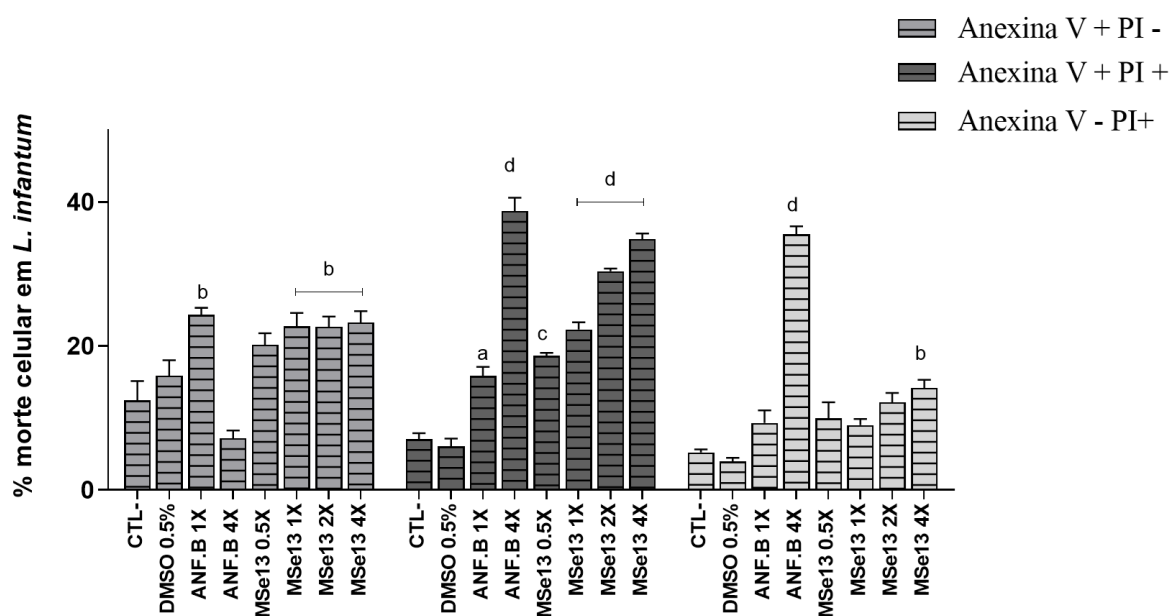
Posteriormente, foi realizado o ensaio de morte celular para as formas amastigotas axênicas de *Leishmania infantum*, também num período de 24h a 37°C, nas concentrações 0.5x, 1x, 2x e 4x a partir dos valores de CE₅₀ calculados pelo ensaio de viabilidade celular apresentado anteriormente. Foi observado duas subpopulações apresentadas no gráfico FSC-A versus SSC-A, e foram classificadas em subpopulações de amastigotas 1 e amastigotas 2 (figura 21 e figura 23).

Partindo da estratégia de análise, após selecionar a subpopulação 1 na relação Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) x Iodeto de Propídio (PI)- PerCP-Cy5, pode-se observar o perfil de morte celular da *L. infantum* tratadas com a selenoglicolicamida MSe 13, Anfotericina B como controle positivo, DMSO 0.5% e célula sem tratamento (controle) representados na Figura 34 e Tabela 13. Não houve diferença estatisticamente significativa entre células expostas a DMSO 0.5% e controle para todos os parâmetros de análise utilizados, mostrando que a maior concentração residente de DMSO nos ensaios não afeta a viabilidade celular. No parâmetro de análise que caracteriza apoptose inicial [anexina V (+)/PI (-)], o composto MSe 13 induziu morte celular nas concentrações 1x, 2x e 4x seu CE₅₀ nas porcentagens de 22.73 ± 1.88; 22.67 ± 1.43 e 23.27 ± 1.59 % ($p < 0.01$) respectivamente.

A Anfotericina B induziu morte celular na concentração 1x CE₅₀ de 24.25 ± 0.95 %, não havendo diferença estatística entre o mesmo e o composto MSe 13. A selenoglicolicamida MSe

13 também apresentou resultados significativos que caracterizam células apoptóticas em estado tardio [anexina V (+)/ PI (+)] em todas as concentrações testadas nas porcentagens de 18.63 ± 0.44 ; 22.30 ± 1.00 ; 30.40 ± 0.36 e $34.83 \pm 0.83\%$ para 0.5; 1 2 e 4x CE₅₀ respectivamente. O composto MSe induziu grau de necrose [anexina V (-)/ PI (+)] em amastigotas axênicas na concentração de 4x CE₅₀ em $14.20 \pm 1.10 \%$ ($p < 0.01$). Não houve diferença significativa entre a Anfotericina 1x CE₅₀ e Mse 13 1x; e entre Anfotericina 4x *versus* MSe 2x; e Anfotericina 4x *versus* MSe 4x, destacando assim o potencial efeito apoptótico do derivado seleno MSe 13.

Figura 34. Perfil de morte celular de formas amastigotas (sub-população 1) de *Leishmania infantum* expostas a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Formas amastigotas de *Leishmania infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na presença da selenoglicolicamida MSe 13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 0.5x, 1x, 2x e 4x a CE₅₀. As células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. (CTL-) representa controle de células sem tratamento. (ANF) representa Anfotericina B. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo .(a) $p \leq 0,05$ vs. Controle (CTL-), (b) $p \leq 0,01$ vs. Controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. Controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle.

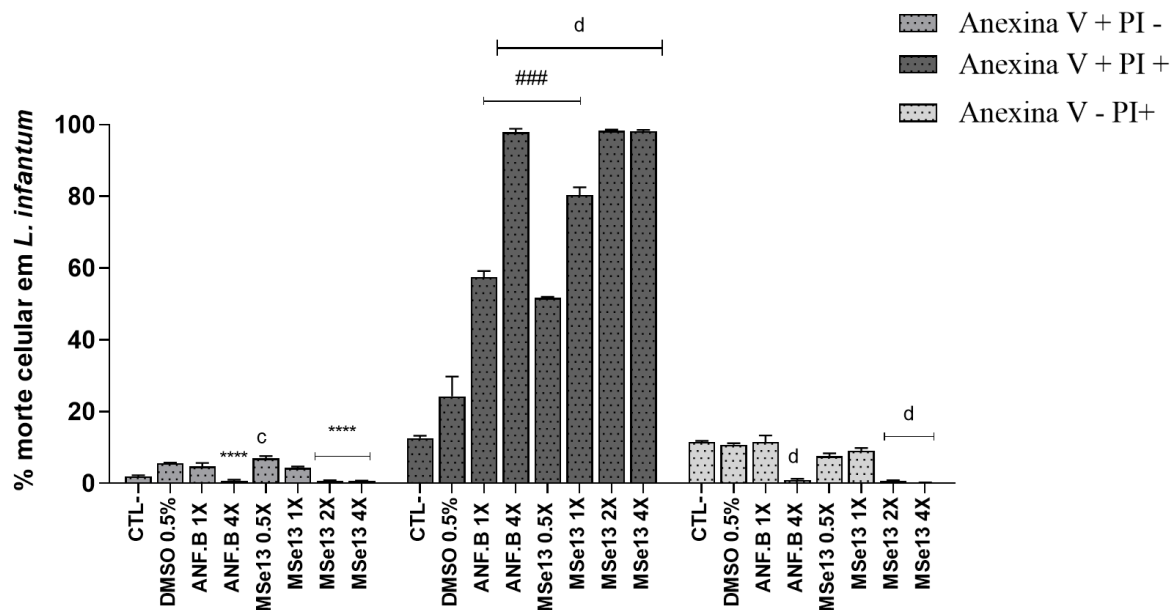
Tabela 13. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de *Leishmania infantum* tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h para subpopulação 1.

% Células (sub-população amastigota 1)			
	Anexina +/- PI -	Anexina +/-PI+	Anexina-/PI+
Célula	12.45 ± 2.70	7.06 ± 0.81	5.24 ± 0.39
DMSO 0.5%	15.90 ± 2.10	6.08 ± 1.06	3.99 ± 0.48
MSe 13 0.5x CE₅₀	20.20 ± 1.56	18.63 ± 0.44 ^c	9.92 ± 2.25
MSe 13 1x CE₅₀	22.73 ± 1.88 ^b	22.30 ± 1.00 ^d	9.03 ± 0.83
MSe 13 2x CE₅₀	22.67 ± 1.43 ^b	30.40 ± 0.36 ^d	12.17 ± 1.29
MSe 13 4x CE₅₀	23.27 ± 1.59 ^b	34.83 ± 0.83 ^d	14.20 ± 1.10 ^b
Anfotericina B 1x CE₅₀	24.25 ± 0.95 ^b	15.85 ± 1.25 ^a	9.32 ± 1.76
Anfotericina B 4x CE₅₀	7.21 ± 1.07	38.75 ± 1.85 ^d	35.53 ± 1.10 ^d

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em amastigotas-subpopulação 2 ± S.E.M em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

Partindo da estratégia de análise descritas na Figura 23, como resultados, descritos na tabela 14, pode-se observar morte celular induzida por apoptose bastante expressiva em todas as concentrações testadas do composto MSe 13, caracterizado por dupla marcação [Anexina (+)/ PI (+)], também podendo ser visualizado na Figura 35. Para o parâmetro de apoptose tardia, em 0.5x; 1x; 2x e 4x o valor de CE₅₀ temos um percentual de 51.70 ± 0.35 ; 80.40 ± 2.16 ; 98.30 ± 0.28 e 98.23 ± 0.33 % ($p < 0.0001$), respectivamente. Além disto, a selenoglicolicamida MSe 13 apresentou um índice morte celular maior que o fármaco de referência (Anfotericina B), o controle positivo, no seus valores de CE₅₀ (1x), com $p < 0.001$ de significancia. Em 1x, a Anfotericina B induziu morte por apoptose em 57.50 ± 1.72 % e em 1x seu CE₅₀ a MSe apresentou morte celular por apoptose tardia de 80.40 ± 2.16 %,destacando assim o potencial bioinovador desse composto apresentado neste trabalho.

Figura 35. Perfil de morte celular de formas amastigotas (sub-população 2) de *Leishmania infantum* expostas a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Formas amastigotas de *Leishmania infantum* foram incubadas a 37 °C por 24 h na presença da selenoglicolicamida MSe 13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 0.5x, 1x, 2x e 4x a CE₅₀. As células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. . (CTL-) representa controle de células sem tratamento. (ANF) representa Anfotericina B Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo (a) $p \leq 0,05$ vs. Controle (CTL-), (b) $p \leq 0,01$ vs. Controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. Controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, em comparação com o controle negativo (células sem tratamento); ### $p < 0,001$ (MSe 1x em comparação a anfotericina 1x CE₅₀); *** $p < 0.0001$ vs. DMSO 0.5%. ANF (anfotericina B).

Tabela 14. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose nas formas amastigota axênica de *Leishmania infantum* tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B por 24h para subpopulação 2.

% Células (sub-população amastigota 2)			
	Anexina +/ PI -	Anexina +/PI+	Anexina-/PI+
Célula	1.99 ± 0.29	12.63 ± 0.68	11.57 ± 0.33
DMSO 0.5%	5.86 ± 0.59	24.25 ± 5.55 ^d	10.75 ± 0.43
MSe 13 0.5x CE₅₀	6.96 ± 0.62	51.70 ± 0.35 ^d	7.61 ± 0.72
MSe 13 1x CE₅₀	4.27 ± 0.44	80.40 ± 2.16 ^{d, #}	9.09 ± 0.79
MSe 13 2x CE₅₀	0.72 ± 0.14	98.30 ± 0.28 ^d	0.70 ± 0.18 ^d
MSe 13 4x CE₅₀	0.68 ± 0.12	98.23 ± 0.33 ^d	0.18 ± 0.07 ^d
Anfotericina B 1x CE₅₀	4.73 ± 0.97	57.50 ± 1.72 ^d	11.52 ± 1.89

Anfotericina B 4x CE₅₀	0.60 ± 0.42	97.87 ± 1.01 ^d	0.96 ± 0.33 ^d
--	-------------	---------------------------	--------------------------

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em amastigotas-subpopulação 2 ± S.E.M em triplicata. (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. controle, por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento). # $p < 0,001$ (MSe 1x em comparação a anfotericina 1x CE₅₀);

5.2.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos seleoglicolicamidas em células de mamíferos e índice de seletividade

5.2.5.1 Citotoxicidade em eritrócitos humanos

A citotoxicidade frente a eritrócitos humanos dos compostos selenoglicolicamidas (MSe 11, MSe 13 e MSe 19) mais promissores para atividade anti-*Leishmania* foi avaliada *in vitro* e os resultados estão descritos na Tabela 15. Os compostos avaliados não alteraram de forma significativa a viabilidade dessas células em nenhuma das concentrações testadas, tendo uma CH₅₀ > 400 µg/mL, com o controle sendo considerado com 100% de viabilidade celular. O fármaco de referência avaliado, anfotericina B, apresentou atividade hemolítica com uma CH₅₀ de 6.52 ± 2.09 µg/mL ocorrendo assim uma diminuição na viabilidade dos eritrócitos pelo índice de toxicidade desses compostos (Tabela 15).

Diante desses resultados, podemos calcular o índice de seletividade desses compostos, que indicará o quanto essas moléculas são mais tóxicas para as formas promastigota do parasito do que para eritrócitos humanos. Como nenhum dos compostos avaliados apresentou toxicidade até a maior concentração testada (400 µg/mL), portanto não foi possível calcular precisamente o índice de seletividade baseado na razão CH₅₀/CI₅₀ e CH₅₀/CE₅₀. Contudo certamente esses compostos teste possuem maior seletividade ao parasito, por exemplo, comparando com o fármaco de referência, a anfotericina B, que apresentou alta toxicidade demonstrada em sua atividade hemolítica, cujo índice de seletividade foi de 4,62. Os compostos selenoglicolicamidas apresentaram um IS de >82,21 a >298,50 para promastigotas e de >3,35 a >8,54 para amastigotas. Sendo assim mais seletivos a sua ação anti-*Leishmania* e com ausencia de toxicidade a hemácias na maior concentração testada. Dentre estes compostos, a MSe 13 apresentou melhores índices de seletividade.

Tabela 15. Citotoxicidade em células humanas e índice de seletividade dos derivados de selênio e anfotericina B

	Eritrócitos	Promastigotas		Amastigotas	
Compostos	CH ₅₀	CI ₅₀	IS _e	CE ₅₀	IS _e
MSe 11	>400	1,34 ± 1,46	>298,50	46,08 ± 1,73	>8.54
MSe 13	>400	4,83 ± 2,18	>82,81	14,59 ± 1,44	>27.22
MSe 19	>400	2,86 ± 1,71	>139,86	119,20 ± 1,51	>3,35
Anfotericina B	6.52 ± 2.09	1,41 ± 0,23	4,62	0,32 ± 1.29	20.37

Fonte: dados próprios. Valores em µg/mL. IS_e (índice de seletividade com eritrócitos). Os valores representam a média calculada em ao menos três experimentos independentes em triplicata ± erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o programa *GraphPad Prisma* 8.0.

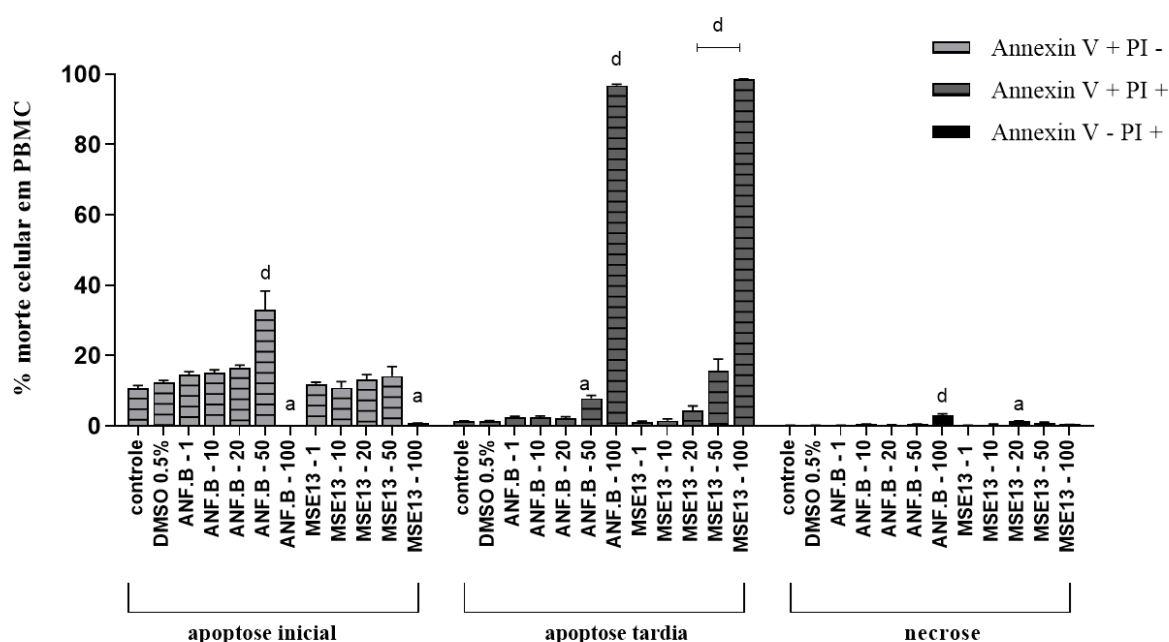
5.2.5.2 Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares do sistema periférico expostas a selenoglicolicamida MSe 13

Para análise da citotoxicidade em células mononucleares do sistema periférico (PBMC) frente ao composto mais promissor do grupo das selenoglicolicamidas, a MSe 13, foi avaliado o ensaio de morte celular por citometria de fluxo com os marcadores anexina V-FITC e iodido de próidio (PI- PerCP-Cy5). Após a extração do PBMC descrita no tópico 4.12 as células foram tratadas em meio RPMI-1640 com o composto MSe13 nas concentrações de: 1; 10; 20; 50 e 100 µg/mL. Além disso, as PBMCs foram tratadas com o fármaco de referência Anfotericina B nas mesmas concentrações (1; 10; 20; 50 e 100 µg/mL); juntamente com o controle de veículo (DMSO 0.5%) e o controle negativo, células sem tratamento.

Pode-se observar que as células sem tratamento apresentaram um índice de apoptose inicial de 10.76 ± 0.81%, apoptose tardia de 1.30 ± 0.12% e necrose de 0.16 ± 0.02%, descritos na tabela 15. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle sem tratamento e o controle de veículo (DMSO 0.5%) nos parâmetros analisados. Após o tratamento no tempo de 24h com a selenoglicolicamida MSe13 não houve um aumento significativo na porcentagem de morte celular no parâmetro de apoptose inicial (Anexina+/PI-) nas concentrações testadas.

Em 100 $\mu\text{g/mL}$ houve um percentual de $0.77 \pm 0.1\%$ ($p < 0.05$). Já após o tratamento com a anfotericina B, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ houve um percentual de morte de $33.10 \pm 5.28\%$ ($p < 0.0001$). Em 100 $\mu\text{g/mL}$ o percentual por apoptose inicial foi de $0.13 \pm 0.04\%$ ($p < 0.05$).

Figura 36. Índice de morte celular de células mononucleares do sistema periférico expostas a MSe 13 e anfotericina B



Fonte: Elaboração própria. Células mononucleares de doadores saudáveis ($n=3$) foram incubadas a 37 °C por 24 h na presença da selenoglicolicamida MSe 13 e o fármaco de referência anfotericina B, nas concentrações de 1; 10; 20; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. As células foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. O controle representa células sem tratamento. (ANF.B) representa Anfotericina B. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo (a) $p \leq 0,05$ vs. Controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. Controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. Controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. Controle.

No parâmetro de apoptose tardia, a selenoglicolicamida MSe 13 não induziu morte celular significativa nas concentrações de 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ testadas num tempo de 24h. Porém a Mse 13 obteve um grau de toxicidade em PMBCs significativo nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ testadas, nos valores de 15.65 ± 3.35 e $98.43 \pm 0.22\%$ ($p < 0.0001$). Já a anfotericina B induziu morte celular por apoptose tardia de $7.90 \pm 0.84\%$ ($p < 0.05$) e $96.80 \pm 0.32\%$ ($p < 0.0001$), nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ testadas. Não houve diferença estatística entre a MSe 13 e a Anfotericina B em 1, 10, 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 16. Porcentagem de morte celular por apoptose/ necrose PBMC tratados com a selenoglicolicamida MSe 13 e anfotericina B.

% Células (PBMC)			
	Anexina +/ PI -	Anexina +/PI+	Anexina-/PI+
Células	10.76 ± 0.81	1.30 ± 0.12	0.16 ± 0.02
DMSO 0.5%	12.13±0.64	1.41 ± 0.12	0.21 ± 0.04
MSe13 1µg/mL	11.77 ± 0.67	1.19 ± 0.17	0.17 ± 0.01
MSe13 10 µg/mL	10.87 ± 1.73	1.56 ± 0.51	0.41 ± 0.11
MSe13 20 µg/mL	13.27 ± 1.39	4.49 ± 1.82	1.28 ± 0.17 ^c
MSe13 50 µg/mL	14.23 ± 2.65	15.65 ± 3.35 ^{d,#}	0.97 ± 0.15 ^a
MSe13 100µg/mL	0.77 ± 0.14 ^a	98.43 ± 0.22 ^d	0.43 ± 0.02
Anfotericina B 1 µg/mL	14.53 ± 0.94	2.46 ± 0.36	0.16 ± 0.02
Anfotericina B 10 µg/mL	15.13 ± 0.83	2.41 ± 0.43	0.44 ± 0.07
Anfotericina B 20 µg/mL	16.60 ± 0.66	2.15 ± 0.44	0.30 ± 0.08
Anfotericina B 50 µg/mL	33.10 ± 5.28 ^d	7.90 ± 0.84 ^a	0.44 ± 0.12
AnfotericinaB 100 µg/mL	0.13± 0.04 ^a	96.80 ± 0.32 ^d	3.04 ± 0.37 ^d

Legenda: Porcentagem de morte celular por apoptose / necrose em PBMC ± S.E.M. (n=3). (a) $p \leq 0,05$ vs. controle, (b) $p \leq 0,01$ vs. controle; (c) $p \leq 0,001$ vs. controle; (d) $p \leq 0,0001$ vs. Controle; (#) $p \leq 0,01$ MSe13 vs. Anfotericina B em 50 µg/mL.; por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey em comparação com o controle negativo (células sem tratamento).

5.3 RESULTADOS: DERIVADOS ACRIDÍNICOS

O estudo da atividade dos compostos *spiro*-acridínicos foram iniciados por Almeida, F.S (2018) no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, onde buscou-se investigar a atividade anti-*Leishmania* de derivados *spiro*-acridínicos sob formas promastigotas e amastigota de *L.(L) infantum*. Todos os derivados acridínicos apresentaram potencial atividade de inibição de crescimento em promastigotas, apresentando diferentes valores de CI_{50} , que variaram entre 1,10 e 6,06 µg/ml, com exceção da AMTAC 09 (R1= -OCH₃; R4= Br) que não obteve atividade inibitória até a maior concentração testada (Tabela 17).

Tabela 17. Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀) dos derivados *spiro-acridínicos* frente as formas promastigotas de *L.infantum*.

Compostos	CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µM
AMTAC 01	2,03 ± 0,06	5,4
AMTAC 06	5,68 ± 0,56	13,8
AMTAC 07	4,10 ± 0,87	10,4
AMTAC 08	3,89 ± 0,79	8,7
AMTAC 09	>400	>400
AMTAC 10	2,63 ± 0,20	5,9
AMTAC 11	1,10 ± 0,42	2,6
AMTAC 13	3,77 ± 0,38	9,0
AMTAC 14	5,33 ± 1,47	12,7
AMTAC 16	6,05 ± 1,40	13,9

Fonte:ALMEIDA, F.S. (2021). Legenda: A tabela representa à média ± erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. Utilizou-se regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

Os compostos que apresentaram maior potencial de inibição de crescimento foram as AMTAC 01 e AMTAC 11 . O primeiro, tido como estrutura base para o desenvolvimento dos variados *spiro-acridínicos*, com diferentes substituintes em diferentes posições no anel benzilideno, apresentou uma ótima inibição do crescimento em promastigota (2,03 ± 0,06 µg/mL), já a AMTAC 11 apresenta como grupo substituinte R3, o 4-dimetilamida, com CI₅₀ de 1,10 ± 0,42µg/mL.

A substituição de um elemento cloro em posição *para* (AMTAC 06) pelo também halogênio Flúor (AMTAC 07), promoveu uma diminuição do CI₅₀ de 5,681 ± 0,56 para 4,109 ± 0,87 µg / mL, respectivamente. O AMTAC 06 (R₁= Cl) apresentou CI₅₀ de 5,68 ± 0,56 µg/ml, porém quando temos a adição de um segundo átomo de cloro, em posição *orto* (R₁= Cl; R₃= Cl) levando ao composto di-substituído, o AMTAC 08, o seu CI₅₀ (3,89 µg/ml ± 0,79) foi reduzindo, sendo considerado, portanto mais ativo. Já para o composto AMTAC 10 (R₁= Cl; R₅= Cl), observa-se uma potencialização da atividade anti-*Leishmania*, sendo um dos compostos mais ativos (CI₅₀= 2,63 ± 0,20 µg/mL). Os compostos com grupo nitro como substituinte, AMTAC 13 (R₁= Cl) e AMTAC14 (R₃= Cl) também apresentaram toxicidade as formas promastigotas de *L.infantum* com valores de CI₅₀ de 3,77 ± 0,38µg/mL e 5,33 ±

1,47µg/mL respectivamente.

Após isso, foi realizado o ensaio de citotoxicidade em hemácias com esses compostos espiro-acridínicos. A avaliação da citotoxicidade na atividade hemolítica dos compostos em estudo mostrou que nenhum dos derivados da espiro-acridina apresentou citotoxicidade para eritrócitos humanos até a maior concentração estudada ($CH_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$), o que permite afirmar que esses compostos têm uma toxicidade de glóbulos vermelhos *in vitro* muito baixa. A anfotericina B, como medicamento de referência, apresentou CH_{50} de $10,72 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$.

Na Tabela 18, podem ser observados os valores calculados da concentração efetiva dos compostos estudados, obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, juntamente com o medicamento de referência, Anfotericina B ($1,59 \pm 0,26 \mu\text{g/mL}$). AMTAC 11 apresentou EC_{50} significativamente menor de $0,97 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ em relação ao medicamento de referência.

Posteriormente, os compostos com maiores índices de inibição de crescimento em promastigotas, o AMTAC 01 e AMTAC 11 seguiram os estudos com a avaliação em amastigotas axênicas de *L. infantum* que mostrou que os efeitos estéricos e eletrônicos do grupo dimetilamina contribuem mais para a atividade anti-*Leishmania*. (Tabela 18) AMTAC 11 apresentou EC_{50} significativamente menor de $0,97 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$.

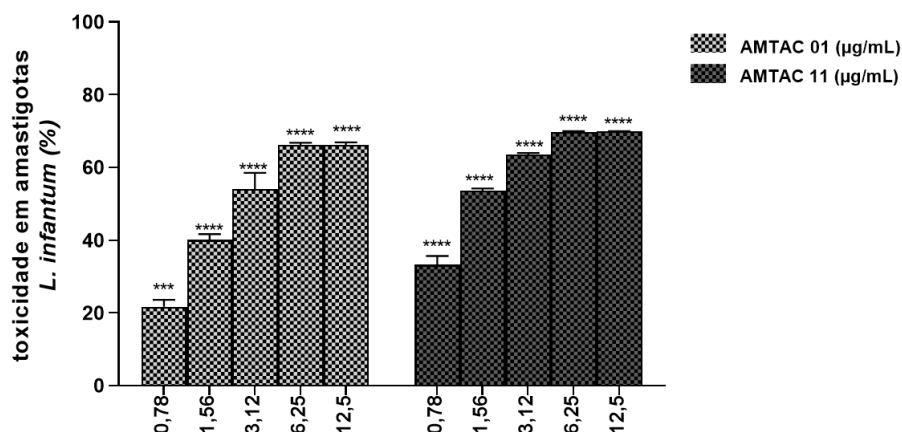
Tabela 18. Atividade anti-*Leishmania*, efeitos citotóxicos contra células PBMC e o índice de seletividade para AMTAC 01, AMTAC 11 e anfotericina B

Compostos	CE_{50} (µg/mL)	CC_{50} (µg/mL)	IS
AMTAC 01	4.96 ± 0.6	44.16	8.90
AMTAC 11	0.97 ± 0.2	>100	>102.67
Anfotericina B	1.59 ± 0.26	7.63 ± 1.88	4.78

Fonte: ALMEIDA et al., 2021. IS_c (índice de seletividade em PBMC) = CC_{50}/EC_{50} .

O composto AMTAC 01 apresentou citotoxicidade sob formas amastigotas de *L. infantum*, cujas concentrações de 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 µg/mL, apresentaram uma taxa de inibição de viabilidade celular de $21,7 \pm 1,9$; $40,0 \pm 1,6$; $54,02 \pm 4,5$; $66,11 \pm 0,72$ e $66,17 \pm 0,68$ %, respectivamente, quando comparados ao controle. Enquanto que o AMTAC 11 apresentou uma taxa de inibição de $33,2 \pm 2,4$; $53,6 \pm 0,64$; $63,56 \pm 0,37$; $69,72 \pm 0,27$ e $69,85 \pm 0,2$ %. Também quando comparado ao controle.

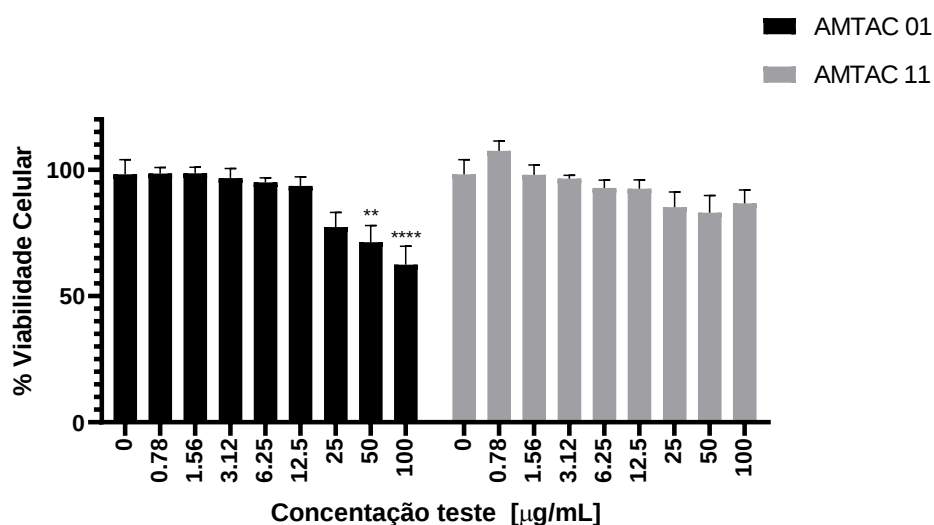
Figura 37. Inibição da viabilidade celular de formas amastigotas axênicas de *L. infantum* por AMTAC 01 e AMTAC 11.



Fonte: (ALMEIDA et al., 2021). O gráfico representa à média $\pm$ erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. **** $P \leq 0,0001$ Significância em relação ao controle.

Após a realização destes ensaios antileishmania (ALMEIDA, 2018), foi investigado a citotoxicidade em PBMC's com os compostos mais promissores, o AMTAC 01 e AMTAC 11, pois apresentaram melhores atividades contra *L. infantum* em suas formas promastigota e amastigota no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas. Esses compostos foram testados em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78 µg/mL). O AMTAC 01 apresentou toxicidade de 44,16 µg/mL com IS de 8,9, contudo a espiro-acridina AMTAC 11 não apresentou toxicidade na maior concentração testada (100µg/mL) (Tabela 18; Figura 38) consequentemente apresentando um alto índice de seletividade para as células do parasita. Além disso, a Anfotericina B apresentou alta toxicidade, com CC50 em $7,634 \pm 1,88$ µg/mL, e 4,78 para o índice de seletividade.

Figura 38. Viabilidade das células mononucleares do sistema periférico de doadores saudáveis (PBMC) tratadas com os compostos AMTAC 01 e AMTAC 11.



Fonte: ALMEIDA et al., 2021. O gráfico representa à média $\pm$ erro padrão da média de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $P \leq 0,01$ **** $P \leq 0,0001$ de Significância em relação ao controle.

A alta seletividade apresentada pelo AMTAC 11 também indica mecanismos seletivos ao parasita. Os parâmetros de toxicidade avaliados por PBMC e eritrócitos também indicaram maior segurança farmacológica quando comparados ao fármaco padrão. Por fim, esse trabalho gerou um depósito de patente (Apêndice D) e publicação científica na revista na revista Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (Fator de impacto: 2.823; Qualis – A2; Apêndice B) (ALMEIDA et al., 2021).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é um problema de saúde pública, também uma das doenças tropicais negligenciadas mais importantes, onde mesmo com o passar dos anos, a terapêutica segue restrita a poucos medicamentos que possuem graves efeitos colaterais, além do surgimento de cepas resistentes e a coinfeção com HIV (ROATT et al., 2020). A falta de uma vacina juntamente com a falta de medicamentos acessíveis, seguros e eficazes para a leishmaniose, faz-se necessário a busca por novos agentes anti-*Leishmania* (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014). Nesse contexto, os compostos estudados nesse trabalho, tornam-se candidatos promissores a novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

Quanto aos estudos sobre a atividade anti-*Leishmania* de derivados de guanidina têm-se obtido resultados positivos (BERLINCK et al., 2017; KIM; SEMENYA; CASTAGNOLO, 2021). Os derivados de guanidina possuem a mesma estrutura molecular, porém com grupos substituintes diferentes na posição *para*, sendo o bromo, *t*-butil e iodo para LQOFG-2, LQOFG-6 e LQOFG-7, respectivamente. Na atividade antipromastigota, o composto contendo a fração bromo como grupo de substituição exibiu a maior capacidade citotóxica, reduzindo a viabilidade celular de promastigotas de *L. infantum* avaliado pelo ensaio de MTT, corroborando com um estudo anterior dos mesmos compostos e sua atividade citotóxica para *Leishmania amazonensis* (DO ESPÍRITO SANTO et al., 2019)

Os derivados de guanidina com o grupo halogênio, LQOFG-2 (-Br) e LQOFG-7 (-I) obtiveram melhor perfil de atividade anti-promastigota (dados CI_{50} -tabela 4). O resultado sugere que o substituinte (-Br) pode contribuir para a atividade.

O diagrama de Craig analisa a correlação dos efeitos eletrônicos (σ) e a lipofilicidade (π) dos grupos substituintes em anéis aromáticos (GIRAUD et al., 2009). Os halogênios apresentam efeitos eletrônicos e lipofílicos positivos, e o grupo *t*-butil efeitos lipofílicos positivos. Nesse caso, para os compostos guanidínicos a lipofilicidade parece contribuir na atividade.

Quanto a atividade anti-promastigota das selenoglicolicamidas, os compostos mais ativos MSe 11, MSe 13 e MSe 19 apresentaram como grupos substituintes o butil (-C₄H₉), isopropil (-C₃H₇) e metoxila (-OCH₃) em R₂, respectivamente (tabela 10). A adição desses grupos potencializou a atividade e nota-se que a substituição em *para* favoreceu a atividade anti-*Leishmania*, quando observamos os valores de CI_{50} em comparação aos demais compostos selenoglicolicamidas. Ademais, quando comparamos os compostos MSe 19 (C₁₈H₁₈ClNO₃Se) e

MSe 20 ($C_{18}H_{19}NO_3Se$), observamos que adição do grupo cloro (-Cl) em R5, potencializou a atividade partindo dos valores de CI_{50} de 2.89 $\mu g/mL$ para MSe 19, e 34.75 $\mu g/mL$ para a MSe 20. Portanto, os efeitos eletrônicos e lipofílicos positivos desses substituintes contribuíram para um perfil potencial na resposta da atividade anti-promastigota em *L. infantum*.

Já na atividade anti-amastigota, os compostos selenoglicolicamidas obtiveram uma resposta diferente em relação a sua atividade para as formas promastigotas. Os compostos mais ativos, MSe 11, MSe 13 e MSe 19, foram selecionados para analisar a atividade anti-*Leishmania* descritos na Tabela 11, contudo sendo menos ativos em relação aos valores de CI_{50} . Todavia destaca-se o composto MSe 13 ($CE_{50} = 14,59 \pm 1,44 \mu g/mL$) que obteve o melhor perfil como composto bioativo anti-*Leishmania*. Neste caso, o grupo substituinte isopropil ($-C_3H_7$) contribuiu para o aumento da atividade citotóxica em amastigotas de *Leishmania infantum*.

A atividade anti-promastigota das selenoglicolicamidas já foi relatada na literatura por De Sousa Luis e colaboradores (2019). Com estruturas moleculares bem semelhantes, possuindo o anel base das selenoglicolicamidas. Os compostos apresentaram resultados promissores para as espécies *L. amazonensis* e *L. donovani*, que causam a LC e LV, respectivamente. Nesse estudo, os compostos mais ativos têm como grupo substituintes os halogênios (cloro e bromo), metoxila e isopropílico em suas estruturas corroborando com os resultados apresentados nesse estudo.

Os compostos de guanidina e selenoglicolicamidas estudados não apresentam toxicidade às hemácias, sendo um sinal positivo para a continuação de novos estudos, como potenciais candidatos a fármacos. A anfotericina B mostrou citotoxicidade em glóbulos vermelhos de doadores humanos saudáveis a $6,52 \pm 2,09 \mu g/mL$. Este fármaco é utilizado no tratamento da leishmaniose e apresenta limitações como nefrotoxicidade além de outros efeitos adversos, sendo necessário o estudo de novas drogas contra a leishmaniose (BRAJTBURG et al., 1985; JAIN; JAIN, 2018).

Os derivados de guanidina são citotóxicos para a forma amastigota de *L. infantum*, porém em menor proporção em relação à forma promastigota. O derivado LQOFG-7 apresentou melhor perfil em termos de atividade citotóxica em valores micromolares (18,6 μM). Mesmo assim, os valores de atividade dos três compostos foram semelhantes. Seus grupos substituintes, substituintes halogênios e o grupo t-butil, parecem favorecer a atividade citotóxica com efeitos lipofílicos positivos.

Diferentes resultados de toxicidade são possíveis nas diferentes formas de vida do protozoário, onde pode haver aumento, diminuição ou até perda da atividade tóxica. Martins e colaboradores (2016) por exemplo, realizaram um estudo sobre a atividade antiparasitária in

vitro contra *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi* de análogos sintéticos de alcalóides guanidina de uma esponja marinha e relataram que alguns compostos obtiveram maior índice de seletividade para o amastigota formas de *L. infantum*.

Fernández e colaboradores (2021) em um estudo sobre a atividade anti-*Leishmania* de compostos glicolipídicos, observou-se que os selenoglicolipídeos (ou seja, os que apresentaram o Se em sua estrutura), demonstraram um efeito antiproliferativo para amastigotas intracelulares. A incorporação do Se (ou seja, metilselênio, selenocianato e disseleneto) em estruturas de compostos orgânicos pode ser considerado um planejamento para se obter compostos citotóxicos potentes e seletivos (BAQUEDANO et al., 2016).

Há evidências de que o selênio pode melhorar a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. A defesa imunológica do hospedeiro protege o corpo da invasão de vários patógenos. O selênio tem muito potencial para influenciar o sistema imunológico, a exemplo da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPx), que provavelmente protege os neutrófilos dos ROS produzidos para eliminar organismos estranhos ingeridos. A GPx é uma enzima dependente de selênio, que protege as membranas celulares e organelas com características lipídicas de danos peroxidativos, e trabalha em conjunto com a vitamina E para manter a integridade das membranas celulares (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001).

Os derivados de guanidina investigados no presente estudo apresentaram baixa toxicidade para PBMC, com altos índices de seletividade para os compostos LQOFG-6 e LQOFG-7. A anfotericina B apresentou maior citotoxicidade para PBMC, mas apresentou maior índice de seletividade devido ao seu baixo valor de CE₅₀. No entanto, de acordo com André e colaboradores (2020), em seu estudo sobre o impacto de fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose nas células humanas primárias em relação à função imune, observou-se que na concentração de 20 µM de Anfotericina B, houve indução de morte celular por exposição fosfatidilserina e despolarização da membrana mitocondrial.

É importante compreendermos que grandes mudanças na membrana plasmática ocorrem durante os processos de morte celular. A externalização da fosfatidilserina, (PS) é uma das principais alterações na membrana plasmática durante a morte celular por apoptose. A externalização de PS é verificada no ensaio de anexina V/iodeto de propídio (PI) (DA CÂMARA ROCHA et al., 2019; DEBRABANT et al., 2004; KARAMPETSOU et al., 2021). A PS localiza-se predominantemente na camada interna da membrana plasmática e, durante o início da apoptose, é translocada para a camada extracelular, a partir da qual as células identificam a PS como alvo da fagocitose. Na apoptose inicial, a membrana plasmática não pode ser marcada com PI, de modo que a coloração com anexina V serve como um marcador

precoce de apoptose. No estágio tardio da apoptose, a membrana perde sua integridade e as células apoptóticas tardias ou apoptóticas secundárias tornam-se positivas tanto para anexina V quanto para PI. Consequentemente, a ausência de coloração com PI sinaliza a integridade da membrana enquanto as células necróticas são permeáveis ao PI, embora permaneçam negativas para a anexina V (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; MENNA-BARRETO, 2019).

Quanto a investigação do mecanismo de morte celular induzida pelos compostos derivados de guanidina e seleoglicolicamida, os resultados mostraram que não houve diferença significativa para os derivados de guanidina no ensaio de morte celular em promastigotas. O composto MSe 13 apresentou ainda um discreto aumento na porcentagem de morte celular por necrose em $3.71 \pm 0.32\%$ que foi significativo em relação ao controle ($p < 0.05$). A anfotericina B, como esperado devido o seu mecanismo de ação, apresentou perfil de apoptose (EL-HANI et al., 2012; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). No entanto, vale ressaltar que o tratamento com compostos de guanidina, em particular LQOFG-2 e LQOFG-7, de amastigotas axênicas de *L. infantum* mostrou um aumento gradual nas células apoptóticas tardias, indicando que ao aumentar a concentração do fármaco, os parasitas sofrem apoptose em maior proporção (Tabela 9).

A anfotericina B apresenta grau de necrose significativa em todos os ensaios, vale ressaltar que o principal sítio de ação da anfotericina B são os esteróis de membrana, que resultam na perda da barreira de permeabilidade das células (MENDONÇA et al., 2019; SHADAB et al., 2017). O tratamento com DMSO a 0,5% não foi significativo em relação ao controle, portanto a morte de amastigotas de *L. infantum* induzida pelos compostos de guanidina e selenoglicolicamida caracteriza apoptose. Não há estudos sobre o mecanismo de morte celular por apoptose em derivados de guanidina. No entanto, Martins e colaboradores (2016) em seu estudo da atividade anti-*Leishmania* de análogos de guanidina, relataram a indução de despolarização do potencial de membrana mitocondrial, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e aumento da permeabilidade da membrana plasmática em parasitas de *Leishmania*.

A exposição de PS caracteriza melhor o processo de morte celular apoptótica. No entanto, há mimetismo apoptótico em *Leishmania* spp. de especial interesse para o estudo dos mecanismos de morte celular em organismos patogênicos. A PS exposto desempenha um papel nas fases de reconhecimento celular e do processo de fagocitose. Em amastigotas, o mimetismo apoptótico tem sido descrito como a capacidade de expor PS sem haver morte celular. *In vivo*, as formas amastigotas expressam PS como um sinal para o processo de fagocitose e, portanto, são reconhecidos e fagocitados. Assim, acredita-se que a inibição da resposta pró-inflamatória do macrófago hospedeiro e a indução de citocinas anti-inflamatórias permitem a proliferação

do parasita e a progressão da doença (ANDRÉ et al., 2020; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019; BRAJTBURG; BOLARD, 1996). Porém, em nosso modelo *in vitro*, os ensaios foram realizados em culturas puras mantidas sob composição do meio e temperatura controlados, portanto o resultado apresentado é favorável ao mecanismo de indução de morte celular por apoptose no tratamento tipo amastigota com compostos de guanidina.

No ensaio de morte celular em amastigotas tratadas com a selenoglicolicamida MSe 13, observa-se um potencial efeito de apoptose em todas as concentrações testadas, onde destaca-se que não houve diferença significativa entre a porcentagem desse composto e o fármaco de referência, no valor de seus respectivos valores de CE_{50} para o grupo da subpopulação 1 de amastigotas de *L. infantum*. Ademais, a MSe 13 obteve um percentual de morte celular mais significativo que a Anfotericina B na concentração $1 \times CE_{50}$. Esse trabalho é inédito na descoberta do mecanismo de ação desses candidatos a fármacos para o tratamento das leishmanioses e não há estudos relatados acerca do mecanismo de morte celular em protozoários do gênero *Leishmania*. Porém há na literatura relação entre a indução de morte celular, que podem estar relacionados ao processo de apoptose em compostos organo-seleno em células tumorais (SANTOFIMIA-CASTAÑO et al., 2014).

Por exemplo Santofimia-Castaño e colaboradores observaram alterações no potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) em células AR42J (linhagem de tumor pancreático), tratadas com um composto organ-seleno, onde a indução de despolarização mitocondrial envolvem a regulação de componentes cruciais implicados nos processos celulares de proliferação e apoptose (SANTOFIMIA-CASTAÑO et al., 2014).. Há relato na literatura também de indução de apoptose em células SPC-A-1 (linhagem câncer de pulmão humano), que foram cultivadas com um composto Seleno-Quitosana (WU et al., 2020).

Queiroz e colaboradores (2020) realizaram um estudo com moléculas do grupo selenoglicolicamidas, de série sintética semelhante ao desse trabalho, em células HL-60 (linhagem de leucemia humana). A despolarização da membrana mitocondrial, causada pelo composto, sugere uma ruptura da permeabilidade externa mitocondrial, permitindo que proteínas normalmente confinadas no espaço intramembranar vazem para o citosol. Essas proteínas incluem fatores apoptogênicos, como o citocromo C, que desempenha um papel crucial na ativação do processo de morte celular (DE QUEIROZ et al., 2020)

Em tripanossomatídeos, a morte celular do tipo apoptose é caracterizada principalmente pelo seu efeito sobre a mitocôndria, com perda de seu potencial de membrana e liberação de citocromo C, proteína associada à membrana interna da mitocôndria, para o citosol. Além da exposição a PS, a fragmentação do DNA é também característica para esses protozoários. Já a

via necrótica é caracterizada por intensa vacuolização citosólica, forte efeito sobre a mitocôndria, fragmentação DNA e ruptura da membrana plasmática, ocasionado por estresses externos, como distúrbios mecânicos, fármacos e outros fatores. Esses estímulos induzem a degradação celular descontínua, culminando na ruptura da membrana plasmática, o que leva a uma intensa resposta inflamatória. A perda da integridade celular promove a liberação de organelas danificadas e/ou moléculas intracelulares e induz a inflamação, que é uma das diferenças mais marcantes entre necrose e apoptose (MENNA-BARRETO, 2019).

O composto de selênio MSe 13 induziu grau de necrose em 14.20 ± 1.10 % e a anfotericina 35.53 ± 1.10 %, na concentração $4 \times CE_{50}$. Testes pré-clínicos mostraram a lise parasitária como o ponto final no modo de ação de uma grande variedade de fármacos antitripanossomatídeos (MENNA-BARRETO, 2019). Em contraste, eventos de morte celular desregulada ocorrem sem a ação coordenada de um aparato celular específico e são comumente associados à senescência e morte causada por condições anormais que são desfavoráveis à vida (PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2012).

O selênio é um oligoelemento encontrado em pequenas quantidades no organismo. Foi isolado pela primeira vez em 1817, e é reconhecido também por sua toxicidade. A importância do selênio foi relatada a partir da década de 1950. Ele é um importante componente estrutural de muitas enzimas, como glutathione peroxidase, tioredoxina redutase e deiodinases. Enzimas estas que desempenham papéis importantes pela sua ação antioxidante, na reprodução e função muscular (MEHDI et al., 2013).

É relatado que o selênio em si estimula a formação de anticorpos e a atividade das células T auxiliares juntamente com as células T e NK citotóxicas, e também está envolvido na migração de células fagocitárias e consequentemente na fagocitose e é importante para a função de células efectoras citotóxicas, como células T $CD8^+$ e células natural killer (NK). Alguns metabólitos de selênio e selenoproteínas mostraram estar envolvidos nas respostas imune e inflamatória, os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos ainda não são totalmente compreendidos (BAE; KIM, 2020). Contudo devido a sua reconhecida toxicidade, a ingestão diária recomendada de selênio como suplemento nutricional é de $60 \mu\text{g}$ a $70 \mu\text{g}/\text{dia}$ em adultos (MEHDI et al., 2013).

No ensaio de toxicidade em células monocleares de doadores saudáveis através do perfil de morte celular analisados por citometria de fluxo, o composto MSe 13 induziu apoptose nas concentrações de 50 e $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, testadas após 24h. Na literatura é descrito que diferentes compostos de selênio estão envolvidos na morte celular induzida em células tumorais. Em geral, os mecanismos de morte celular em células tumorais são dependentes da espécie de selênio, da

dose, do tempo de exposição e do tecido de origem dessas células. Normalmente, as formas orgânicas de selênio são consideradas menos tóxicas que os compostos inorgânicos de selênio, devido à necessidade de os compostos orgânicos serem metabolizados para exercer seu potencial citotóxico. Estruturas de aminoácidos compostos de selênio em diferentes concentrações (10-1000 μM) induziram apoptose mediada por caspase, e fragmentação do DNA em linhagem de adenocarcinoma de pulmão, A549, por exemplo (FLEMING; GHOSE; HARRISON, 2001; SUZUKI et al., 2011; WALLENBERG; MISRA; BJÖRNSTEDT, 2014). Al-Tamimi e colaboradores (2019) relataram novos compostos organoselênio com atividade anti-*Leishmania* em *L. donovani*. E em seus ensaios, esses compostos apresentaram citotoxicidade com valores de CC_{50} de até 25 μM em células THP-1, apesar da potencial atividade anti-*Leishmania*, contudo ainda apresentando bons índices de seletividade (AL-TAMIMI et al., 2019).

É notório relatar que o fármaco controle, a Anfotericina B, também induziu morte celular por apoptose em células mononucleares de doadores saudáveis nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Como já citado anteriormente, este fármaco é tóxico para PBMC's e que acima de dosagens em 20 μM sucita a apoptose. Semelhante modo, outros fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose, a Miltefosina e a Pendamidina, induziram morte celular em PBMC's de doadores saudáveis em dosagens >20 μM , principalmente em linfócitos B (CD20+) de forma dose-dependente (ANDRÉ et al., 2020).

Com o objetivo de investigar possíveis mecanismos imunomoduladores por LQOFG-7, foi feita a avaliação da indução na produção de nitrito do sobrenadante das cultura *in vitro* de PBMCs humanos após infecção por *L. infantum*. Considerando a terapêutica limitada no tratamento das leishmanioses, em busca de compostos bioativos, vários estudos têm sido realizados, baseados na estratégia imunológica, para prevenir e tratar a leishmaniose, recentemente. Em uma tentativa, a imunoterapia isolada ou em combinação com a quimioterapia foi desenvolvida para tratar a infecção por leishmaniose e evitar os efeitos colaterais associados aos regimes de tratamento convencionais. Que visa acelerar a resposta direcionada e específica ao parasita em pacientes e resulta em reações efetivas em pacientes sem o uso de dos fármacos convencionais (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

A avaliação da indução de NO é um importante parâmetro a ser analisado, pois esta molécula está envolvida no controle da infecção de patógenos, em especial de amastigotas intracelulares na leishmaniose. A expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintetase) e a produção de NO são características de células envolvidas em respostas imunes, em especial são fontes importantes de NO as células da imunidade inata, principalmente em células dendríticas

(DCs), monócitos/macrófagos, contudo também em NK, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (IBIZA; SERRADOR, 2008; THWE; AMIEL, 2018).

Os macrófagos após o processo de fagocitose, são ativados para produzirem mediadores tóxicos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO simultaneamente. O NO produzido por macrófagos pode ser uma importante arma para o controle da leishmaniose. Dependendo do estímulo e microambiente, os macrófagos/ monócitos podem se subdividir em 2 subconjuntos. incluem M1 (ativação clássica) e M2 (ativado alternativamente). O processo de polarização dos macrófagos promove diferenciação na expressão imunofenotípica de algumas moléculas de superfície e intracelulares, sendo a diferença fenotípica resultado das funções distintas entre os macrófagos M1 e M2 (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; KONG et al., 2017; VAN TEIJLINGEN BAKKER; PEARCE, 2020)

Os macrófagos classicamente ativados, ou M1, têm uma capacidade marcada de apresentação antigênica e alta produção de fatores que promovem a proliferação celular e ativação de células T, além da produção de substâncias tóxicas como espécies reativas de oxigênio e intermediários de óxido nítrico, e aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade tipo 2 (MHC II). Assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de NO, e a apresentação de antígenos tornam os macrófagos M1 bons mediadores no combate a microrganismos e células tumorais. Os macrófagos do tipo M1 guiam as respostas inflamatórias agudas e podem produzir uma variedade de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α e IFN-gama; além de diversas quimiocinas, induzindo assim a resposta efetora de linfócitos perfil Th1. Por outro lado, os macrófagos M2 secretam citocinas imunossupressoras (por exemplo, IL-10, TGF- β), suprimem Th1 e promovem respostas de células Th2 que podem estar associadas à suscetibilidade a infecções intracelulares, como *Leishmania* (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; KONG et al., 2017; VAN TEIJLINGEN BAKKER; PEARCE, 2020)

Nesse estudo, a infecção em monócitos por *L. infantum* diminuiu a produção de nitrito na ausência de tratamento, o que é consistente com relatos anteriores (WANDERLEY et al., 2006). Pesquisadores anteriores em seu estudo *in vitro* com PBMCs de pacientes com LV, relataram redução na produção de NO e maior expressão de IL-10 e TGF- β (KUPANI et al., 2020). Citocinas estas que podem suprimir a produção de NO pela indução da atividade da arginase e que estão envolvidas com o mecanismo de evasão da *Leishmania* dos macrófagos do hospedeiro.

A membrana de fagossomos atua como uma barreira adicional à entrada de fármacos que circulam na corrente sanguínea. As amastigotas que residem em fagossomos também

interferem nos mecanismos de defesa do hospedeiro, por exemplo, ao inibem a iNOS de macrófagos como parte da estratégia de sobrevivência do parasita dentro dos fagossomos, e (PANDYA et al., 2016). Gatto e colaboradores em seu estudo avaliando a expressão de receptores TLR2 e TLR4 junto a produção de citocinas e NO em PBMC's de pacientes com LV antes e após tratamento com antimoníato de meglumina e anfotericina B, demonstrou que células não estimuladas [com LPS e PGN (peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*)] obtidas de pacientes antes do tratamento produziam níveis significativamente mais baixos de NO em comparação com células obtidas após o tratamento farmacológico, (GATTO et al., 2015), indiziando assim a uma resposta efetiva de mecanismo celular de defesa ao patógeno.

Após o tratamento de monócitos infectados tratados com LQOFG-7 no valor de seu EC50, a produção de NO aumentou significativamente ($p < 0.05$). A adição de estímulo LPS com o tratamento com LQOFG-7 não teve efeito na produção de nitrito. Ademais pode-se observar um leve aumento na produção de NO em monócitos não infectados após o tratamento com LQOFG-7. Assim, LQOFG-7 aparenta modular a resposta imune em PBMCs de indivíduos saudáveis.

Gatto e colaboradores em seu estudo avaliando a expressão de receptores TLR2 e TLR4 junto a produção de citocinas e NO em PBMCs de pacientes com LV antes e após tratamento com antimoníato de meglumina e anfotericina B, demonstrou que células não estimuladas [com LPS e PGN (peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*)] obtidas de pacientes antes do tratamento produziam níveis significativamente mais baixos de NO, em comparação com células obtidas após o tratamento farmacológico (GATTO et al., 2015). O estímulo com LPS aumentou os níveis de NO em comparação com células não estimuladas em pacientes pré e pós-tratamento e indivíduos controle. Nesse estudo, descobriu-se que a produção de nitrito aumentou nas células infectadas após o tratamento com Anfotericina B, do mesmo modo com estímulo do LPS e também na condição LPS + LQOFG-7 ($P < 0,05$).

Por fim o composto LQOFG-7 aparenta ter capacidade moduladora na resposta imune com perfil de ativação celular. Não existem estudos relatando a atividade de compostos derivados de guanidina como fármacos capazes de modular a resposta celular contra patógenos nas leishmanioses. Todavia é necessário uma análise mais aprofundada que caracterizem um ambiente com resposta efetora ou imunossupressoras de respostas, através do estudo envolvendo marcadores celulares como citocinas que serão analisados posteriormente. A combinação de quimio e imunoterapia é uma estratégia e a quimioimunoterapia pode ser benéfica para infecções intracelulares como a leishmaniose (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2021).

Por fim, quanto aos resultados dos derivados de acridina, podemos concluir que a adição do grupo 4-dimetilamina favoreceu bastante sua atividade, possivelmente devido ao seu efeito doador eletrônico. Quanto à análise estrutural do AMTAC 11, pode-se sugerir um forte efeito mesomérico positivo para o anel aromático, bem como um grupo volumoso, o que poderia favorecer interações mais fortes com diferentes regiões da molécula alvo, possivelmente justificando sua maior atividade. Assim, aplicando o Diagrama de Craig, podemos observar que os efeitos eletrônicos negativos, principalmente do AMTAC11 e o efeito lipofílico positivo, cujo substituinte se encontra no quadrante inferior direito ($-\sigma$ $+\pi$), implica na melhora da atividade biológica.

Quanto aos compostos AMTAC 06, 08 e 10, podemos continuar a estabelecer a relação estrutura-atividade (SAR), onde a adição em orto ($R1 = Cl$; $R4 = Cl$) e a substituição em *orto* foram observadas para potencializar a atividade anti-*Leishmania*. As duas substituições em *orto* (AMTAC 10) com o átomo de cloro, podem ter implicações positivas, eletrônicas e lipofílicas, porém os efeitos moleculares que podem influenciar nesta resposta. Assim, levanta-se a hipótese de que esse grupo substituinte contribui positivamente para a atividade leishmanicida, também porque existem efeitos estéricos na molécula que podem influenciar como a posição de alinhamento com o receptor alvo.

Uma série de doze derivados de 2- e 3-amilaminoquinolina como agente anti-*Leishmania* foram avaliados em *Leishmania mexicana* considerando princípios da química medicinal como transformação de anel ou inclusão de grupos adequados e os autores concluíram que a substituição pela introdução de átomos de halogênio aumenta a potência desses compostos (CHANQUIA et al., 2019).

Permanecendo no mesmo entendimento, nos compostos AMTAC 13 e 14, a mudança da posição *orto* do grupo nitro para a posição *para* resultou na diminuição de sua atividade, mesmo sendo o mesmo substituinte com os mesmos efeitos eletrostáticos pelo grupo nitro retirador de elétrons. Os compostos que contêm um forte grupo nitro retirador de elétrons exibiram uma potente atividade anti-amastigota em *L. donovani* (UPADHYAY et al., 2018). A avaliação em amastigotas axênicas por AMTAC 01 e AMTAC 11 mostrou que os efeitos estéricos e eletrônicos do grupo dimetilamina contribuem mais para a atividade anti-*Leishmania*.

É interessante destacar que as substituições de doadores de elétrons contribuem mais para a atividade do que o anel de hidrogênio. Grupos volumosos e grupos doadores de elétrons na posição *para* são favoráveis à atividade anti-*Leishmania* (APUY et al., 2004; MELLO; 2018). Por exemplo, de acordo com Coimbra et al (2016) em seu estudo com derivados

quinolínicos para *L. amazonensis*, o composto amino-substituído apresentou maior seletividade a o parasita em comparação com os outros compostos quinolínicos (COIMBRA et al., 2016).

Quanto a citotoxicidade, o composto AMTAC 11 apresentou com maior segurança, não sendo tóxico até a maior concentração testada. Alguns pesquisadores mostraram baixa citotoxicidade de derivados de acridina e quinolinas avaliados em células PBMC (BARROS et al., 2012; HAMEED et al., 2019). Entretanto, no estudo de Malachowska-Ugarte et al. (2012), (MALACHOWSKA-UGARTE et al., 2012) com toxicidades de derivados de nitroacridina/acridona em concentrações abaixo de 1 μ M foram relatadas.

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho temos que, os derivados de guanidina tiveram baixos valores de CI_{50} e CE_{50} , indicando o efeito biológico sobre as formas promastigotas, como também sobre as formas amastigotas axênicas de *L. infantum*. Dentre os derivados de guanidina avaliados composto contendo o iodo como substituinte (-I), LQOFG-7, obteve o melhor perfil de atividade anti-*Leishmania* contra *Leishmania infantum*, com bom índice de seletividade, baixa citotoxicidade em PBMCs e indução de morte celular por apoptose em amastigotas de *L. infantum*.

Os compostos selecionados apresentaram níveis seguros quanto a toxicidade para eritrócitos humanos, não apresentando atividade hemolítica dentro das concentrações avaliadas. Já os os derivados de guanidina apresentaram baixa toxicidade para células mononucleares de sangue periférico humano, tendo assim ótimos índices de seletividade.

Já dentre o grupo das selenoglicolicamidas testadas, o composto MSe 13, tendo isopropil (-C₃H₇) e cloro (-Cl) como grupos substituintes foi o mais promissor, obtendo um potencial perfil de atividade anti-*Leishmania*. O composto MSe 13 já apresentou resultados bastantes promissores no que se diz respeito ao seu possível mecanismo de ação, analisado por citometria de fluxo. Onde o mesmo induziu morte celular por apoptose tardia em amastigotas. Com porcentagens bem expressivas, sendo mais estatisticamente significativa que o próprio controle positivo na concentração de seu CE_{50} . Também apresentou um pequeno percentual de morte celular por necrose. Todavia esse composto também induziu apoptose em PBMC's de doadores saudáveis nas maiores concentrações testadas, assim como ofármaco de referência, a anfotericina B.

Na avaliação da produção de nitrito, que sinaliza síntese em NO, o composto LQOFG-7 induziu aumento do nitrito. Aparentemente não há estudos anteriores realtando esta atividade em compostos derivados guanidina na leishmaniose. No entanto, sugere-se um possível mecanismo de ação para este composto. A combinação de quimioterapia e imunoterapia é uma estratégia que pode ser benéfica para infecções intracelulares, como a leishmaniose.. Além de seu papel bem estabelecido como mecanismo efetor antimicrobiano, o NO, que é produzido pela NO sintase induzível (iNOS), fornece feedback imunomodulador crítico.

Quanto aos derivados de acridina, em conclusão, o entendimento das interações fármaco-receptor e os estudos da relação estrutura-atividade (SAR) corroboraram com os resultados obtidos in vitro. As interações intermoleculares com alvos biológicos foram

potencializadas após substituições na molécula base, principalmente a substituição da 4-dimetilamina no AMTAC 11. O derivado acridínico AMTAC 11 apresentou menor toxicidade as PBMC's. A alta seletividade apresentada pelo AMTAC 11 também indica mecanismos seletivos ao parasita. Os parâmetros de toxicidade avaliados por PBMC e eritrócitos também indicaram maior segurança farmacológica quando comparados aos medicamentos padrão.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho trazem perspectivas promissoras acerca da investigação mais aprofundada de novos candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose, validando os possíveis mecanismos de ação desses compostos..

REFERÊNCIAS

- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 233, p. 80–86, 1 maio 2021.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.
- ALMEIDA, Fernanda Silva et al. Estudo in silico com possíveis alvos terapêuticos e in vitro anti-leishmania de derivados espiro-acridínicos. 2018.
- ALMEIDA, F. S. et al. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against Leishmania infantum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128289, 1 out. 2021.
- ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, n.16, 13023-13042, 2015.
- ALONSO, Rafaela dos Santos et al. **Leishmaniose visceral: estudo de reservatório canino na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil**. 2014. Tese de Doutorado.
- AL-TAMIMI, A. M. S. et al. Discovery of new organoselenium compounds as antileishmanial agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 339–345, 1 maio 2019.
- ANDRÉ, S. et al. Antileishmanial Drugs Modulate IL-12 Expression and Inflammasome Activation in Primary Human Cells. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 7, p. 1869–1880, 1 abr. 2020.
- ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95–111, 1 ago. 2014.
- APUY, J. L. et al. Ratiometric Pulsed Alkylation Mass Spectrometry as a Probe of Thiolate Reactivity in Different Metalloderivatives of Staphylococcus aureus pI258 CadC. **Biochemistry**, v. 43, n. 13, p. 3824–3834, 6 abr. 2004.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. **Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 19 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29921749/>>. Acesso em: 1 maio. 2021
- BAE, M.; KIM, H. The Role of Vitamin C, Vitamin D, and Selenium in Immune System against COVID-19. **Molecules**, v. 25, n. 22, 1 nov. 2020.
- BAQUEDANO, Y. et al. Novel Heteroaryl Selenocyanates and Diselenides as Potent Antileishmanial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3802, 1 jun. 2016.
- BARRETT, M. P. et al. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. **Nature Reviews Microbiology** 2019 17:10, v. 17, n. 10, p. 607–620, 23 ago. 2019.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 1 jun. 2012.
- BARTOSH, T.; YLOSTALO, J. Macrophage Inflammatory Assay. **Bio-protocol**, v. 4, n. 14, 2014.
- BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in Leishmania. **Parasite**, v. 26, p. 71, 2019.
- BASU, J. M. et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in Leishmania infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1080–1093, mar. 2008.
- BAUGH, S. D. P. et al. Highly potent, broadly active antifungal agents for the treatment of

- invasive fungal infections. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 33, n. October 2020, p. 127727, 2021.
- BELMONT, P.; DORANGE, I. Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.18.11.1211>, v. 18, n. 11, p. 1211–1224, 2008.
- BERG, M. et al. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. **Molecular microbiology**, v. 90, n. 2, p. 428–442, out. 2013.
- BERLINCK, R. G. S. et al. The chemistry and biology of guanidine natural products. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 11, p. 1264–1301, 2017.
- BRAJTBURG, J. et al. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 2, p. 172, 1985.
- BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 9, n. 4, p. 512–531, 1996.
- 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. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1.ed., Brasília, DF, 2014.
- 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, 2017.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- CAROLE, D. G. et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 19, p. 5560–5568, 2005.
- CHANQUA, S. N. et al. Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 526–534, 1 mar. 2019.
- CHARMANTRAY, F. et al. 4-Hydroxymethyl-3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 967–977, 13 mar. 2003.
- COIMBRA, E. S. et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50–57, 25 dez. 2016.
- CHAUHAN, N.; SHARAN VIDYARTHI A.; PODDAR R. Pharmacophore Modeling and 3D-QSAR Study of Acridine Derivatives for the Development of Better Antileishmanial Agents. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v.2, n.11, p. 6254-6261, 2013.
- COOMBS, Graham H. et al. Changes in hepatic xenobiotic-metabolising enzymes in mouse liver following infection with *Leishmaniadonovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 41, n. 1, p. 17-24, 1990
- CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologia no SUS. **Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: < https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/escopo_pcdt_leishmaniosetegumentar_enquete.pdf > acesso em 14 ago 2022.
- COTA, G. F. et al. Efficacy of Anti-*Leishmania* Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2195, 2013.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical**

microbiology reviews, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan. 2006.

ROCHA, Juliana da Câmara et al. Investigação da atividade biológicas dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre *Leishmania* spp. 2018.

DA C MARA ROCHA, J. et al. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-*Leishmania* activity and cytotoxicity.

Parasitology Research, v. 118, n. 10, p. 3067–3076, 1 out. 2019.

DANTAS, N. et al. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-biological interactions**, v. 280, p. 8–14, 25 jan. 2018.

DE LIMA SERAFIM, V. et al. **New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies**. [s.l.: s.n.]. v. 91

DE QUEIROZ, E. F. F. et al. Virtual screening and assessment of anticancer potential of selenium-based compounds against HL-60 and MCF7 cells. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0110>, v. 12, n. 24, p. 2191–2207, 27 nov. 2020a.

DE SOUSA LUIS, J. A. et al. Combined structure- and ligand-based virtual screening aiding discovery of selenoglycolicamides as potential multitarget agents against *Leishmania* species. **Journal of Molecular Structure**, v. 1198, p. 126872, 15 dez. 2019.

DE SOUZA, M. L. et al. Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Development Research**, v. 81, n. 7, p. 803–814, 1 nov. 2020.

DEBRABANT, A. et al. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 2, p. 205–217, 2004.

DELMAS, F. et al. Synthesis and antileishmanial activity of (1,3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 685–690, 1 ago. 2004.

DI GIORGIO, C. et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277–1284, 1 out. 2007.

DIRO, Ermias et al. A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006988, 2019.

DNDi.2021. Disponível em < <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/> > acesso em: 10 maio 2022

DO ESPÍRITO SANTO, R. D. et al. N, N' N"-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 116–128, 2019.

DORLO, T. P. C. et al. Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3864–3872, jul. 2012.

DORLO, T. P. C. et al. Failure of Miltefosine in Visceral Leishmaniasis Is Associated With Low Drug Exposure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 1, p. 146–153, 1 jul. 2014.

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

EL-HANI, C. N. et al. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 96, 2012.

FLEMING, J.; GHOSE, A.; HARRISON, P. R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. **Nutrition and Cancer**, v. 40, n. 1, p. 42–49, 2001.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives

- for old drugs. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, jul. 2009.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; KATO, K. C.; REIS, P. G.; LIZARAZO-JAIMES, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. *Rev. Inorg. Chem.*, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2013.
- GAO, C. et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800–1807, 15 abr. 2015.
- GATTO, M. et al. The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117977, 23 fev. 2015.
- GIRAUD, F. et al. Design, synthesis and evaluation of 3-(imidazol-1-ylmethyl)indoles as antileishmanial agents. Part II. <http://dx.doi.org/10.1080/14756360802610795>, v. 24, n. 5, p. 1067–1075, 2009.
- 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.
- GUAN, B. et al. Selenium as a pleiotropic agent for medical discovery and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 7473, 2018.
- GUTIERREZ GUARNIZO, S. A. et al. Metabolite Biomarkers of Leishmania Antimony Resistance. **Cells** **2021**, Vol. 10, Page 1063, v. 10, n. 5, p. 1063, 30 abr. 2021.
- HAMIDI, F. et al. Inhibition of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and TGF- β , in Leishmania major infected macrophage by miRNAs: A new therapeutic modality against leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, p. 104777, 1 abr. 2021.
- HEALD, R. A.; STEVENS, M. F. G. Antitumour polycyclic acridines. Palladium(0) mediated syntheses of quino[4,3,2-kl]acridines bearing peripheral substituents as potential telomere maintenance inhibitors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 19, p. 3377–3389, 25 set. 2003.
- HUANG, M. F. N. et al. Synthesis, *in silico* Study and Antileishmanial Evaluation of New Selenides Derived from 7-Chloro-quinoline and *N*-Phenylacetamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 4, p. 712–721, 29 mar. 2021.
- IBIZA, S.; SERRADOR, J. M. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. v. 27, p. 103–117, 2008.
- JAIN, K. et al. Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development and in vitro and in vivo evaluation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2479–2487, 1 maio 2015.
- JAIN, V.; JAIN, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 1, p. 161–170, 1 jan. 2018.
- JEDDI, F.; PIARROUX, R.; MARY, C. Antimony resistance in Leishmania, focusing on experimental research. **Journal of Tropical Medicine**, 2011.
- JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 9 nov. 2010.
- KARAMPETSOU, K. et al. Total phenolic fraction (TPF) from extra virgin olive oil: Induction of apoptotic-like cell death in leishmania spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–30, 2021.
- KARAMYSHEVA, Z. N.; GUARNIZO, S. A. G.; KARAMYSHEV, A. L. Regulation of Translation in the Protozoan Parasite Leishmania. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, 2 abr. 2020.
- KAUFER, A. et al. **The evolution of trypanosomatid taxonomy**. **Parasites and Vectors** BioMed Central Ltd., 8 jun. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5463341/>.

Acesso em: 17 abr. 2021

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology** **2011** **9:8**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul. 2011.

KIM, S. H.; SEMENYA, D.; CASTAGNOLO, D. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113293, 2021a.

KIM, S. H.; SEMENYA, D.; CASTAGNOLO, D. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113293, 15 abr. 2021b.

KLEIVELAND, C.; KLEIVELAND, C. Peripheral Blood Mononuclear Cells. **The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models**, p. 161–167, 1 jan. 2015.

KONG, F. et al. Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. [s.l: s.n.]. v. 13

KUPANI, M. et al. IL-10 and TGF- β Induced Arginase Expression Contributes to Deficient Nitric Oxide Response in Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 18 fev. 2020.

LANG, X.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q.; WUA, Q.; LIU, F.; TAN, C.; LIU, H.; GAO, C.; JIANG, Y. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 21, 4170–4177. 2013.

LAMOTTE, S. et al. The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005480, 8 jun. 2017.

LAPARA, N. J.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 7, p. 8, 2010.

LIU, X. et al. Synthesis and antimalarial activity of 2-guanidino-4-oxoimidazoline derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4523–4535, 14 jul. 2011.

LÖFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197–202, fev. 2008.

MACIEL, B. L. L. et al. Dual Immune Modulatory Effect of Vitamin A in Human Visceral Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107564, 30 set. 2014.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of Trypanosoma cruzi. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, 2015.

MALACHOWSKA-UGARTE, M. et al. Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 197–201, 1 ago. 2012.

MANDAL, S. et al. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of Leishmania donovani from India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 496–507, 1 mar. 2010.

MANETTI, F. et al. Synthesis of new linear guanidines and macrocyclic amidinourea derivatives endowed with high antifungal activity against Candida spp. and Aspergillus spp. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7376–7379, 10 dez. 2009.

MARINHO, F. A. et al. The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in Leishmania amazonensis Promastigotes. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87659, 31 jan. 2014.

MARQUIS, N. et al. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1690–1699, 1 set. 2005.

MARTÍN-MONTES, Á. et al. Library of Seleno-Compounds as Novel Agents against

- Leishmania Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, 1 jun. 2017a.
- MARTINS, L. F. et al. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi* and Selectively Eliminate *Leishmania (L.) infantum* Intracellular Amastigotes. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 19, 2016a.
- MARTINS, L. F. et al. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi* and Selectively Eliminate *Leishmania (L.) infantum* Intracellular Amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 9, p. 2202–2210, 2016b.
- 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, 1 jan. 2014a.
- MEHDI, Y. et al. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292, mar. 2013.
- MELLO, M. DE; ... B. DE A. A.-V.-E. JOURNAL OF; 2018, UNDEFINED. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **Elsevier**, [s.d.].
- MENDONÇA, D. B. D. et al. Nitro-Heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.
- MENEZES, T. M. et al. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 289–297, 1 fev. 2019.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell Death & Disease** 2019 10:2, v. 10, n. 2, p. 1–11, 30 jan. 2019.
- MORENO, D. et al. Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imidoselenocarbamates. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p. 233–239, 5 jan. 2011.
- MORIZOT, G. et al. Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004304, 6 jan. 2016.
- MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of Biologically Important Synthetic Organoselenium Compounds. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 2125–2179, jul. 2001.
- MUGURUZA, C. et al. Antidepressant-like properties of three new α 2-adrenoceptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 13–19, fev. 2013.
- MUTTATHUKATTIL, A. N. et al. Role of Guanidinium-Carboxylate Ion Interaction in Enzyme Inhibition with Implications for Drug Design. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 44, p. 9302–9311, 7 nov. 2019.
- NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N. V.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1, 1 abr. 2021.
- OLSZEWSKA, P.; MIKICIUK-OLASIK, E.; BŁASZCZAK-SWIATKIEWICZ, K.; SZYMANSKI, J.; SZYMANSKI, P. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 68, 959–967. 2014.
- OSTYN, B. et al. Failure of Miltefosine Treatment for Visceral Leishmaniasis in Children and Men in South-East Asia. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100220, 18 jun. 2014.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.
- PANDYA, S. et al. Supplementation of host response by targeting nitric oxide to the macrophage cytosol is efficacious in the hamster model of visceral leishmaniasis and adds to efficacy of amphotericin B. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 2, p. 125–132, 1 ago. 2016.
- PASERO, C. et al. Alkyl-guanidine Compounds as Potent Broad-Spectrum Antibacterial Agents: Chemical Library Extension and Biological Characterization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 9162–9176, 25 out. 2018.

- PATEL, M. M.; MALI, M. D.; PATEL, S. K. Bernthsen synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 21, p. 6324–6326, 1 nov. 2010.
- PICCICA, M. et al. Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review. **Journal of travel medicine**, v. 28, n. 6, 2021.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 1 jan. 2015.
- PONTE-SUCRE, Alicia. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 2, n. 1, p. 14, 2003.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017a.
- PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? **Nature Reviews Microbiology** 2012 11:1, v. 11, n. 1, p. 58–66, 3 dez. 2012.
- PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 28 fev. 2012.
- RAZA, A. et al. Novel acridine-based agents with topoisomerase II inhibitor activity suppress mesothelioma cell proliferation and induce apoptosis. **Investigational new drugs**, v. 30, n. 4, p. 1443–1448, ago. 2012.
- RD, DO E. S. et al. N, N', N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 171, p. 116–128, 1 jun. 2019.
- REID, C. M. et al. Synthesis of novel benzamidine- and guanidine-derived polyazamacrocycles: Selective anti-protozoal activity for human African trypanosomiasis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 20, p. 5399–5401, 2008.
- ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, 1 nov. 2020.
- RODRIGUES, K. A. D. F. et al. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32–40, 3 fev. 2015.
- SAMANTA, Timir B. et al. Mechanism of impairment of cytochrome P450-dependent metabolism in hamster liver during leishmaniasis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 1, p. 75–79, 2003.
- SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D.. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: The effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340–352, 2006.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, E. M. et al. Synthesis of sp²-Iminosugar Selenoglycolipids as Multitarget Drug Candidates with Antiproliferative, Leishmanicidal and Anti-Inflammatory Properties. **Molecules**, v. 26, n. 24, 1 dez. 2021.
- SANTOFIMIA-CASTAÑO, P. et al. The seleno-organic compound ebselen impairs mitochondrial physiology and induces cell death in AR42J cells. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 3, p. 465–473, 17 set. 2014.
- SCHILDBERGER, A. et al. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Chapter Four-Recent Advances in the Chemistry of Acridines.

Advances in Heterocyclic Chemistry, v. 115, p. 287-353, 2015.

SCORZA, B. M. et al. Molecular Sciences Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. [s.d.].

SHADAB, M. et al. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171306, 1 fev. 2017.

SINGH, B. G.; KUNWAR, A. Redox reactions of organoselenium compounds: Implication in their biological activity. <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1882678>, v. 55, n. 6, p. 641–654, 2021.

SRIVASTAVA, P. et al. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3088–3091, ago. 2011.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 1 fev. 2015.

SUZUKI, M. et al. Rapamycin suppresses ROS-dependent apoptosis caused by selenomethionine in A549 lung carcinoma cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1129–1136, maio 2011.

TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 497–507, 1 abr. 2018.

THE LANCET GLOBAL HEALTH. **Taking the neglected out of neglected tropical diseases. The Lancet Global Health** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2020. . Acesso em: 15 abr. 2021

THWE, P. M.; AMIEL, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune function. **Cancer Letters**, v. 412, p. 236–242, 1 jan. 2018.

UPADHYAY, A. et al. Synthesis and evaluation of novel triazolyl quinoline derivatives as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 154, p. 172–181, 25 jun. 2018.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious disease clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, 1 mar. 2019.

VAN TEIJLINGEN BAKKER, N.; PEARCE, E. J. Cell-intrinsic metabolic regulation of mononuclear phagocyte activation: Findings from the tip of the iceberg. **Immunological Reviews**, v. 295, n. 1, p. 54–67, 2020.

VOLF, P.; HOSTOMSKA, J.; ROHOUSOVA, I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. **Parasite (Paris, France)**, v. 15, n. 3, p. 237–243, 2008.

WALLENBERG, M.; MISRA, S.; BJÖRNSTEDT, M. Selenium Cytotoxicity in Cancer. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 5, p. 377–386, 1 maio 2014.

WANDERLEY, J. L. M. et al. Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 1 fev. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021. **Neglected tropical diseases**.

Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 > Acesso em 14 Ago 2022

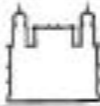
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021. **Leishmaniasis**.<

[https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=The%20epidemiology%20of%20leishmaniasis%20depends,the%20parasite%2C%20and%20human%20behaviour.)

[sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=The%20epidemiology%20of%20leishmaniasis%20depends,the%20parasite%2C%20and%20human%20behaviour.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=The%20epidemiology%20of%20leishmaniasis%20depends,the%20parasite%2C%20and%20human%20behaviour.)> Acesso em 13 Set 2022

- WU, P. et al. Seleno-Chitosan induces apoptosis of lung cancer cell line SPC-A-1 via Fas/FasL pathway. **Bioorganic Chemistry**, v. 97, p. 103701, 1 abr. 2020.
- YADAV, T. T. et al. A comprehensive review on acridone based derivatives as future anti-cancer agents and their structure activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 239, p. 114527, 5 set. 2022.
- ZHAO, J.; LI, W.; MA, R.; CHEN, S.; REN, S.; JIANG, T. Design, Synthesis and DNA Interaction Study of New Potential DNA Bis-Intercalators Based on Glucuronic Acid. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p.16851-16865, 2013.
- ZHANG, B.; LI, X.; LI, B.; GAO, C.; JIANG, Y. Acridine and its derivatives: a patent review (2009–2013). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 6, p. 647-664, 2014.
- ZELEDÓN, R. A. Hemoflagellates. **Medical Microbiology**, 1996.
- ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, 23 ago. 2016.
- ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 1 out. 2017.

ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz	 Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731 Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e diagnóstico de Leishmania
CERTIFICADO DE AUTENTICAÇÃO	
CA 041/2015	
Solicitação nº: SC 017/2015	
Solicitante: Tatjana Keesen da Souza Lima	
Instituição: UFPB - Lab. de Imunologia das Doenças Infecciosas	
Endereço completo: Centro de Biotecnologia - Campus I - João Pessoa - PB	
Data da solicitação: 13/04/2015	Data liberação da amostra: 05/05/2015

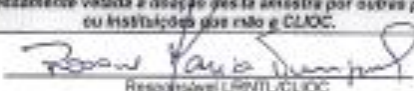
IOC-L	0579
Referência Internacional	MHOM [®] BR/1974/PP75
Identificação	<i>L. (L.) infantum</i>
Método de caracterização	☒ Isoenzimas ☐ PCR
Arquivo de Ensaio Isoenzimático	040 (Nº) / 2013 (ANO)
Lote	016/2015
Quantidade	2 mL
Meio de cultura utilizado	Schneider
Antibióticos usados	Penicilina-Estreptomicina
Temperatura de cultivo	25°C
Nº Passagens	Desconhecida
Infectividade	☐ Positiva ☒ Desconhecida
Estado da cultura	+++

Exemplo de Referência Internacional: MHOM/BR/1975/M2503; onde M = Mamífero (classe); HOM = *Homos sapiens* (espécie); BR = Brasil (País onde foi isolada a cepa); 1975 = ano de isolamento; e M2503 = nome ou código da cepa.
(WHO Technical Report Series 949 – Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)

Importante: As informações apresentadas neste certificado são garantidas até o momento da saída das amostras de CLIOC.

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de Leishmania doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://labciofio.org.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

É expressamente vetada a doação desta amostra por outras pessoas ou instituições que não o CLIOC.


 Responsável LRNT/CLIOC

Dr. Rosângela Lima
 Tecnóloga - Chefe Substituta
 Lab. de Res. em Leishmaniose
 (JAPE 1554135-1 - IOC/FIOCRUZ)

Av. Brasil, 4.385 Piquinho - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21043-900 - Brasil
 Pavilhão Celândia Osório, 5º andar - sala 505, 502, 1º andar - sala 116
 Tel.: (0055) (21) 3365-8177 / 3365-8195 - Fax: (0055) (21) 3365-8195

(FORM-POR-LRNT/CLIOC-020-002) Rev.04 Página 1 de 1

ANEXO B – 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: iaponiracortez@yahoo.com.br; cephulw@hotmail.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo relacionado a tese, submetido na revista *Acta Tropica* (Fator de impacto 3.14; Qualis –A1);

APÊNDICE B – Artigo relacionado a tese, publicado na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Fator de impacto: 2.823; Qualis – A2);

APÊNDICE C – Artigo não relacionado a tese, publicado na revista *Parasitology Research* (Fator de impacto: 2.289; Qualis – B1);

APÊNDICE D – Depósito de patente relacionado a tese;

APÊNDICE A

Acta Tropica

Leishmanicidal activity of guanidine derivatives against *Leishmania infantum*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Protozoans(excl. Plasmodium spp), pathogenesis; diagnosis, eco-epidemiology, genetics, vectors, immu
Keywords:	Leishmaniasis. Anti-leishmanial activity. Guanidine compounds. Cell death. Apoptosis. Nitrite production.
Corresponding Author:	Tatjana Keesen Souza Lima, Ph.D Paraíba Federal University João Pessoa, PB BRAZIL
First Author:	Fernanda silva Almeida
Order of Authors:	Fernanda silva Almeida Vitor Partife Moreira Edson dos Santos Silva Leonardo Lima Cardoso Pedro Henrique de Sousa Palmeira Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva Demétrius Antônio Machado Araújo Ian Porto Gurgel Amaral Eduardo René Pérez González Tatjana Keesen Souza Lima, Ph.D
Abstract:	Leishmaniasis is a neglected tropical infectious disease with thousands of cases annually; it is of great concern to global health, particularly the most severe form, visceral leishmaniasis. Visceral leishmaniasis treatments are minimal and have severe adverse effects. As guanidine-bearing compounds have shown antimicrobial activity, we analyzed the cytotoxic effects of several guanidine-bearing compounds on <i>Leishmania infantum</i> in their promastigote and amastigote forms in vitro, their cytotoxicity in human cells, and effects on reactive nitrogen species production. LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7 had IC ₅₀ values of 12.7, 24.4, and 23.6 µM, respectively, in promastigotes. These compounds exhibited cytotoxicity in axenic amastigotes at 26 18.6µM, respectively. The compounds showed no apparent cytotoxicity in cells from healthy donors. To identify mechanisms of action, we evaluated cell death processes by annexin V and propidium iodide staining and nitrite production. Guanidine-containing compounds caused a significant percentage of amastigotes to apoptosis. Independent of <i>L. infantum</i> infection, LQOFG-7 increased nitrite production in peripheral blood mononuclear cells, suggesting a potential mechanism of action for this compound. Therefore, these data suggest that guanidine derivatives are potential anti-microbial molecules, and further research is needed in fully understand their mechanism of action, especially in anti-leishmanial studies.
Suggested Reviewers:	Robson Coutinho rcsilva@biof.ufrj.br Cristiane Menezes menezescristiane@yahoo.com.br Luiz Eduardo Baggio savio@biof.ufrj.br Joanna Valverde valverdejoanna@gmail.com

Cover Letter

Cover letter

September 04th, 2022

Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology

Federal University of Paraíba
João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900

Dear Editor,

We are pleased to submit to Acta Tropica the manuscript entitled “**Leishmancidal activity of guanidine derivatives against *Leishmania infantum***” for your appreciation and possible publication in this highly esteemed journal. This study demonstrates originality, multidisciplinary with other areas, scientific quality, and potential application in medicinal chemistry. Therefore, in this study, we explained, by performing *in vitro* assays, the guanidine derivative's antileishmanial potential and interaction profile. Results have shown that a highly active compound against *L. infantum* in promastigote and amastigote forms causes cell damage by apoptosis in amastigote forms, has low toxicity in PBMC cells, and appears to have a modulating by the capacity to increase nitrite production in infected monocytes with *L. infantum*.

All the authors have read, approved, and made substantial contributions to the manuscript. None of the original material in this manuscript has been published nor is currently under review for publication elsewhere.

I will be the corresponding author and can be reached at the address below.

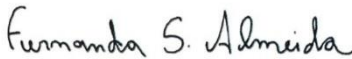
We are looking forward to hearing from you soon.

Yours sincerely,

Tatjana Keesen de Souza Lima

Prof. Dr. Tatjana Keesen de Souza Lima

Federal University of Paraíba
João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900, Brazil
Tel.: +55 83 32167173
E-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br



Fernanda Silva Almeida



Vitor Partite Moreira



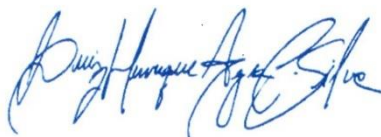
Edson dos Santos Silva



Leonardo Lima Cardoso



Pedro Henrique de Sousa Palmeira



Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva



Demetrius A.M. Araújo



Ian P. G. do Amaral



Eduardo René Pérez González

Highlights



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

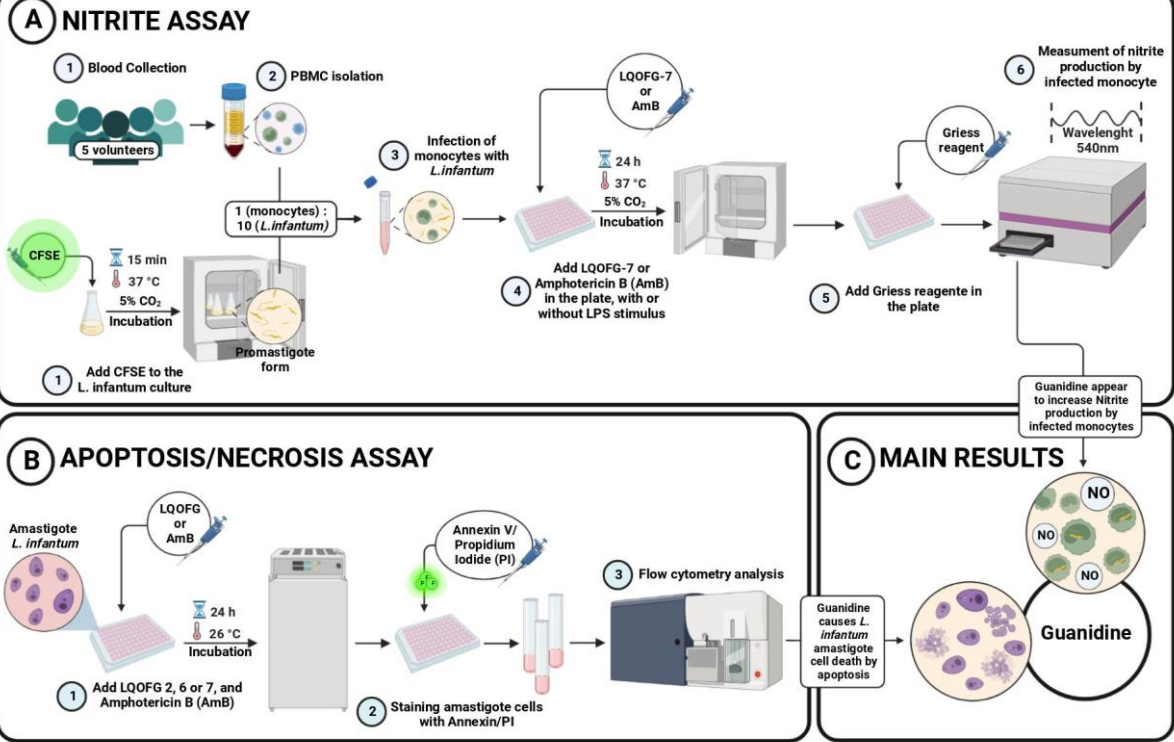


João Pessoa, September 04th, 2022

HIGHLIGHTS

- Guanidine derivatives showed expressive antileishmanial activity *in vitro*;
- Guanidine causes cell death by apoptosis in *L.infantum* amastigote form;
- Guanidine compounds have a high selectivity index;
- LQOFG-7 appears to have an immunomodulatory effect by increasing NO production;

Graphical Abstract



1 **Leishmanicidal activity of guanidine derivatives against *Leishmania infantum*¹**

2 Fernanda Silva Almeida^{a,b}, Vitor Partite Moreira^c, Edson dos Santos Silva^a, Leonardo Lima Cardoso

3 ^aPedro Henrique de Sousa Palmeira^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^a, Demetrius A.M.

4 Araújo^d, Ian P. G. do Amaral^e, Eduardo René Pérez González^c, Tatjana S. L. Keesen^{a*}.

5 ^a*Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology;*

6 *Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900.*

7 ^b*Biotechnology Doctoral Program, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da*

8 *Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brazil.*

9 ^c*São Paulo State University (UNESP), School of Sciences and Technology, Department of Chemistry*

10 *and Biochemistry, Fine Organic Chemistry Lab, 19060-080, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.*

11 ^d*Biotechnology Department, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brazil.*

12 ^e*Laboratory of Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Biology; Federal University of*

13 *Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900*

14 ***Corresponding author:**

¹ Abbreviations: cutaneous leishmaniasis (CL); visceral leishmaniasis (VL); mucocutaneous leishmaniasis (MCL); Amphotericin B (AmB); dimethyl sulfoxide (DMSO); fetal bovine serum (FBS); biological oxygen demand (B.O.D.); phosphate-buffered saline (PBS); peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); propidium iodide (PI); carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE); lipopolysaccharide (LPS); optical density (OD); 50% inhibitory concentration (IC₅₀); 50% effective concentration (EC₅₀); 50% cytotoxic concentration (CC₅₀); 50% hemolytic concentration (HC₅₀)

15 Tatjana Keesen de Souza Lima. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade
16 Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. CEP: 58051-085. +55 (83) 32167371. E-mail:
17 tat.keesen@cbiotec.ufpb.br

18

19

20 **ABSTRACT**

21 Leishmaniasis is a neglected tropical infectious disease with thousands of cases annually; it is of great
22 concern to global health, particularly the most severe form, visceral leishmaniasis. Visceral
23 leishmaniasis treatments are minimal and have severe adverse effects. As guanidine-bearing
24 compounds have shown antimicrobial activity, we analyzed the cytotoxic effects of several guanidine-
25 bearing compounds on *Leishmania infantum* in their promastigote and amastigote forms *in vitro*, their
26 cytotoxicity in human cells, and effects on reactive nitrogen species production. LQOFG-2, LQOFG-
27 6, and LQOFG-7 had IC₅₀ values of 12.7, 24.4, and 23.6 μ M, respectively, in promastigotes. These
28 compounds exhibited cytotoxicity in axenic amastigotes at 26.1, 21.1, and 18.6 μ M, respectively. The
29 compounds showed no apparent cytotoxicity in cells from healthy donors. To identify mechanisms of
30 action, we evaluated cell death processes by annexin V and propidium iodide staining and nitrite
31 production. Guanidine-containing compounds caused a significant percentage of death by apoptosis in
32 amastigotes. Independent of *L. infantum* infection, LQOFG-7 increased nitrite production in
33 peripheral blood mononuclear cells, suggesting a potential mechanism of action for this compound.
34 Therefore, these data suggest that guanidine derivatives are potential anti-microbial molecules, and
35 further research is needed to fully understand their mechanism of action, especially in anti-leishmanial
36 studies.

37 **Keywords:** Leishmaniasis. Anti-leishmanial activity. Guanidine compounds. Cell death. Apoptosis.
38 Nitrite production.

39 1. INTRODUCTION

40 Leishmaniasis is a group of infectious and parasitic diseases caused by trypanosomatid
 41 protozoa of the genus *Leishmania* and is considered a neglected tropical disease. The three primary
 42 forms of the disease are cutaneous leishmaniasis (CL), visceral leishmaniasis (VL), also known as
 43 kala-azar, and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). CL is the most common form, whereas VL is the
 44 most severe. More than 1 billion people live in areas endemic to leishmaniasis and are at risk of
 45 infection, with 30,000 new cases estimated annually (Pace, 2014).

46 VL is caused by *Leishmania donovani*, and *Leishmania infantum* cause VL to form caused by
 47 *L. infantum* in the Mediterranean basin, China, the Middle East, and South America. It has the highest
 48 prevalence in Brazil, and its main reservoir is dogs. The anthroponotic form caused by *L. donovani* is
 49 prevalent in eastern Africa, Bangladesh, India, and Nepal (van Griensven and Diro, 2019). Persistent
 50 irregular fever and splenomegaly characterize VL. Pancytopenia, hepatomegaly,
 51 hypergammaglobulinemia, and weight loss are common symptoms and are mainly present in the
 52 aggressive stages of the disease (Burza et al., 2018; van Griensven and Diro, 2012).

53 Successful treatment of leishmaniasis is challenging. For several years, leishmaniasis
 54 treatments have included pentavalent antimony, sodium stibogluconate, and meglumine antimoniate.
 55 In addition to painful intramuscular administration, antimonial is cardiotoxic, and its adverse effects
 56 are particularly evident in HIV-visceral leishmaniasis coinfection. Furthermore, sodium stibogluconate
 57 is no longer recommended in some countries owing to increased drug resistance (Barrett et al., 2019;
 58 Burza et al., 2018).

59 Amphotericin B (AmB) has become the drug of choice in many countries. It binds to ergosterol,
 60 a sterol found in fungal and leishmanial but not in mammalian membranes. Its liposomal formulation,
 61 AmBisome, is safer than the other non-encapsulated drugs (Barrett et al., 2019; van Griensven and
 62 Diro, 2012). Miltefosine was adopted as the regimen by the Asian Elimination Initiative in 2005.

63 However, since then, *L. donovani* has grown resistant to this treatment, reducing its efficacy (Burza et
64 al., 2018; Jain and Jain, 2018a).

65 Organic compounds that contain guanidine groups can be found in nature, such as arginine and
66 many natural alkaloids. In recent decades, interest in synthetic molecules and drugs containing
67 guanidine moieties has increased (Kim et al., 2021a). Many compounds with a guanidine moiety have
68 been synthesized in the last decade that show potent anti-microbial activity; some compounds have
69 advanced to further drug developmental stages or to clinical studies (Baugh et al., 2021; Berlinck et
70 al., 2017; do Espírito Santo et al., 2019; Kim et al., 2021a; Ngerina et al., 2019; Pasero et al., 2018;
71 Reid et al., 2008). Due to their structural and molecular characteristics, guanidine compounds have
72 been explored for treating infectious and non-infectious diseases. These compounds have shown potent
73 activity against multiple pathogens, such as bacteria, by modulating antibiotic resistance in treatment-
74 resistant *Staphylococcus aureus* (Dantas et al., 2018), limiting antifungal activity (Baugh et al., 2021;
75 Manetti et al., 2009), antimalarial activity (Liu et al., 2011), and *in vitro* anti-parasitic activity against
76 *L. infantum* and *Trypanosoma cruzi* (Martins et al., 2016).

77 In addition, because of the limitations of current treatments, the search for new drugs with
78 leishmanicidal activity is critical (Lamotte et al., 2017). Guanidine compounds have already shown
79 activity *in vitro* and *in vivo* in BALB/c mice infected with *L. amazonensis* (RD et al., 2019). Therefore,
80 in this study, we investigated the *in vitro* activity of several guanidine compounds against *L. infantum*,
81 a strain that causes visceral leishmaniasis, to study their mechanisms of inducing cell death,
82 cytotoxicity in human cells, and changes in reactive nitrogen species production.

83

84

85 2. MATERIALS AND METHODS

86 2.1 Guanidine compound preparation

87 Three guanidine compounds (Figure 1) were synthesized according to the protocol described
88 by Espírito Santo and collaborators (do Espírito Santo et al., 2019). These compounds were diluted in
89 dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain stock solutions (20 mg/mL). To obtain the final concentrations
90 of the drugs in the assays, the stock solutions were diluted in a culture medium with a concentration
91 of up to DMSO 0.5% (vehicle control).

92 2.2 Reference anti-*L. infantum* drug

93 Amphotericin B (Anfotericin B[®]; Cristália, São Paulo, Brazil) was used as a positive control as
94 it is an anti-*Leishmania* drug. A stock solution 10 mg/mL stock solution was prepared in DMSO.

95 2.3 *L. infantum* culture conditions

96 The promastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*
97 [IOC/L0579(MHOM/BR/1974/PP75)] were cultured in Schneider's medium, pH 7.0, supplemented
98 with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2% male human urine, 100 U/mL of penicillin,
99 and 100 mg/L of streptomycin, and the parasites were maintained at 26 °C. The procedure to obtain
100 the extracellular axenic amastigote form of *L. infantum* was based on methods previously described
101 (Debrabant et al., 2004) with modifications. The promastigote forms in the stationary growth phase
102 were differentiated into axenic amastigotes by temperature treatment (37 °C). Parasites were
103 maintained in culture for no more than 20 passages.

104 2.4 Anti-*L. infantum* activity

105 The promastigote growth inhibition assay was performed as previously described (Rodrigues et
106 al., 2015). Promastigotes were harvested during the exponential growth phase. They were incubated in
107 the presence and absence of several concentrations of LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7 (500 to 7.8
108 µM), and AmB (10 to 0.078 µM) as the positive control. The plate was incubated at 26 °C for 72 h in
109 a biological oxygen demand (B.O.D.) incubator. The growth inhibition was evaluated using an MTT
110 assay kit (Amresco, Ohio, USA) according to the manufacturer's protocol. After 4 h of incubation,

10% sodium dodecyl sulfate was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance (540 nm) was measured using a plate reader (Biosystems model ELx800; Curitiba, PR, Brazil). The same procedure was followed to assess growth inhibition of the axenic amastigote form using these compounds with the following modifications: the treatment time was shortened to 24 h, and the test temperature was raised to 37 °C at a pH of 5.5.

2.5 Red blood cell lysis assay

The hemolytic activities of guanidine compounds were measured using human red blood cells from healthy adults (n = 6) according to methods previously described (Jain et al., 2015). Briefly, 80 µL of a 5% erythrocyte/phosphate-buffered saline (PBS) suspension was mixed with 20 µL of LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, (1000 to 7.8 µM), and AmB (100 to 0.78 µM). After incubation at 37 °C for 1 h, 200 µL of PBS (1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 136.9 mM NaCl, and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to stop the hemolysis process, and the samples were centrifuged for 10 min at 1,000 ×g. The supernatants were collected, and the extent of hemolysis was measured spectrophotometrically at 540 nm. The hemolysis percentage was determined as $[(\text{Abs}_{\text{sam}} - \text{Abs}_{\text{con}}) / (\text{Abs}_{\text{tot}} - \text{Abs}_{\text{con}}) \times 100]$, where Abs_{sam} is the absorbance of the sample, Abs_{con} is the absorbance of the blank control (without drugs), and Abs_{tot} is the absorbance of total hemolysis (replacing the sample solution with an equal volume of ultrapure water (Direct-Q UV®, France)).

128

2.6 In vitro cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells

In vitro cytotoxicity was evaluated using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from three healthy volunteers. PBMC were separated by density gradient using Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare, USA), pelleted by centrifugation (400 g for 40 minutes), and resuspended in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin 5000 Units/mL + streptomycin 5000 µg/mL). After 24 h of treatment, cell viability was evaluated by the modified colorimetric method based on the tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5- diphenyltetrazolium bromide). The MTT assay was used for *in vitro* cytotoxicity as previously described with the following modifications: cells were exposed to serially diluted concentrations of LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7 (1000 to 7.8 μ M), and AmB (100 to 0.78 μ M). The plates were kept at 37 °C for 24 h. MTT (5 mg/mL) was added and incubated for 4 h at 37 °C, after which the plates were centrifuged, the supernatant was discarded, and DMSO was added, leaving the plates under stirring to solubilize the formazan salts. Absorbance was measured at 540 nm using a plate reader (ELx800; Curitiba, PR, Brazil). The mean percentage of viable cells was calculated relative to the untreated control.

144

2.7 Apoptosis/necrosis profiling with annexin V/PI staining in promastigote and amastigote-like forms

To evaluate both apoptosis and necrosis, promastigote-like forms of *L. infantum* in the log phase of growth were incubated at several concentrations based on the IC₅₀ values of LQOFG-2 (6.35; 12.7, 25.4, and 50.8 μ M) LQOFG-6 (12.2, 24.4, 48.8 and 97.6 μ M), and LQOFG-7 (11.65, 23.3, 46.6 and 93.2 μ M) were used, and AmB (1.5 and 6 μ M) was used as the positive control. The plates were incubated for 24 h at 26 °C $\pm$ 1 °C in a B.O.D. incubator. After incubation, the promastigotes were washed three times in cold PBS, resuspended in binding buffer (10-mM HEPES, 140-mM NaCl, and 2.5-mM CaCl₂, pH 7.4), and stained using a FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The stained cells were diluted and suspended in an annexin V binding buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Annexin V-FITC/propidium iodide (PI)-stained cells were analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The raw data were analyzed using FlowJo 10.0.7 software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA).

To evaluate both apoptosis necrosis of the amastigote-like forms of *L. infantum*, the (2.8) protocol was followed. In each well, amastigotes were treated with the guanidine compounds and

161 controls. Several concentrations based on the EC₅₀ values of LQOFG-2 (13, 26.1, 52.2, and 104.4 μ M),
 162 LQOFG-6 (10.5, 21.1, 42.2, and 84.4 μ M), and LQOFG-7 (9.3, 18.6, 37.2 and 72.4 μ M) were used,
 163 and AmB (0.30 and 1.2 μ M) was used as the positive control.

164 2.9 Preparation of peripheral blood mononuclear cells and infection assay with *L. infantum*

165 PBMCs were obtained from five healthy volunteers from João Pessoa, PB Brazil. Briefly,
 166 peripheral blood was diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS) and slowly layered over Ficoll®
 167 Paque PLUS (GE Healthcare, USA). Tubes were centrifuged at 400 $\times$ g for 40 min at 20 °C. After
 168 centrifugation, PBMC were harvested, washed three times with PBS, and resuspended in RPMI
 169 medium supplemented with antibiotics (penicillin 200 U/ml and streptomycin 0.1 mg/ml), 1 mM l-
 170 glutamine, and 10% inactivated human serum. Cell viability was assessed using a trypan blue dye
 171 exclusion assay. Cells were counted using a hemocytometer. (Viana et al., 2018; Vieira et al., 2013).

172 Promastigotes were prepared as previously described (Viana et al., 2018). Briefly, the *L. infantum*
 173 promastigotes were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (CellTrace
 174 TM CFSE Cell Proliferation Kit; Eugene, Oregon, U.S.A.). The suspension was incubated for 15 min
 175 at 5% CO₂, 37 °C, and washed three times with PBS containing 10% inactivated FBS, producing
 176 CFSE-labeled *L. infantum*, which was added to whole blood monocytes. The Infection ratio was set at
 177 1:10 (monocyte: *L. infantum*) for 3 h. After the infection period, cells were washed three times with
 178 PBS supplemented with 10% FBS. After obtaining PBMC, the cells were plated and incubated with
 179 LQOFG-7 and AmB at a concentration of 1 $\times$ the EC₅₀ value, with media or lipopolysaccharide (LPS)
 180 stimulus (lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich O111:B4) at 100 ng/mL
 181 (Bartosh and Ylostalo, 2014; Lapara and Kelly, 2010; Schildberger et al., 2013).

182 The plates were incubated for 24 h in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. The plates were centrifuged
 183 at 200 $\times$ g for 8 min at 4 °C, and the supernatant was collected to measure reactive nitrogen production.
 184 CD14 surface antibody (PERCP-Cy5.5; clone MΦP9) was used for monocyte labeling. After adding

185 the antibody, the plate was incubated at 4 °C for 15 min, protected from light. The cells were washed
186 with ice-cold PBS buffer. The plate was centrifuged at 200 ×g again for 10 min at 4 °C. The
187 supernatant was removed, the cells were resuspended in 100 µL of PBS buffer and 100 µL of 4%
188 formaldehyde solution, then read on a flow cytometer (BD FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose,
189 CA, USA). FlowJo v.10.8.1 software was used to analyze the raw data (Magalhães et al., 2015)
190 (Supplementary Figure 1).

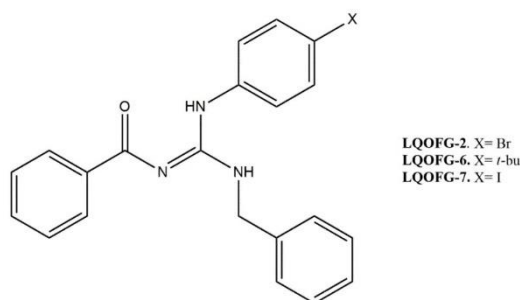
191 2.10 Nitrite Assay

192 The culture supernatants from (2.10) were evaluated for the stable end-product of reactive nitrogen
193 species (NO, nitrates, and nitrites) using the Griess reaction, according to the Cayman Chemical
194 instruction manual (Cayman Chemical, USA). The nitrite level was determined by measuring the
195 absorbance at a wavelength of 540 nm using a microplate reader (BioTek-ELx800). (Reza et al., 2019).

196 2.11 Data analysis and statistics

197 The 50% inhibitory concentration (IC₅₀), 50% effective concentration (EC₅₀), 50% cytotoxic
198 concentration (CC₅₀), and 50% hemolytic concentration (HC₅₀) values were calculated using the
199 software GraphPadPrism® program (version 6.0; San Diego, CA, USA). Unless otherwise noted, the
200 assays were performed in triplicates and three independent experiments. We used FlowJo 10.0.7 for
201 the Flow cytometry data analysis. Statistical differences among treatments were assessed by analysis
202 of variance (ANOVA) with the post hoc Tukey test at a significance level of 0.05. The data represent
203 the mean ± standard error (SEM).

204



205

206 **Fig. 1.** Molecular structure of guanidine derivatives. (Z)—N-((benzylamine)((4-
 207 bromophenyl)amino)methylene)benzamide (**LQOFG-2**). (Z)—N-((benzylamine)((4-(tert-
 208 butyl)phenyl)amino)methylene)benzamide (**LQOFG-6**). (Z)—N-((benzylamine)((4-
 209 iodophenyl)amino)methylene)benzamide (**LQOFG-7**). (RD et al., 2019)

210 2.12 Ethics statement

211 All experiments were performed in compliance with the relevant laws, institutional guidelines,
 212 and ethical standards of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all
 213 patients, and the Ethics Committee approved the study at the Federal University of Paraiba, Brazil
 214 (process number: 2.560.067 and CAAE:82944118.5.0000.5188).

215

216 3. RESULTS

217 The half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7 were
 218 12.7 μ M, 24.4 μ M, and 23.6 μ M, while IC_{50} for amphotericin B was 1.5 μ M (Table 1).

219 At the highest concentration tested (1000 μ M), none of the guanidine-containing compounds were
 220 toxic to human red blood cells; therefore, it was not possible to calculate the selectivity index (the ratio
 221 HC_{50}/IC_{50}). However, AmB presented an HC_{50} of 7.10 ± 2.09 μ M, producing a selectivity index of
 222 4.73, which matches the already known cellular toxicity of AmB (Brajtburg et al., 1985).

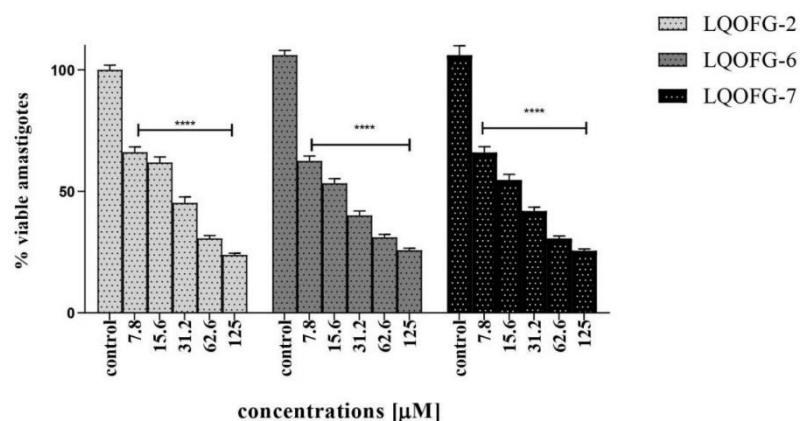
223

Table 1. The half-maximal inhibitory concentration of the growth of *L. infantum* promastigotes (IC₅₀) treated with guanidine-derived compounds and amphotericin B as a positive control for 72 h of treatment, toxicity to red blood cells (HC₅₀), and the selectivity indices (SI, HC₅₀/IC₅₀).

Compounds	IC ₅₀ (μM)	HC ₅₀ (μM)	SI
LQOFG-2	12.7 ± 0.25	>1000	Nd
LQOFG-6	24.4 ± 0.76	>1000	Nd
LQOFG-7	23.6 ± 0.64	>1000	Nd
Amphotericin B	1.5 ± 0.23	7.10 ± 2.09	4.73

Nd = not determined.

LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7 showed cytotoxic activity in axenic amastigotes at values of 26.1 ± 1.22 μM, 21.1 ± 1.13 μM, and 18.6 ± 1.23 μM, respectively. AmB had an EC₅₀ value of 0.30 ± 1.29 μM (Table 2; Figure 2). At the concentration of 31.2 μM, LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7 presented growth inhibition of 57.71%, 59.88%, and 58.02%, respectively, compared to the control(untreated).



233

234 **Fig. 2.** Cell viability % of axenic amastigotes treated with LQOFG-2 (a); LQOFG-6 (b); LQOFG-7 (c) $\pm$ SEM from three
 235 independent experiments in triplicate. **** $P \leq 0.0001$ vs. control (untreated) by Analysis of Variance (ANOVA) with
 236 the post hoc Tukey test.

237 **Table 2.** Half-maximal effective concentration (EC_{50}) of axenic amastigotes treated with LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-
 238 7, and AmB as the positive control, cytotoxicity in PBMC cells (CC_{50}), and the selectivity index (SI, CC_{50}/EC_{50})

Compounds	EC_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)	SI
LQOFG-2	26.1 $\pm$ 1.22	313.1 $\pm$ 3.23	12.00
LQOFG-6	21.1 $\pm$ 1.13	Nd	Nd
LQOFG-7	18.6 $\pm$ 1.23	745.5 $\pm$ 3.58	39.54
Amphotericin B	0.30 $\pm$ 1.29	53.3 $\pm$ 3.59	177.6

239

LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7 had a CC_{50} of 313.1 ± 3.23 , > 1000 , and 745.5 ± 3.58 , respectively, while amphotericin B had a CC_{50} of 53.88 ± 3.59 (Table 2; Figure 3). AmB showed more significant toxicity; however, its lower EC_{50} had a better selectivity index than guanidine compounds. In contrast, the compound LQOFG-2 had the highest toxicity to PBMC among the guanidine derivatives, but it was less toxic than AmB.

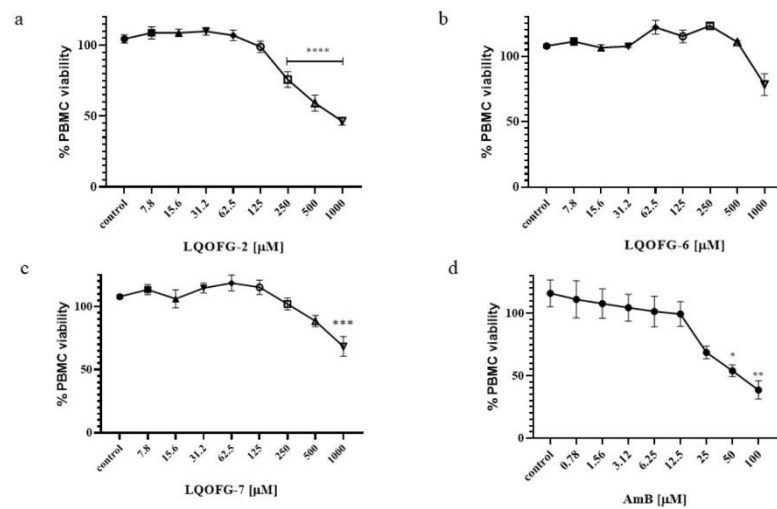
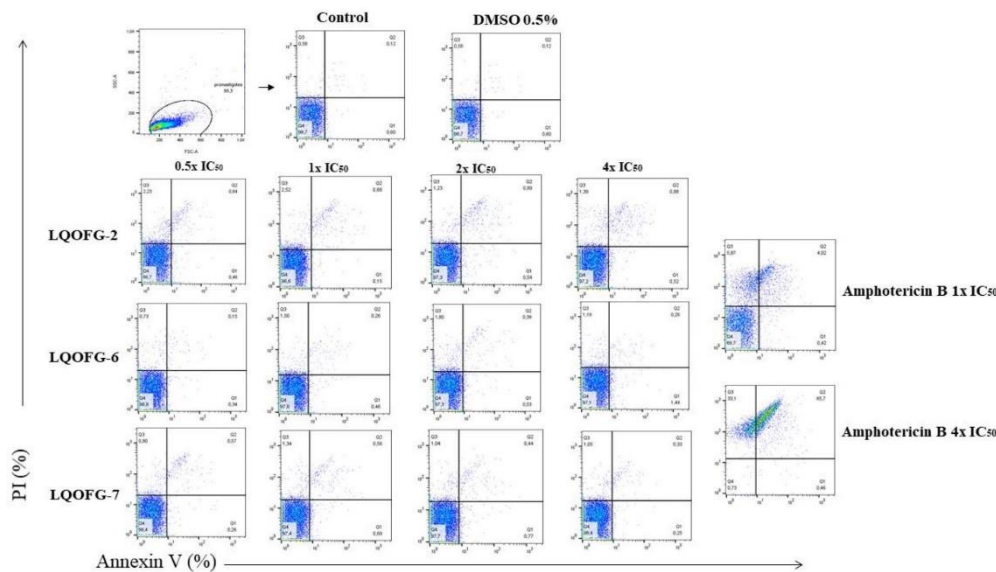


Fig. 3. PBMC % viability after LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, and AmB treatment. Data are mean $\pm$ SEM from three independent experiments in triplicate. (control): represents untreated control. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ by Analysis of Variance (ANOVA) with the post hoc Tukey test.

Flow cytometry with annexin V-FITC and PI staining was used to identify cell death stages and pathways in parasites after treatment with LQOFG-2, LQOFG-6, and LQOFG-7. Annexin V and PI discriminate between early- (AV+, PI-) and late-apoptotic cells (AV+, PI+) as well as necrotic (AV-, PI+) and live cells (AV-, PI-) (da Câmara Rocha et al., 2019; Karampetsou et al., 2021).

254 There were no statistically significant changes for the guanidine compounds. Amphotericin B
255 induced late-apoptosis at the rates of $4.30 \pm 0.28\%$ at $1\times$ the IC_{50} and $65.83 \pm 1.85\%$ at $4\times$ the IC_{50} .
256 The necrotic cell percentage (AV-, PI+) was $7.64 \pm 1.17\%$ at $1\times$ the IC_{50} and $33.10 \pm 1.90\%$ at $4\times$ the
257 IC_{50} concentrations ($p < 0.0001$, Supplementary Table 1; Figure 4).



258
259 **Fig. 4.** Analysis strategy of the representative dot plots showing staining of *L. infantum* promastigotes. *L. infantum*
260 promastigotes were incubated at 26 °C for 24 h in the absence or presence of the LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, or
261 AmB at concentrations of 0.5 $\times$, 1 $\times$, 2 $\times$, or 4 $\times$ the IC_{50} . Annexin V/ PI (propidium iodide) staining was performed, and the
262 samples were analyzed by flow cytometry. Q1: Early-Apoptosis (AV+, PI-); Q2: Late-Apoptosis (AV+, PI+); Q3:
263 Necrotic Cells (AV-, PI+); Q4: Live Cells (AV-, PI-).

264
265 The same assay parameters were used for the axenic amastigotes of *L. infantum* in the stationary
266 phase: 24 h of treatment at 0.5 $\times$, 1 $\times$, 2 $\times$, and 4 $\times$ the EC_{50} . The data for these experiments can be found
267 in Table 3 and Figure 5.

268

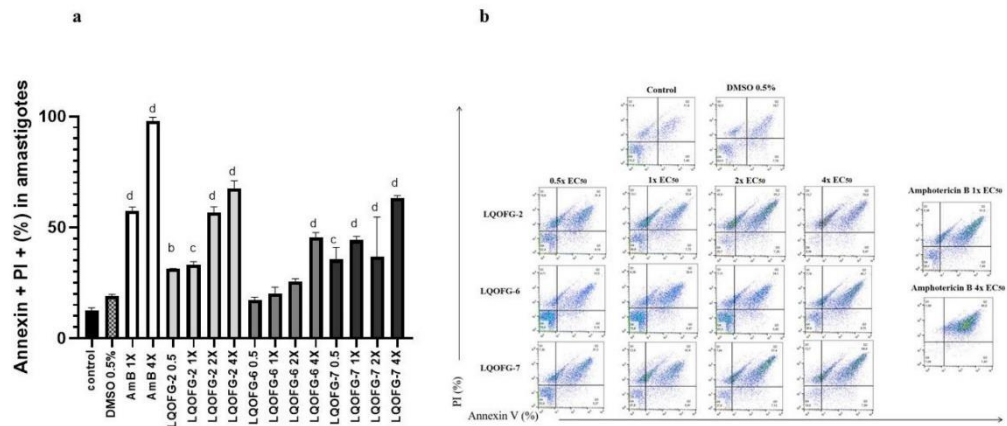


Fig. 5. Cell death of axenic amastigotes following LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, and AmB treatment. (a) Percentage of cell death by late-apoptosis of axenic amastigotes. (b) Representative dot plots showing staining of *L. infantum* axenic amastigotes. Axenic amastigotes were incubated in the absence or presence of LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, or AmB at concentrations of 0.5 $\times$, 1 $\times$, 2 $\times$, or 4 $\times$ the EC₅₀. Annexin V/PI (propidium iodide) staining was performed, and the samples were analyzed by flow cytometry. ^a $P \leq 0.05$ vs. untreated control, ^b $P \leq 0.01$ vs. untreated control, ^c $P \leq 0.001$ vs. untreated control, ^d $P \leq 0.0001$ vs. untreated control, by Analysis of Variance (ANOVA) with the post hoc Tukey test compared to the untreated control.

The results for the parasite cell death type are presented in Table 3. There was no statistical difference between the negative control (untreated) and vehicle control (DMSO 0.5%). LQOFG-2 showed statistically significant results in late-apoptosis (AV⁺, PI⁺) at all tested concentrations. For LQOFG-6, early- and late-apoptosis ($P < 0.0001$) were statistically significant at 4 $\times$ the EC₅₀. LQOFG-7 treatment produced statistically significant cell death ($P < 0.05$ to $P < 0.0001$) at all tested concentrations (Figure 5). Only AmB at 4 $\times$ the EC₅₀ showed a significant difference in the necrotic profile (AV⁻, PI⁺) compared to the control. AmB showed a percentage of late-apoptosis of $57.50 \pm 1.72\%$ at 1 $\times$ the EC₅₀ concentration and 97.87 ± 1.01 at 4 $\times$ the EC₅₀.

Table 3. Percentage of cell death by apoptosis/necrosis of *L. infantum* axenic amastigotes treated with LQOFG-2, LQOFG-6, LQOFG-7, or AmB for 24 h

	% Cells (amastigote)		
	Early apoptosis (AV+, PI-)	Late Apoptosis (AV+, PI+)	Necrosis (AV-, PI+)
Cells	1.99 ± 0.29	12.63 ± 0.68	15.57 ± 0.33
DMSO 0.5%	3.99 ± 0.48	19.20 ± 0.55	13.00 ± 2.26
LQOFG-2 0.5x EC₅₀	5.68 ± 0.29 ^a	31.43 ± 0.03 ^b	13.20 ± 1.62
LQOFG-2 1x EC₅₀	8.13 ± 0.84 ^d	33.23 ± 0.73 ^c	11.97 ± 0.66
LQOFG-2 2x EC₅₀	7.68 ± 0.39 ^d	56.27 ± 1.51 ^d	15.93 ± 1.02
LQOFG-2 4x EC₅₀	7.55 ± 1.18 ^d	67.50 ± 2.05 ^d	13.80 ± 1.47
LQOFG-6 0.5x EC₅₀	3.62 ± 0.39	17.10 ± 0.80	13.20 ± 1.62
LQOFG-6 1x EC₅₀	4.05 ± 0.22	20.00 ± 1.74	6.57 ± 1.20
LQOFG-6 2x EC₅₀	5.72 ± 0.20 ^a	25.50 ± 0.80	7.15 ± 0.21
LQOFG-6 4x EC₅₀	9.06 ± 0.70 ^d	45.47 ± 1.30 ^d	8.14 ± 0.78
LQOFG-7 0.5x EC₅₀	5.56 ± 0.46 ^a	35.53 ± 3.13 ^c	9.83 ± 1.27
LQOFG-7 1x EC₅₀	5.84 ± 0.57 ^b	44.20 ± 1.01 ^d	13.53 ± 0.32
LQOFG-7 2x EC₅₀	10.02 ± 1.53 ^d	36.70 ± 10.35 ^d	5.63 ± 1.24
LQOFG-7 4x EC₅₀	8.01 ± 0.14 ^d	63.27 ± 0.59 ^d	12.27 ± 0.48
Amphotericin B 1x EC₅₀	4.73 ± 0.97	57.50 ± 1.72 ^d	11.52 ± 1.89
Amphotericin B 4x EC₅₀	0.60 ± 0.42	97.87 ± 1.01 ^d	0.96 ± 0.33 ^d

Percentage of cell death by apoptosis/necrosis of axenic amastigote forms ± SEM from three independent experiments in triplicate. ^a $P < 0.05$ vs. untreated control, ^b $P < 0.01$ vs. untreated control, ^c $P < 0.001$ vs. untreated control, ^d $P < 0.0001$ vs. untreated control, by Analysis of Variance (ANOVA) with the post hoc Tukey test, compared with the untreated control.

As LQOFG-7 was the most active compound based on its anti-Leishmanial activity, low toxicity in human PBMCs, and ability to induce death by apoptosis in *L. infantum* amastigotes, we selected this compound to investigate whether guanidine-containing compounds can affect infectivity and production of reactive nitrogen species.

297 To determine the infection rate after 24 h, we treated PBMCs with LQOFG-7 and the controls.
298 There were no significant differences in infectivity rates between the untreated control cells and
299 infected cells treated with LQOFG-7, AmB, or LQOFG-7 + AmB.

300 We also investigated whether LQOFG-7 can increase reactive nitrogen species production in
301 human monocytes. A significant increase in nitrite production can be seen in monocytes treated with
302 LQOFG-7 ($10.5 \pm 3.58 \mu\text{M}$) compared with the untreated control group ($3.81 \pm 1.36 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$).
303 There was no significant difference between the LPS-treated cells and LQOFG-7 treatment under both
304 conditions. This assay found that the guanidine derivative LQOFG-7 induces nitrite production in
305 PBMCs.

306 Little additional nitrite was produced by monocytes infected with *L. infantum* ($0.367 \pm 1.48 \mu\text{M}$)
307 (Figure 6). LPS-activated monocytes produced nitrite at a concentration of $8.67 \pm 1.23 \mu\text{M}$. LQOFG-
308 7 treatment significantly increased nitrite production ($13.5 \pm 1.30 \mu\text{M}$) in inactivated monocytes ($P <$
309 0.05). There was a decrease in nitrite production ($2.43 \pm 1.36 \mu\text{M}$) in LPS-activated-infected monocytes
310 treated with LQOFG-7 compared to uninfected monocytes. Statistical data analysis showed no
311 differences in nitrite production between infected monocytes treated with LQOFG-7 and the LPS
312 control.

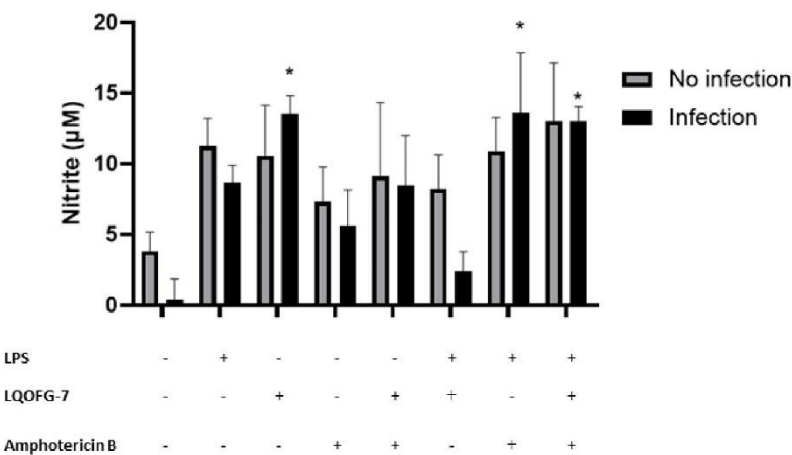


Fig. 6. Nitrite levels produced by monocytes infected with *L. infantum* treated with LQOFG-7, AmB, or LPS. The Griess reaction measured nitrite levels from supernatants collected from the *L. infantum* monocyte infection rate assay in PBMCs. Cells were either infected or not infected. * $P < 0.05$. The graph represents the mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was performed to compare groups with the respective untreated controls.

We also evaluated the effect of AmB treatment (EC_{50}) on nitrite production. There was no significant increase in nitrite production in infected monocytes treated with AmB. However, LPS-activated monocytes exhibited a significant increase in nitrite production ($13.6 \pm 4.25 \mu\text{M}$) ($p < 0.05$) compared to untreated infected cells ($0.367 \pm 1.48 \mu\text{M}$). In addition, we evaluated whether there is a combination effect between AmB and LQOFG-7 treatment. We found an increase in nitrite production ($p < 0.05$; $13.0 \pm 1.04 \mu\text{M}$) in the LPS-activated monocytes.

4. DISCUSSION

Previous studies on the anti-Leishmanial activity of guanidine derivatives have yielded favorable results (Berlinck et al., 2017; Kim et al., 2021b). Of the guanidine compounds, LQOFG-2 reduced promastigote cell viability in the MTT assay the most. Previous reports indicated that LQOFG-2 (-Br)

328 and LQOFG-7 (-I) had better anti-Leishmanial activity against *Leishmania amazonensis*(RD et al.,
329 2019). The anti-promastigote data (IC₅₀ data, Table 1) suggested that the substituent -Br may contribute
330 to this action. Previous research has shown that halogen substituents, such as -Cl and -Br, show
331 promising effects in this area (Dantas et al., 2018). The compounds we studied did not show toxicity
332 to human red blood cells and should be the focus of future preclinical studies. AmB showed
333 cytotoxicity in healthy human donor red blood cells at $7.10 \pm 2.09 \mu\text{M}$. This drug is used to treat
334 leishmaniasis and has limitations, such as nephrotoxicity and other adverse effects, warranting the
335 development of new medicines against leishmaniasis(Brajtburg et al., 1985; Jain and Jain, 2018b).

336 Guanidine-bearing compounds are more toxic to the amastigotes rather than the promastigotes.
337 The LQOFG-7 derivative presented a better cytotoxic activity profile at micromolar values (18.6 μM)
338 with PBMC safety. However, the cytotoxic activities of the three compounds against amastigotes were
339 similar. Their substituents, halogens and a *t*-butyl group (Figure 1), favor cytotoxic activity with
340 positive lipophilic effects (Craig, 1971).

341 In the present study, the guanidine compounds had low toxicity to human PBMC with high
342 selectivity indices for LQOFG-6 and LQOFG-7. AmB was more cytotoxic to red blood cells and
343 PBMCs but had a higher selectivity index owing to its low EC₅₀ value. However, previous research on
344 anti-Leishmanial drugs on primary human immune cells reported that 20 μM AmB induced cell death
345 by mitochondrial membrane depolarization, indicated by phosphatidylserine exposure (André et al.,
346 2020).

347 Significant changes occur in the plasma membrane during cell death. Phosphatidylserine (PS)
348 externalization is one of the main changes in the plasma membrane during apoptosis because cells
349 identify PS as a marker for needed phagocytosis. (El-Hani et al., 2012; Karampetsou et al., 2021;
350 Menna-Barreto, 2019). In early apoptosis, the plasma membrane integrity excludes PI; therefore,
351 annexin V staining is a marker of early apoptosis. PS exposure is a good marker for apoptosis.

352 However, because *Leishmania* spp. use apoptotic mimicry to invade phagocytic cells; studying cell
 353 death mechanisms in pathogenic organisms is essential. In amastigotes, apoptotic mimicry is the ability
 354 to expose PS without death; this ability is critical as exposed PS plays a role in phagocytosis cell
 355 recognition and engulfment, which has been observed *in vivo* (Jiménez-Ruiz et al., 2010; Karampetsou
 356 et al., 2021). Through this process, parasites, especially amastigotes, inhibit host macrophage pro-
 357 inflammatory responses and induce anti-inflammatory cytokines to allow for parasite proliferation and
 358 disease progression (El-Hani et al., 2012; Scariot et al., 2019; Wanderley et al., 2006). In contrast to
 359 the *in vivo* data, our *in vitro* data demonstrated that the guanidine compounds induce cell death by
 360 apoptosis in amastigote-like forms of *L. infantum*.

361 Different toxicity outcomes are possible in other protozoan life stages, with an increase, decrease,
 362 or even loss of harmful activity. For example, Martins et al. (Martins et al., 2016) studied the *in vitro*
 363 antiparasitic activity of synthetic analogs of guanidine alkaloids from a marine sponge against *L.*
 364 *infantum* and *T. cruzi*. They reported that some compounds had the highest selectivity index for the
 365 amastigote forms of *L. infantum*. Our results showed no statistically significant effect of guanidine
 366 derivatives on cell death in promastigotes. In contrast, AmB demonstrated an apparent apoptotic
 367 impact similar to that observed in previous studies (Mendonça et al., 2019; Shadab et al., 2017).
 368 However, LQOFG-2 and LQOFG-6 treatment resulted in a gradual increase in late-apoptotic axenic
 369 amastigotes cells. These results indicate that increasing drug concentrations significantly affect
 370 parasites (Table 3; Figure 3).

371 AmB induced significant levels of necrosis in all the assays; of note, the main target of AmB is the
 372 cell membrane sterol ergosterol, which results in the loss of cell barrier protection (Basmaciyan and
 373 Casanova, 2019; Brajtburg and Bolard, 1996). Guanidine compounds induced early apoptosis (AV+,
 374 PI-) in amastigote forms at similar levels to vehicle control. *L. infantum* axenic amastigotes cell death
 375 was induced by the guanidine compounds. There have been no studies on how guanidine compounds
 376 induce apoptosis in cells. However, other researchers have reported that guanidine analogs affect

377 mitochondrial membrane potential depolarization and increase the levels of reactive oxygen species
378 and the plasma membrane permeability in *Leishmania* parasites (Martins et al., 2016).

379 To investigate the possible immunomodulatory mechanisms by LQOFG-7, nitrite production was
380 evaluated in human PBMCs following infection with *L. infantum*. Reactive nitrogen species levels are
381 essential as these species control pathogen infection, mainly intracellular amastigotes in leishmaniasis.
382 Nitric oxide synthase (NOS) expression and NO production are characteristic of immune cell
383 responses; in particular, innate immune cells are essential sources of NO, mainly in dendritic cells and
384 monocytes/macrophages, but also in natural killer cells, eosinophils, mast cells, and neutrophils (Ibiza
385 and Serrador, 2008; Thwe and Amiel, 2018).

386 In our study (Figure 6), *L. infantum* infection in monocytes decreased nitrite production in the
387 absence of treatment, which is consistent with previous reports (Wanderley et al., 2006). Previous
388 researchers studied PBMCs from patients with visceral leishmaniasis and reported reduced NO
389 production and higher expression of IL-10 and TGF- β (Kupani et al., 2020). These cytokines have
390 been noted to be involved in how *Leishmania* evades host macrophages.

391 After treating infected monocytes with LQOFG-7 at the EC₅₀ value, NO production was
392 significantly increased. Adding LPS stimulus with LQOFG-7 treatment did not affect nitrite
393 production. We also observed a slight increase in NO production in uninfected monocytes after
394 treatment with LQOFG-7. Thus, LQOFG-7 modulates the immune response in PBMCs of healthy
395 individuals. No studies have reported this activity of guanidine-containing compounds in
396 leishmaniasis. However, we suggest a possible mechanism of action for this compound. Combining
397 chemo- and immunotherapy is one strategy that may be beneficial for intracellular infections, such as
398 leishmaniasis. (Akbari et al., 2021). In addition to its well-established role as an anti-microbial effector
399 mechanism, NO, produced by inducible NO synthase (iNOS), provides critical immunomodulatory
400 feedback (Formaglio et al., 2021). NO is a crucial inter- and intracellular messenger molecule that

401 maintains vascular tone, neuronal signaling, and the host response to infection(Mansuy and Boucher,
402 2004).

403 In VL infection, the phagosome membrane is an additional barrier to prevent drugs from entering
404 macrophages. Amastigotes residing in phagosomes also interfere with host defense mechanisms by
405 inhibiting macrophage iNOS as part of its survival strategy(Pandya et al., 2016). Cytokines, such as
406 IFN- γ , induce macrophages to produce NO, which can eliminate these intracellular amastigotes. A
407 group evaluated the expression of TLR2 and TLR4 receptors with cytokine and NO production in the
408 PBMCs of patients with VL before and after treatment with meglumine antimoniate and AmB. They
409 found that non-stimulated cells produced significantly lower NO levels than the cells post-treatment,
410 indicating lower levels of phagocyte-residing parasites(Gatto et al., 2015). LPS stimulation increased
411 NO levels compared to unstimulated cells in pre- and post-treatment patients and control individuals.
412 Here, we found that nitrite production increased in infected cells after treatment with AmB, LPS-
413 stimulation, and LPS + LQOFG-7 ($P < 0.05$) (Figure 6).

414 Considering the present limits in treating leishmaniasis, several studies have sought to find
415 immunological strategies to prevent and treat leishmaniasis. In one attempt, immunotherapy alone or
416 with chemotherapy was developed to treat leishmaniasis infection and avoid the side effects of
417 conventional treatment regimens. Immunotherapy aims to accelerate the patient's targeted and specific
418 response to the parasite, and this treatment results in effective reactions in patients without using
419 conventional drugs (Akbari et al., 2021).

420 In conclusion, visceral leishmaniasis is a neglected tropical disease, and the current treatments have
421 severe adverse effects. Furthermore, new, effective, and accessible therapies are limited. In the present
422 study, we demonstrated that the guanidine-bearing compound, LQOFG-7, had the best activity profile
423 against *L. infantum*, featuring a good selectivity index and low cytotoxicity in PBMCs, and is capable
424 of inducing apoptosis in amastigotes. In addition, LQOFG-7 appears to modulate the immune response

425 with a cellular activation profile through reactive nitrogen species. However, further studies are
 426 required to characterize LQOFG-7 in an environment with an effector or immunological response to
 427 better determine its response against *L. infantum*.

428

429 **Funding**

430 We thank the support of Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ)/CAPES for
 431 fellowship of Fernanda Almeida [grant number 23038.004264/2015-03].

432 **Transparency declarations**

433 On behalf of all the authors, the corresponding author states that there are no conflicts of interest.

434 **Acknowledgments**

435 We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

436 **References**

- 437 Akbari, M., Oryan, A., Hatam, G., 2021. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Immunol Lett*
 438 233, 80–86. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2021.03.011>
- 439 Barrett, M.P., Kyle, D.E., Sibley, L.D., Radke, J.B., Tarleton, R.L., 2019. Protozoan persister-like cells
 440 and drug treatment failure. *Nat Rev Microbiol* 17, 607–620. [https://doi.org/10.1038/s41579-019-](https://doi.org/10.1038/s41579-019-0238-x)
 441 0238-x
- 442 Bartosh, T., Ylostalo, J., 2014. Macrophage Inflammatory Assay. *Bio Protoc* 4.
 443 <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.1180>
- 444 Basmaciyan, L., Casanova, M., 2019. Cell death in Leishmania. *Parasite* 26, 71.
 445 <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>

- 446 Baugh, S.D.P., Chaly, A., Weaver, D.G., Pelletier, J.C., Thanna, S., Freeman, K.B., Reitz, A.B., Scott,
447 R.W., 2021. Highly potent, broadly active antifungal agents for the treatment of invasive fungal
448 infections. *Bioorg Med Chem Lett* 33, 127727. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127727>
- 449 Berlinck, R.G.S., Bertonha, A.F., Takaki, M., Rodriguez, J.P.G., 2017. The chemistry and biology of
450 guanidine natural products. *Nat Prod Rep* 34, 1264–1301. <https://doi.org/10.1039/c7np00037c>
- 451 Brajtburg, J., Bolard, J., 1996. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. *Clin Microbiol*
452 *Rev* 9, 512–531.
- 453 Brajtburg, J., Elberg, S., Schwartz, D.R., Vertut-Croquin, A., Schlessinger, D., Kobayashi, G.S., Medoff,
454 G., 1985. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B.
455 *Antimicrob Agents Chemother* 27, 172. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.2.172>
- 456 Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *The Lancet* 392, 951–970.
457 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- 458 Craig, P.N., 1971. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for
459 correlation studies. *J Med Chem* 14, 680–684. <https://doi.org/10.1021/JM00290A004>
- 460 da Câmara Rocha, Juliana, da Franca Rodrigues, K.A., do Nascimento Nêris, P.L., da Silva, L.V.,
461 Almeida, F.S., Lima, V.S., Peixoto, R.F., da Câmara Rocha, Juliene, de Azevedo, F. de L.A.A.,
462 Veras, R.C., de Medeiros, I.A., da Silva, W.A.V., Lima-Junior, C.G., de Almeida Vasconcellos,
463 M.L.A., do Amaral, I.P.G., de Oliveira, M.R., de Souza Lima Keesen, T., 2019. Biological activity
464 of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania
465 activity and cytotoxicity. *Parasitol Res* 118, 3067–3076. [https://doi.org/10.1007/s00436-019-](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06403-w)
466 06403-w
- 467 Dantas, N., de Aquino, T.M., de Araújo-Júnior, J.X., da Silva-Júnior, E., Gomes, E.A., Gomes, A.A.S.,
468 Siqueira-Júnior, J.P., Mendonça Junior, F.J.B., 2018. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as
469 modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump.
470 *Chem Biol Interact* 280, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.12.009>

- 471 Debrabant, A., Joshi, M.B., Pimenta, P.F.P., Dwyer, D.M., 2004. Generation of *Leishmania donovani*
 472 axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *Int J Parasitol* 34, 205–217.
 473 <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2003.10.011>
- 474 do Espírito Santo, R.D., Velásquez, Á.M.A., Passianoto, L.V.G., Sepulveda, A.A.L., da Costa
 475 Clementino, L., Assis, R.P., Baviera, A.M., Kalaba, P., dos Santos, F.N., Éberlin, M.N., da Silva,
 476 G.V.J., Zehl, M., Lubec, G., Graminha, M.A.S., González, E.R.P., 2019. N, N' N"-trisubstituted
 477 guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. *Eur J Med*
 478 *Chem* 171, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.032>
- 479 El-Hani, C.N., Borges, V.M., Wanderley, J.L.M., Barcinski, M.A., 2012. Apoptosis and apoptotic
 480 mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 2, 96.
 481 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00096>
- 482 Formaglio, P., Alabdullah, M., Siokis, A., Handschuh, J., Sauerland, I., Fu, Y., Krone, A., Gintschel, P.,
 483 Stettin, J., Heyde, S., Mohr, J., Philipsen, L., Schröder, A., Robert, P.A., Zhao, G., Khailaie, S.,
 484 Dudeck, A., Bertrand, J., Späth, G.F., Kahlfuß, S., Bousso, P., Schraven, B., Huehn, J., Binder, S.,
 485 Meyer-Hermann, M., Müller, A.J., 2021. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major*
 486 by inhibiting the recruitment of permissive host cells. *Immunity* 54, 2724–2739.e10.
 487 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.021>
- 488 Gatto, M., de Abreu, M.M., Tasca, K.I., de Golim, M.A., da Silva, L.D.M., Simão, J.C., Fortaleza,
 489 C.M.C.B., de Soares, É.M.V.C., Calvi, S.A., 2015. The Involvement of TLR2 and TLR4 in
 490 Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after
 491 Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. *PLoS One* 10, e0117977.
 492 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117977>
- 493 Ibiza, S., Serrador, J.M., 2008. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses
 494 27, 103–117. [https://doi.org/10.1016/S0213-9626\(08\)70058-1](https://doi.org/10.1016/S0213-9626(08)70058-1)
- 495 Jain, K., Verma, A.K., Mishra, P.R., Jain, N.K., 2015. Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates
 496 for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development and in vitro and in

- 497 vivo evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2479–2487.
 498 <https://doi.org/10.1128/AAC.04213-14>
- 499 Jain, V., Jain, K., 2018a. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis.
 500 *Drug Discov Today* 23, 161–170. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.09.006>
- 501 Jain, V., Jain, K., 2018b. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis.
 502 *Drug Discov Today* 23, 161–170. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.09.006>
- 503 Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J.F., MacLeod, E.T., Lüder, C.G.K., Fasel, N., Hurd, H., 2010. Apoptotic
 504 markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 3, 1–15. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-](https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-104)
 505 104/COMMENTS
- 506 Karampetsou, K., Koutsoni, O.S., Gogou, G., Angelis, A., Skaltsounis, L.A., Dotsika, E., 2021. Total
 507 phenolic fraction (TPF) from extra virgin olive oil: Induction of apoptotic-like cell death in
 508 leishmania spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation. *PLoS Negl*
 509 *Trop Dis* 15, 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008968>
- 510 Kim, S.H., Semenya, D., Castagnolo, D., 2021a. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A
 511 review. *Eur J Med Chem* 216, 113293. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113293>
- 512 Kim, S.H., Semenya, D., Castagnolo, D., 2021b. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A
 513 review. *Eur J Med Chem* 216, 113293. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113293>
- 514 Lamotte, S., Späth, G.F., Rachidi, N., Prina, E., 2017. The enemy within: Targeting host–parasite
 515 interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005480.
 516 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005480>
- 517 Lapara, N.J., Kelly, B.L., 2010. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages
 518 infected with *Leishmania*. *J Inflamm (Lond)* 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-8>
- 519 Leishmaniasis [WWW Document], n.d. URL [https://www.who.int/health-](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)
 520 [topics/leishmaniasis#tab=tab_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1) (accessed 4.15.21).

- 521 Liu, X., Wang, X., Li, Q., Kozar, M.P., Melendez, V., O Neil, M.T., Lin, A.J., 2011. Synthesis and
522 antimalarial activity of 2-guanidino-4-oxoimidazoline derivatives. *J Med Chem* 54, 4523–4535.
523 https://doi.org/10.1021/JM200111G/SUPPL_FILE/JM200111G_SI_001.PDF
- 524 Magalhães, L.M.D., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L.M.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O., 2015. Differential
525 Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*.
526 *PLoS Negl Trop Dis* 9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003816>
- 527 Manetti, F., Castagnolo, D., Raffi, F., Zizzari, A.T., Rajamaki, S., D'Arezzo, S., Visca, P., Cona, A.,
528 Fracasso, M.E., Doria, D., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Fadda, G., Botta, M., 2009. Synthesis of
529 new linear guanidines and macrocyclic amidinourca derivatives endowed with high antifungal
530 activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. *J Med Chem* 52, 7376–7379.
531 <https://doi.org/10.1021/JM900760K>
- 532 Mansuy, D., Boucher, J.L., 2004. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free*
533 *Radic Biol Med* 37, 1105–1121. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.06.031>
- 534 Martins, L.F., Mesquita, J.T., Pinto, E.G., Costa-Silva, T.A., Borborema, S.E.T., Galisteo Junior, A.J.,
535 Neves, B.J., Andrade, C.H., Shuhaib, Z. al, Bennett, E.L., Black, G.P., Harper, P.M., Evans, D.M.,
536 Fituri, H.S., Leyland, J.P., Martin, C., Roberts, T.D., Thornhill, A.J., Vale, S.A., Howard-Jones, A.,
537 Thomas, D.A., Williams, H.L., Overman, L.E., Berlinck, R.G.S., Murphy, P.J., Tempone, A.G.,
538 2016. Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi*
539 and Selectively Eliminate *Leishmania* (L.) *infantum* Intracellular Amastigotes. *J Nat Prod* 79,
540 2202–2210. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00256>
- 541 Mendonça, D.B.D., Silva, R.E.C., Palace-Berl, F., Takakura, C.F.H., Soares, S.R.C., Braz, L.M.A.,
542 Tavares, L.C., Lindoso, J.A.L., 2019. Nitro-Heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects
543 in *Leishmania* (L.) *amazonensis* promastigotes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 25.
544 <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1444-18>
- 545 Menna-Barreto, R.F.S., 2019. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill.
546 *Cell Death & Disease* 2019 10:2 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>

- 547 Ngermna, S., Chim-Ong, A., Roobsoong, W., Sattabongkot, J., Cui, L., Nguitragool, W., 2019. Efficient
548 synchronization of *Plasmodium knowlesi* in vitro cultures using guanidine hydrochloride. *Malar J*
549 18, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2783-1>
- 550 Pace, D., 2014. Leishmaniasis. *Journal of Infection* 69, S10–S18.
551 <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2014.07.016>
- 552 Pandya, S., Verma, R.K., Khare, P., Tiwari, B., Srinivasarao, D.A., Dube, A., Goyal, N., Misra, A.,
553 2016. Supplementation of host response by targeting nitric oxide to the macrophage cytosol is
554 efficacious in the hamster model of visceral leishmaniasis and adds to efficacy of amphotericin B.
555 *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 6, 125–132. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2016.01.001>
- 556 Pasero, C., D'Agostino, I., de Luca, F., Zamperini, C., Deodato, D., Truglio, G.I., Sannio, F., del Prete,
557 R., Ferraro, T., Visaggio, D., Mancini, A., Guglielmi, M.B., Visca, P., Docquier, J.D., Botta, M.,
558 2018. Alkyl-guanidine Compounds as Potent Broad-Spectrum Antibacterial Agents: Chemical
559 Library Extension and Biological Characterization. *J Med Chem* 61, 9162–9176.
560 <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00619>
- 561 RD, do E.S., ÁMA, V., LVG, P., AAL, S., L, da C.C., RP, A., AM, B., P, K., FN, D.S., MN, É., GVJ, da
562 S., M, Z., G, L., MAS, G., ERP, G., 2019. N, N', N''-trisubstituted guanidines: Synthesis,
563 characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. *Eur J Med Chem* 171, 116–128.
564 <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.03.032>
- 565 Reid, C.M., Ebikeme, C., Barrett, M.P., Patzewitz, E.M., Müller, S., Robins, D.J., Sutherland, A., 2008.
566 Synthesis of novel benzamidine- and guanidine-derived polyazamacrocycles: Selective anti-
567 protozoal activity for human African trypanosomiasis. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 5399–5401.
568 <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.047>
- 569 Reza, S., Hasan, N.A., Maryam, N.F., Fahimeh, B.J., Ghahremani, A., GholamReza, H., Amin, G.M.,
570 2019. Cytokine profile and nitric oxide levels in macrophages exposed to *Leishmania infantum*
571 FML. *Exp Parasitol* 203, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.004>

- 572 Rodrigues, K.A.D.F., Amorim, L.V., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.D.A.,
 573 2015. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-
 574 *Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol* 160, 32–40.
 575 <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2014.11.024>
- 576 Scariot, D.B., Volpato, H., de Souza Fernandes, N., Soares, E.F.P., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho,
 577 B.P., Din, Z.U., Rodrigues-Filho, E., Rubira, A.F., Borges, O., Sousa, M.D.C., Nakamura, C.V.,
 578 2019. Activity and cell-death pathway in *leishmania infantum* induced by sugiol: Vectorization
 579 using yeast cell wall particles obtained from *saccharomyces cerevisiae*. *Front Cell Infect Microbiol*
 580 9, 208. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00208/FULL>
- 581 Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., Weber, V., 2013. Monocytes, peripheral
 582 blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following
 583 stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013.
 584 <https://doi.org/10.1155/2013/697972>
- 585 Shadab, M., Jha, B., Asad, M., Deepthi, M., Kamran, M., Ali, N., 2017. Apoptosis-like cell death in
 586 *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLoS One* 12,
 587 e0171306. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0171306>
- 588 Thwe, P.M., Amiel, E., 2018. The role of nitric oxide in metabolic regulation of Dendritic cell immune
 589 function. *Cancer Lett* 412, 236–242. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.10.032>
- 590 van Griensven, J., Diro, E., 2019. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and
 591 Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am* 33, 79–99.
 592 <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- 593 van Griensven, J., Diro, E., 2012. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26, 309–322.
 594 <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2012.03.005>
- 595 Viana, A.G., Magalhães, L.M.D., Giunchetti, R.C., Dutra, W.O., Gollob, K.J., 2018. Infection of human
 596 monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared

597 with infection with *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol* 8, 1–12.
598 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01896>

599 Vieira, É.L.M., Keesen, T.S.L., Machado, P.R., Guimarães, L.H., Carvalho, E.M., Dutra, W.O., Gollob,
600 K.J., 2013. Immunoregulatory Profile of Monocytes from Cutaneous Leishmaniasis Patients and
601 Association with Lesion Size. *Parasite Immunol* 35, 65. <https://doi.org/10.1111/PIM.12012>

602 Wanderley, J.L.M., Moreira, M.E.C., Benjamin, A., Bonomo, A.C., Barcinski, M.A., 2006. Mimicry of
603 Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes
604 of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. *The Journal of Immunology* 176, 1834–
605 1839. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.3.1834>

606

607

608

609

Figure 1

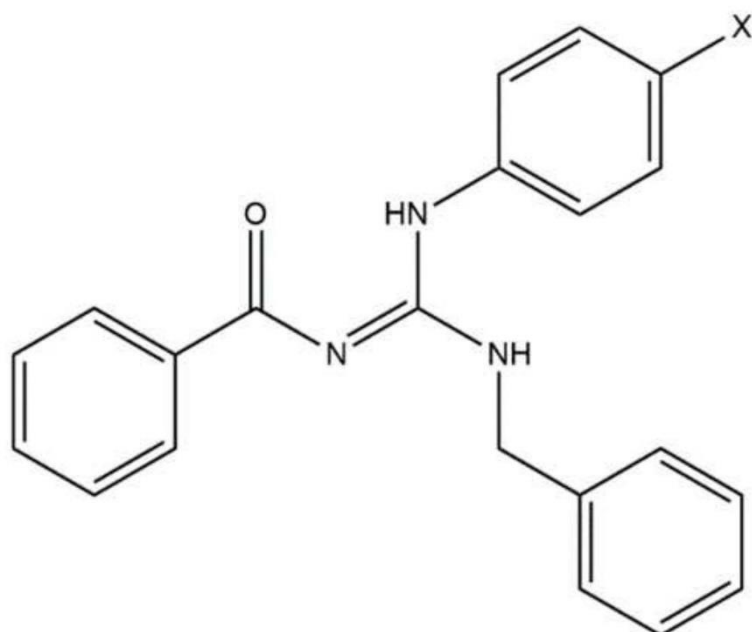
[Click here to access/download;Figure;figure 1.tif](#) ✖**LQOFG-2.** X= Br**LQOFG-6.** X= *t*-bu**LQOFG-7.** X= I

Figure 2

[Click here to access/download;Figure;figure-2.tiff](#) *

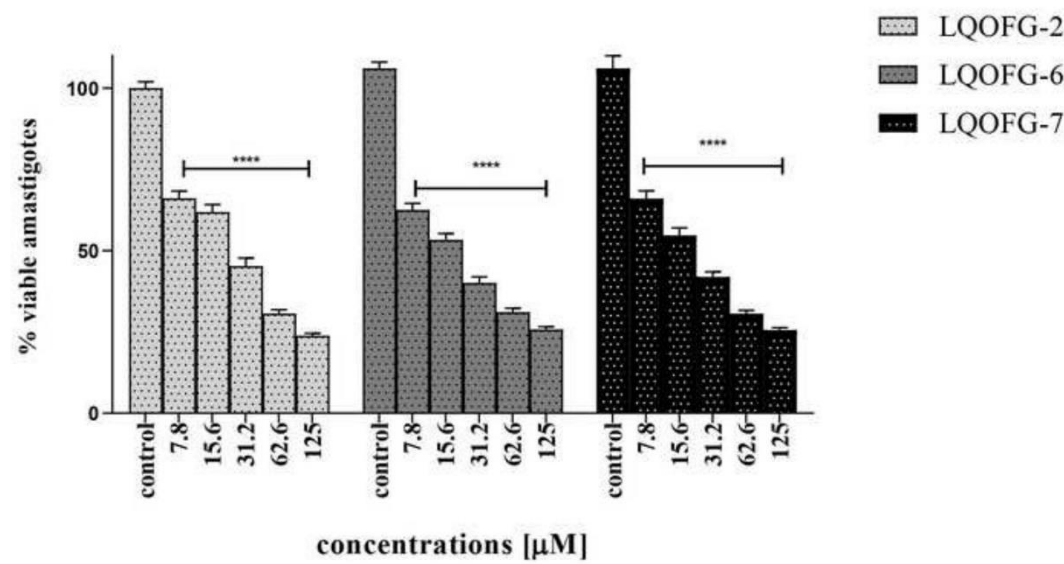


Figure 3

[Click here to access/download;Figure;figure 3.tif](#)

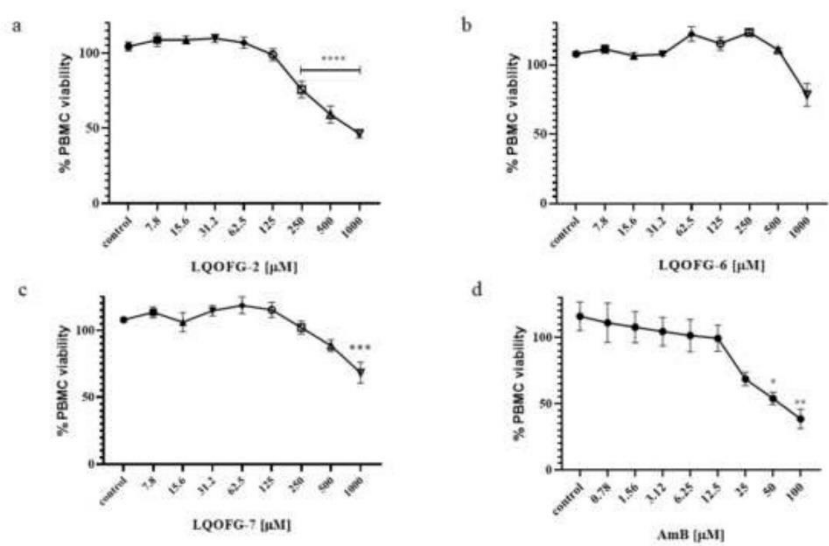


Figure 4

[Click here to access/download;Figure;Figure 4.tif](#)

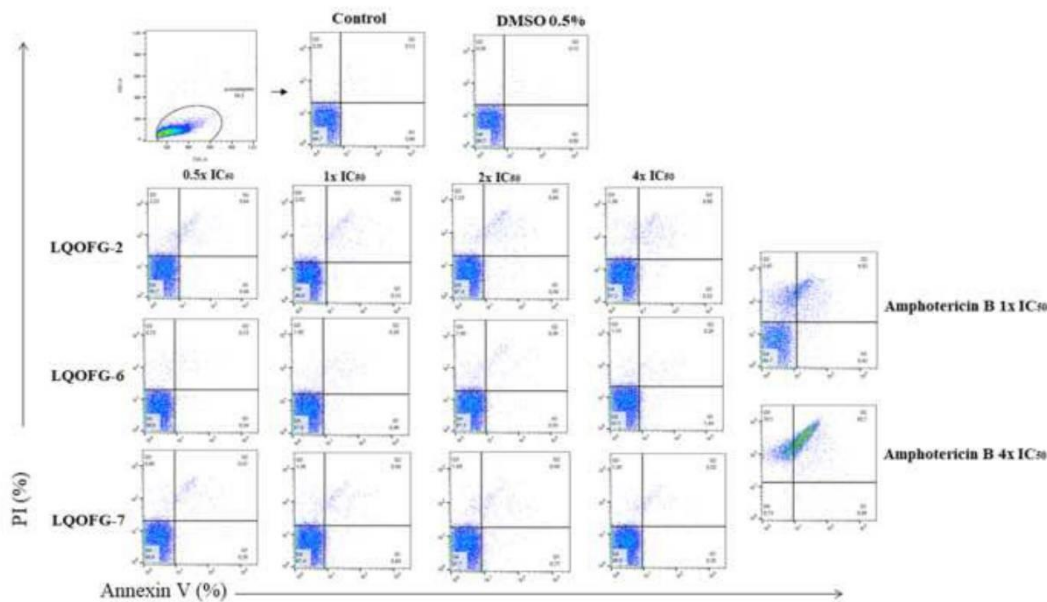


Figure 5

[Click here to access/download;Figure;figure 5.tif](#)

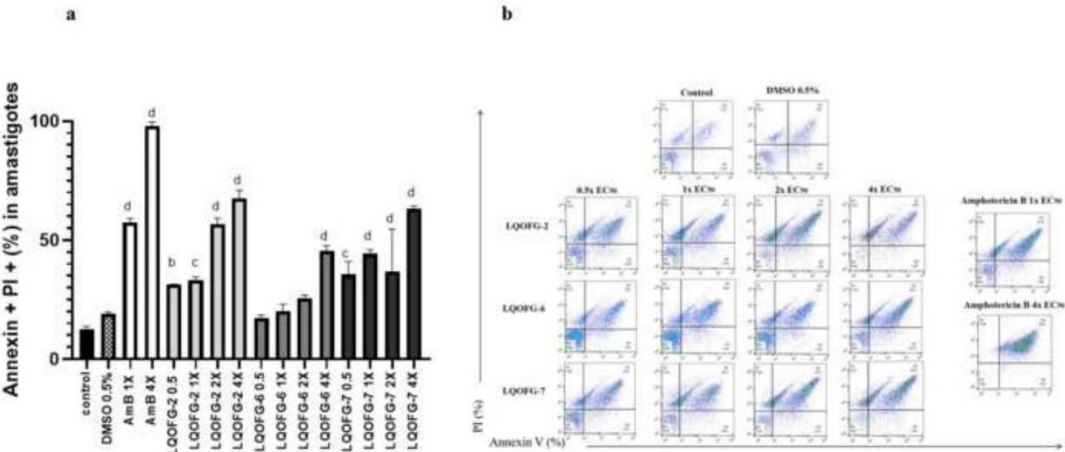
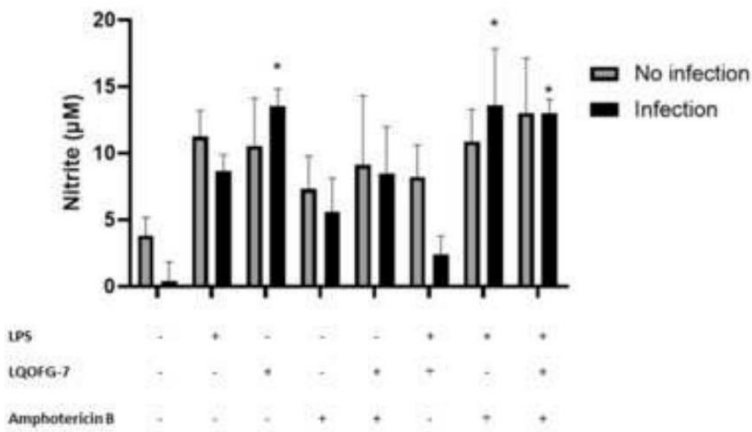


Figure 6

[Click here to access/download;Figure;figure 6.tif](#) 



1 **Leishmanicidal activity of guanidine derivatives against *Leishmania infantum*¹**

2 Fernanda Silva Almeida^{a,b}, Vitor Partite Moreira^c, Edson dos Santos Silva^a, Leonardo
3 Lima Cardoso^a, Pedro Henrique de Sousa Palmeira^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante-
4 Silva^a, Demetrius A.M. Araújo^d, Ian P. G. do Amaral^c, Eduardo René Pérez González^c,
5 Tatjana S. L. Keesen^{a*}.

6 *^aImmunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular
7 Biology; Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900.*

8 *^bBiotechnology Doctoral Program, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade
9 Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-900, Brazil.*

10 *^cSão Paulo State University (UNESP), School of Sciences and Technology, Department
11 of Chemistry and Biochemistry, Fine Organic Chemistry Lab, 19060-080, Presidente
12 Prudente, São Paulo, Brazil.*

13 *^dBiotechnology Department, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 58051-
14 900, Brazil.*

15 *^eLaboratory of Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Biology; Federal
16 University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 58051-900*

¹ Abbreviations: cutaneous leishmaniasis (CL); visceral leishmaniasis (VL); mucocutaneous leishmaniasis (MCL); Amphotericin B (AmB); dimethyl sulfoxide (DMSO); fetal bovine serum (FBS); biological oxygen demand (B.O.D.); phosphate-buffered saline (PBS); peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); propidium iodide (PI); carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE); lipopolysaccharide (LPS); optical density (OD); 50% inhibitory concentration (IC₅₀); 50% effective concentration (EC₅₀); 50% cytotoxic concentration (CC₅₀); 50% hemolytic concentration (HC₅₀)

17 ***Corresponding author:**

18 Tatjana Keesen de Souza Lima. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas,
 19 Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. CEP: 58051-085. +55 (83)
 20 32167371. E-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br

21

22 **Supplementary material**

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45 **Supplementary Table 1.** Percentage of cell death by apoptosis/necrosis of promastigote forms of
 46 *Leishmania infantum* treated with guanidine derivatives and the reference drug amphotericin B for 24h.

% Cells (promastigote)			
	Early apoptosis (AV+, PI-)	Late Apoptosis (AV+, PI+)	Necrosis (AV-, PI+)
Control	0.89 ± 0.15	0.25 ± 0.07	0.71 ± 0.09
DMSO 0.5%	0.62 ± 0.06	0.60 ± 0.08	0.83 ± 0.01

LQOFG-2 0.5x IC₅₀	0.27 ± 0.09	0.55 ± 0.04	1.69 ± 0.28
LQOFG-2 1x IC₅₀	0.12 ± 0.02 ^a	0.41 ± 0.14	2.07 ± 0.23
LQOFG-2 2x IC₅₀	0.35 ± 0.01	0.78 ± 0.15	1.52 ± 0.24
LQOFG-2 4x IC₅₀	0.34 ± 0.09	0.63 ± 0.12	1.79 ± 0.59
LQOFG-6 0.5x IC₅₀	0.65 ± 0.19	0.18 ± 0.01	0.85 ± 0.09
LQOFG-6 1x IC₅₀	0.46 ± 0.13	0.20 ± 0.03	1.47 ± 0.21
LQOFG-6 2x IC₅₀	0.51 ± 0.08	0.32 ± 0.06	1.37 ± 0.22
LQOFG-6 4x IC₅₀	0.91 ± 0.34	0.20 ± 0.03	1.06 ± 0.07
LQOFG-7 0.5x IC₅₀	0.28 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.87 ± 0.17
LQOFG-7 1x IC₅₀	0.77 ± 0.04	0.41 ± 0.08	1.19 ± 0.12
LQOFG-7 2x IC₅₀	0.76 ± 0.10	0.26 ± 0.09	1.37 ± 0.22
LQOFG-7 4x IC₅₀	0.39 ± 0.08	0.18 ± 0.07	1.06 ± 0.07
Amphotericin B 1x IC₅₀	0.67 ± 0.27	4.30 ± 0.28 ^d	7.64 ± 1.17 ^d
Amphotericin B 4x IC₅₀	0.27 ± 0.09	65.83 ± 1.85 ^d	33.10 ± 1.90 ^d

47 Percentage of cell death by apoptosis/necrosis of promastigote forms of ± SEM from three independent
48 experiments in triplicate. ^a $P < 0.05$ vs. untreated control, ^d $P < 0.0001$ vs. untreated control, by Analysis
49 of Variance (ANOVA) with the post hoc Tukey test, compared with the untreated control.

50

51

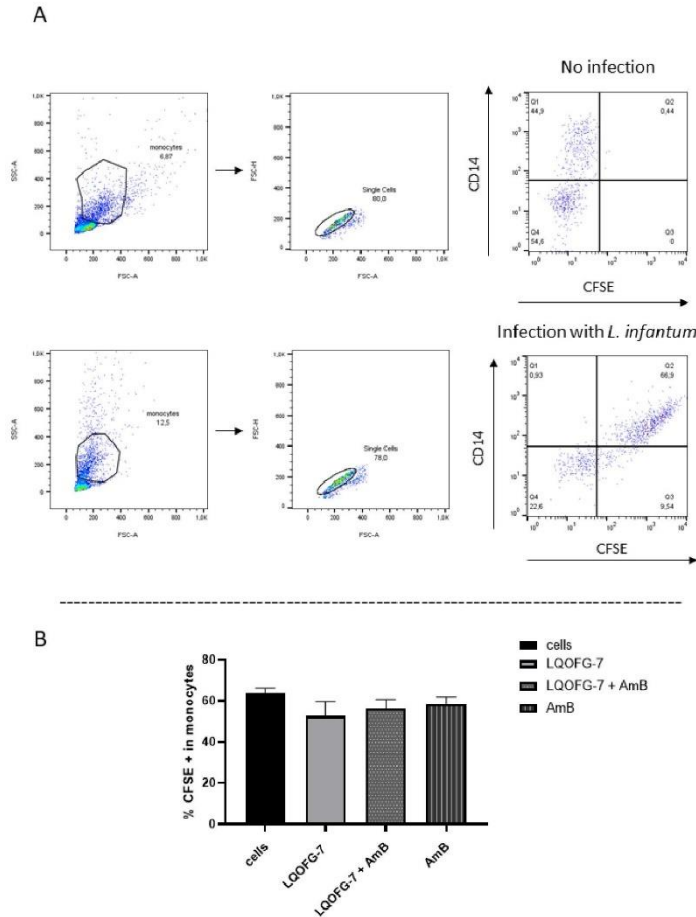
52

53

54

55

56



57

58 **Supplementary figure 1.** Analysis strategy and determination of infection intensity of monocytes derived

59 from human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl

60 ester (CFSE)-labeled *Leishmania infantum*. (A) The PBMC cells were visualized on FSC vs. SSC and a

61 wide gate was performed around the monocyte population, excluding most debris and lymphocytes. The

62 cells were visualized on the FSC-H x FSC-A plot in single cells format. These cells were then visualized

63 on the CD14 (PERCP) vs granularity (SSC) plot by selecting only the monocyte population. Finally, CD14+

64 cells were visualized on the CFSE vs. plot. CD14+, thus identifying monocytes infected by *Leishmania* sp.

65 (B) Represents the frequency (%) of infected monocytes after 24h of treatment with or without the

66 guanidine compound (LQOFG-7) and Amphotericin B (AmB) determined by CFSE+ in monocytes. Results
67 are expressed as mean $\pm$ SEM, using paired one-way analysis of variance test with Tukey correction for
68 multiple comparisons.

69

Conflict of Interest

Declaration of interests

☒ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐ The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

--

APÊNDICE B

Bioorg. Med. Chem. Lett. 49 (2021) 128289



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmclIn vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against *Leishmania infantum*

Fernanda S. Almeida^{a,d}, Gleyton L.S. Sousa^c, Juliana C. Rocha^d, Frederico F. Ribeiro^e, Márcia Rosa de Oliveira^f, Teresa Cristina Soares de Lima Grisi^g, Demetrius A.M. Araújo^h, Michelangela S. de C. Nobreⁱ, Rosane N. Castro^c, Ian P.G. Amaral^b, Tatjana S.L. Keesen^{b,d}, Ricardo Olímpio de Moura^{j,*}

^a Programa de Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil^b Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil^c Programa de Doutorado em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil^d Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil^e Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil^f Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba CEP 58059-900, Brazil^g Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil^h Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazilⁱ Programa de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil^j Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmaniasis
Antileishmanial activity
Acridine compounds
Multitarget agent
Structure activity relationship

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease with several limitations regarding treatment schemes. This work reports the anti-Leishmania activity of spiroacridine compounds against the promastigote ($IC_{50} = 1.1$ to $6.0 \mu\text{g/mL}$) and amastigote forms of the best compounds ($EC_{50} = 4.9$ and $0.9 \mu\text{g/mL}$) in *Leishmania* (L.) *infantum* and proposes an in-silico study with possible selective therapeutic targets for *L. infantum*. The substituted dimethyl-amine compound (AMTAC 11) showed the best leishmanicidal activity *in vitro*, and was found to interact with TryR- and LdTopoI. comparisons with standard inhibitors were performed, and its main interactions were elucidated. Based on the biological assessment and the structure-activity relationship study, the spiroacridine compounds appear to be promising anti-leishmania chemotherapeutic agents to be explored.

Leishmaniasis is a Neglected Tropical Diseases caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. There are around 12 million people infected worldwide and around 350 million of people at risk of being contaminated by this parasites, often occurring mainly in rural areas and in some urban environments of Africa, Asia and Latin America.¹ Visceral leishmaniasis is the most serious and can be fatal in over 95% of cases if untreated; it is characterized by irregular bouts of fever, weight loss, enlargement of the spleen and liver, and anemia.^{1–3}

Pentavalent antimonials (SbV) are the first-choice drugs for therapy, of which meglumine antimoniate (Glucantime®) and sodium stibogluconate (Pentostan®) are often used. However, these medications can cause several side effects and present toxic effects such as high cardiotoxicity and nephrotoxicity.^{4,5} The second line of treatment includes

liposomal amphotericin B. Nevertheless, amphotericin B deoxycholate is very expensive and is often associated with serious adverse effects such as renal tubular damage.^{6–8}

Acridine compounds have drawn attention of researchers because of their chemical and biological diversity. Various acridine derivatives, which have shown a strong anti-proliferative activity in transformed human cells, have been considered promising as antitumor agents and used for antiparasitic therapy.^{9–16} It has been established for many years that the planar structure of tricyclic rings conferred the acridine derivatives the ability to intercalate into DNA and to interfere with various metabolic processes in both prokaryotic and eukaryotic cells.^{15,17–22} However, their mechanisms of action toward protozoa are still poorly understood, rendering necessary the synthesis of new acridine

* Corresponding author at: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil. Tel./Fax: +558333153300.

E-mail address: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.O. de Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128289>

Received 23 March 2021; Received in revised form 13 July 2021; Accepted 20 July 2021

Available online 24 July 2021

0960-894X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

derivatives and the study of their antiparasitic profile.

Currently, research aimed at finding new targets for leishmaniasis is oriented towards rational drug development, where the design of specific inhibitors is directed to specific metabolic activities as possible means of controlling the parasite without damaging the host. Among the most important leishmanicidal targets, we can highlight trypanothione reductase (TryR), which keeps the intracellular redox balance of the parasite,^{23–27} DNA topoisomerases (LdTopoI), participating in the regulation of DNA supercoiling^{12,13,28–31} and enzymes involved in ergosterol biosynthesis, such as 14- α -ester-demethylase (CYP51).^{32–38}

Spiroacridine compounds are little known in the literature and this is the first work to report antileishmanial activity of these compounds. Also, the spiroacridine compounds investigated in this research have already been described by Almeida 2016 and Gouveia 2018, with potential antitumor action and topoisomerase inhibitors, which encouraged us to test them against promastigote and amastigote forms, as well as to understand, through *in silico* study, their possible mechanism of action, with respect to fundamental targets for parasite survival, namely CYP51, TryR and LdTopoI.^{12,31,38}

In search for potential leishmanicidal targets, spiroacridine compounds (Fig. 1 and Table 1) were tested *in vitro* for their activity against the promastigote form of *Leishmania infantum*, which causes the most aggressive form of leishmaniasis in the New World.

AMTAC 01 and AMTAC 11 showed the highest *in vitro* leishmanicidal activity (Table 1). AMTAC 01, which is the base structure for the synthesis of the other compounds with different substituents at different positions on the benzylidene ring, showed a high rate of growth inhibition. This molecule had previously been described as an inhibitor for human topoisomerase II¹², thus becoming a potential agent for the treatment of cancer due to this mechanism.

As for AMTAC 11, it showed the most potent inhibition of growth of all compounds studied ($IC_{50} = 1.109 \mu\text{g/mL}$), being the most promising derivative, followed by AMTAC 01. We can conclude that the addition of the group 4-dimethylamine favored greatly in its activity, possibly due to its electronic donor effect. As for the structural analysis of AMTAC 11, a strong positive mesomeric effect can be suggested for the aromatic ring, as well as a voluminous group, which could favor stronger interactions with different regions of the target molecule, possibly justifying its greater activity.

Applying Craig's Diagram (1971), who presents structural descriptors of hydrophobicity (π) and electronic effects (σ) in the compounds with meta and aromatic *para*-substitution, we can observe that the negative electronic effects, mainly of AMTAC 11 and the lipophilic positive effect ($-\sigma + \pi$), implies in the improvement of the biological activity.³⁹

As for compounds 06, 08 and 10, we can continue to establish the structure-activity relationship (SAR), where the addition in *ortho* ($R^1 = \text{Cl}$; $R^4 = \text{Cl}$) and substitution for *ortho* were observed to potentiate the anti-*Leishmania* activity. The two substitutions in *ortho* (AMTAC 10) with the chlorine atom, can have positive implications, electronic and lipophilic, however the steric effects can influence this response, since in this empirical SAR studies we cannot efficiently predict the effects of *ortho*

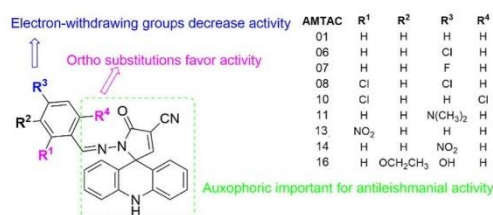


Fig. 1. Chemical structure of AMTACs.

Table 1

Inhibitory concentration of 50% of the growth (IC_{50}) of *L. infantum* promastigotes of spiroacridine derivatives.

Compounds	IC ₅₀ (μg/mL)
AMTAC 01	2.039 ± 0.06
AMTAC 06	5.681 ± 0.56
AMTAC 07	4.109 ± 0.87
AMTAC 08	3.891 ± 0.79
AMTAC 10	2.630 ± 0.20
AMTAC 11	1.109 ± 0.42
AMTAC 13	3.779 ± 0.38
AMTAC 14	5.331 ± 1.47
AMTAC 16	6.058 ± 1.40
Amphotericin B	0.90 ± 0.11

substituents. Thus, hypothesize that the positive mesomeric effect contributes positively to the leishmanicidal activity, also as there are steric effects in the molecule that can influence as the nesting position in the target receptor.

A series of twelve 2- and 3-arylaminoquinoline derivatives as anti-leishmanial agent were evaluated in *Leishmania mexicana* considering principles of medicinal chemistry such as ring transformation or inclusion of suitable groups and the authors concluded that substitution by the introduction of halogen atoms increase potency of those compounds.⁴⁰

Remaining in the same understanding, in the AMTAC 13 and 14 compounds, the *ortho* position change of the nitro group to the *para* position resulted in a decrease of its activity, even being the same substituent with the same electrostatic effects by electron withdrawer nitro group. Compounds that contain strong electron withdrawing nitro group exhibited potent anti-amastigote activity in *L. donovani*.⁴¹

As for the toxicity evaluation in red blood cells, this method observes the action of these substances on the mechanical stability of the erythrocyte plasma membrane. The changes on the membrane, leading to cell death due to modifications of permeability such as the formation of pores or total rupture of the membranes. The evaluation of cytotoxicity in the hemolytic activity of the compounds under study showed that none of the spiroacridine derivatives presented cytotoxicity to human erythrocytes up to the highest concentration studied ($HC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$), which allows us to state that these compounds have very low *in vitro* red blood cell toxicity. The amphotericin B, as a reference drug, had an HC_{50} of $10.72 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$.

From the interesting results in promastigotes for the studied compounds, we proposed to evaluate a possible mechanism of action for this class of compounds. In most cases, anti-leishmania compounds induce parasites death by apoptosis, through one or more biological targets. Even though multi-target mechanisms are very interesting in terms of activity, it requires greater attention in terms of safety.^{42,43}

Leishmania is still a disease with indefinite mechanisms, and the mechanism of anti-leishmania activities reported *in vitro* and / or *in vivo* are rarely elucidated. In this context, bioinformatics strategies can be used to suggest possible targets, and to enhance the development of new biologically active compounds.^{42–47} We used the GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) software Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) to perform the molecular docking of acridine analogues. The screening of possible biological targets for this study was done on the PDB (Protein Data Bank) platform. Targets such as glycosomes, acidocalcisomes, enzymes involved in metabolism, such as TryR and ornithine decarboxylase (ODC), DNA replication and repair mechanisms, translation and intrinsic characteristics of the cell cycle, make up the fronts studied and known for the chemotherapeutics of *Leishmania infantum*.^{26,31,37,47–50} After the initial screening of the mentioned mechanisms, docking studies indicated some possible mechanisms for this class of compounds. The crystallographic data of the targets used in this screening, as well as the methodology used, are found in the complementary material, Tables S1 to S3.

The fitness scores, by the ChemPLP function in GOLD 2020.2, are shown in Table 2. In each study, a score scale provides a guide to how good the pose is, the higher the score, the better the docking with the target. Interactions such as hydrogen bonds, multiple linear potentials to model van der Waals and repulsive terms are considered.^{51,52}

As presented, TryR is a highly reported target for *Leishmania*, given its importance, five TryR targets were selected, according to year of publication, resolution and complex ligand, all targets used are described in the supplementary material. Reproducibility is an important feature for virtual screenings, as well as the proposed validations for this tool, such as the one used in this study, redocking enables the validation of the target for docking, RMSD (Root Mean Square Deviation) ≤ 2.0 Å are required for this.⁵³ Known selective inhibitions for this enzyme are mepacrine (IC₅₀ = 19 μ M,⁵⁴ score 4APN = 62.04), perphenazine (IC₅₀ = 4.88 μ M, score 4APN = 63.85), and clomipramine (IC₅₀ = 3.80 μ M,⁵⁵ score 4APN = 60.03), and were used as comparison for the AMTACs, due to their structural similarity. For all the TryR targets used, AMTAC-11 (score 4APN = 65.45) had better affinity scores, corroborating the idea of a possible mechanism associated with the activity found in promastigote.

Leishmania's TryR enzyme is essential for the parasite's survival in the host. It is a dimer with two active sites, which contain a flavin-adenine dinucleotide (FAD) cofactor and a glutathione molecule that are connected by hydrogen bonds and interactions with different enzyme residues. For chain B, hydrogen bonds with the Lys-61 residue, and hydrophobic interactions among the Val-58, Leu-62, Cys-52, and Cys-57 residues are reported to be essential for the enzyme.^{56,57} The main TryR interactions with a diarylpyrrole derivative are shown in Fig. 2. The molecular docking study is applied first to sample different conformations of the target receptor in the free form of ligand. The possibility of comparing the coupling forms, available in mini-libraries of drug-like molecules, to a large set and variable of biological receptors enhance the identification of possible new inhibitors.⁵⁸ Genetic difference of approximately 75%, between human CYP51 and that of *leishmania*, corroborates its importance in the development of more selective drugs.^{33,34} Table 2 shows the results for the molecular docking of AMTACs with the CYP51 target, co-crystallized with Fluconazole (PDB = 3L4D). Unlike TryR, the best score for the CYP51 target was AMTAC-01. Taking AMTAC 11 as a parameter, in which the dimethylamine radical affects the structure with an electronic profile and a volume different from AMTAC 01, this difference in the interaction profile with the target is justified.

Substantial differences between trypanosomal DNA topoisomerase IB and *leishmania* compared to their mammalian counterparts justify its wide use in the design of new compounds.^{59,60} Camptothecin (CPT) (LDTOP1 EC₅₀ = 0.7 μ M, 61 score 2B9S = 53.29) and diflomotecan (DFT) (score 2B9S = 56.10) are known inhibitors of Topoisomerase I and have been used as standards in docking studies.^{61,62} CPT is a non-competitive inhibitor that, when covalently bound to DNA, traps the enzyme in an immobile ternary complex, preventing the DNA reconnection step.

Table 2
Results of target-receptor interaction using the GOLD program, based on suggested targets for *Leishmania infantum*.

Compounds	4APN (TryR)	3L4D (CYP51)	2B9S (TOPO 1)
AMTAC 01	51.19	75.39	45.19
AMTAC 06	58.23	56.73	57.04
AMTAC 07	60.39	62.62	57.02
AMTAC 08	60.49	64.00	48.50
AMTAC 10	58.09	59.85	49.92
AMTAC 11	65.45	45.40	62.99
AMTAC 13	58.67	61.79	51.46
AMTAC 14	55.12	60.68	59.28
AMTAC 16	60.63	61.53	55.59
Ligand	67.58	68.14	—
RMSD	0.91	0.82	—

Pharmacophore modeling, crystallographic X-ray investigation of CPT and its molecular docking studies of the ternary CPT-LdTop1-DNA complex indicate a very polar active site, with emphasis on the interactions of residues Lys-211 and Arg-190, hydrogen bonding, as shown in Fig. 3. The scaffold of AMTACs favors a great possibility of inhibiting topoisomerases as previously described. Characteristics such as planarity and high points of polar interactions, corroborate this proposition. The carbonyl group fragment stands out as the main point of interaction, functioning as acceptor of hydrogen bonds. Knowing that the lower the energy value, the more stable is the interaction between the biological target and the bond, AMTAC 11 again showed the best interaction value, this time with LdTop1-DNA (PDB: 2B9S). Its better electronic distribution and greater planarity, in comparison to the other compounds, associated with the dimethylamine radical as a substituent, favored these physical-chemical properties to the structure and contributed to the results obtained.

Selectivity is an indispensable parameter in the development of compounds with greater potency and pharmacological safety. As presented above, the AMTACs showed, in general, an affinity for all targets studied *in silico*, these are targets with intrinsic characteristics to the parasite. The compounds with the highest activity against the promastigote forms of *L. infantum* were evaluated against the axenic amastigote form of the parasite. From the experiments with the promastigote forms of *L. infantum*, we obtained the effective dose capable of eliminating 50% of the parasites (Table 3; Graph 1).

In Table 3, the calculated values of the effective concentration of the compounds studied, obtained from 3 independent experiments performed in triplicate, along with the reference drug, Amphotericin B (1.597 $\pm$ 0.26 μ g / mL) can be observed. AMTAC 11 presented a significantly lower EC₅₀ of 0.974 $\pm$ 0.2 μ g/mL compared to the reference drug.

The evaluation in axenic amastigote by AMTAC 01 and AMTAC 11 showed that the steric and electronic effects of dimethyl amine group contribute more to anti-leishmanial activity.

It is interesting to highlight that electron-donor substitutions contribute more to the activity than hydrogen ring. Bulky groups and electron donor groups on *para* position is favorable to antileishmanial activity.^{56,63} For example, according to Coimbra *et al* (2016) in their study with quinolinic derivatives for *L. amazonensis*, the amino-substituted compound presented a higher selectivity to the parasite compared to the other quinolinic compounds.⁶⁴

The results are represented as the means $\pm$ S.E.M. of three experiments performed in triplicate ($p < 0.0001$).

PBMC cytotoxicity studies were performed with the compounds AMTAC 01 and AMTAC 11 which had better activities against *L. infantum* in its promastigote and amastigote forms. These compounds were tested at different concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78 μ g/mL). AMTAC 01 showed toxicity of 44.16 μ g / mL with an SI of 8.9, however AMTAC 11 showed no toxicity at the highest tested concentration (100 μ g / mL) (table 3; Graph 2), consequently a high selectivity index for the parasite cells. Furthermore, the Amphotericin B showed a high toxicity, with CC₅₀ at 7.634 $\pm$ 1.88 μ g / mL, and 4.78 for the selectivity index.

Some researchers showed low cytotoxic of acridine derivatives and quinolines evaluated in PBMC cells.^{21,65} However, in the study by Malachowska-Ugarte *et al.* (2012)⁶⁶, with nitroacridine / acridone derivatives toxicities at concentrations below 1 μ M were reported.

The results are represented as the means $\pm$ SD. of three experiments performed in triplicate. $p < 0.001$ for AMTAC 01 and $p = 0.0146$ for AMTAC 11 of significance; NC is the negative control; PC is the positive control (DMSO 20%).

The AMTAC 01 and 11 compounds inhibited the growth of promastigotes forms of *L. infantum* inversely proportional to the concentration of the compound (Graph 1) up to 6,25 μ g/mL (~65% inhibition, the maximum inhibition observed). Further increases to 12.5 μ g/mL did not result in increase of inhibition of parasite viability.

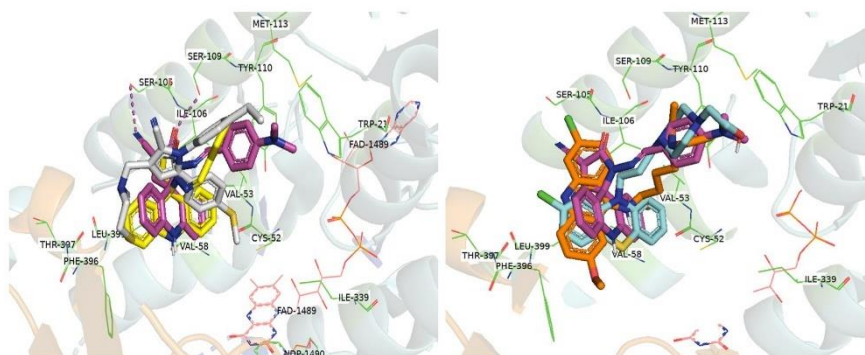


Fig. 2. Docking of AMTAC 01 and AMTAC 11 with TryR (PDB ID: 4APN). The ligands are shown in stick forms. In white, a TryR inhibitor ($IC_{50} = 13.8 \mu M$), initially complexed in the PDB, used as a comparison for AMTACs; in yellow, conformation found for AMTAC 01; in magenta, we present the pose with the best score after the docking study, indicating the geometric complementary for AMTAC 11 at the active site of the enzyme. Known TryR inhibitors were evaluated in the docking and presented similar poses to AMTAC 11, in the active site of the enzyme. Mepacrine, in orange, and perphenazine, in blue, had similar interactions in the study. The main amino acid residues that make up the active site for the complexed ligand are indicated in the image by their respective three-letter codes, as well as the distances for their polar interactions with the targets, highlighted in predominant color of the structure in question, the remaining residues presented make up the active site with hydrophobic and Van der Waals interactions.

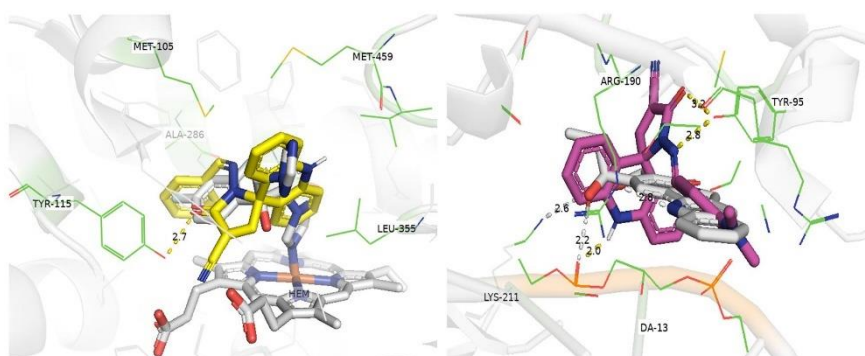


Fig. 3. On the left, docking of AMTAC 01 with CYP51 (PDB ID: 3L4D). The ligands are presented in stick form, in white we have a CYP51 inhibitor fluconazole, used as comparison for AMTACs; in yellow, the conformation with the best score found for AMTAC 01. On the right, docking of AMTAC 11 with LDTOPO I (PDB ID: 2B9S). The ligands are presented in stick form, in white we have an LDTOPO I inhibitor or CPT ($EC_{50} = 0.7 \mu M$), used as a comparison for AMTACs; in magenta the best conformation found for AMTAC 11. The main amino acid residues that make up the active site for the complexed ligand are indicated in the image by their respective three-letter codes, as well as the distances for their polar interactions with the targets, highlighted in predominant color of the structure in question, the remaining residues presented make up the active site with hydrophobic and Van der Waals interactions.

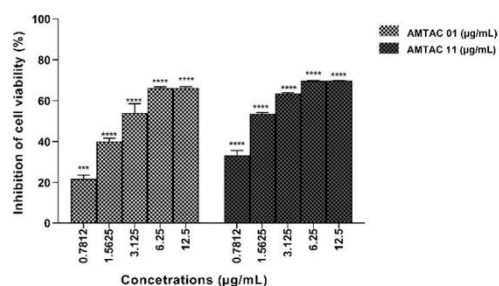
Table 3

Anti-*Leishmania* activity and cytotoxic effects against PBMC cells and the selectivity index for AMTAC 01, AMTAC 11 and amphotericin B.

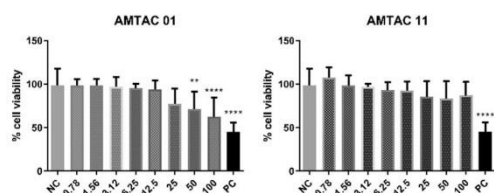
Compounds	EC_{50} ($\mu g/mL$)	CC_{50} ($\mu g/mL$)	SI
AMTAC 01	4.964 ± 0.6	44.16	8.90
AMTAC 11	0.974 ± 0.2	>100	>102.67
Amphotericin B	1.597 ± 0.26	7.634 ± 1.88	4.78

SI_c (selectivity index for PBMC) = CC_{50}/EC_{50} . Mean $\pm$ standard error.

The smallest concentration of AMTAC 11 tested ($0.78 \mu g/mL$) was capable of decreasing 33.2% of the parasite growth in comparison with the negative control (0% of inhibition), and was more effective than compound 01, which inhibited 21.7% the growth of the parasite. We can conclude that the addition of the group 4-dimethylamine significantly favored its activity, possibly due to its electronic donor effect in para



Graph 1. Inhibition of cell viability of *L. infantum* axenic amastigote forms by AMTAC 01 and AMTAC 11.



Graph 2. Cell viability of PBMC treated with AMTAC 01 and AMTAC 11 compounds.

position.

In conclusion, the understanding of drug-receptor interactions in a three-dimensional form and studies of the structure-activity relationship (SAR) corroborated with the results obtained *in vitro*. The possibility of multi-targets was confirmed by the study of molecular docking, its main conformations were confronted with existing drugs, and their intermolecular interactions with biological targets were enhanced after substitutions in the base molecule, especially the 4-dimethylamine substitution in AMTAC 11. The high selectivity shown by AMTAC 11 also indicates mechanisms that are selective to the parasite. The toxicity parameters evaluated by PBMC and erythrocytes also indicated greater pharmacological safety when compared to standard drugs. The scaffold of spiro-acridines is very promising for *Leishmania infantum* treatment.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128289>.

References

- Panamerican Health Organization, Organization WH. Epidemiological Report of the Americas. Rep Leishmaniasis. 2019;7(1):1–8. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/5050590Ahttp://new.paho.org/leishmaniasis>.
- David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 2009;22(6):491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>.
- Stevard D. The history of leishmaniasis. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
- da Trindade Granato J, dos Santos JA, Calixto SL, et al. Novel steroid derivatives: synthesis, antileishmanial activity, mechanism of action, and in silico physicochemical and pharmacokinetics studies. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1082–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.056>.
- Abbasi I, Aramin S, Hailu A, et al. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-153>.
- Elmahallawy EK, Saupedro Martinez A, Rodriguez Granger J, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(08):961–972. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310>.
- Duran G, Duran N, Culha G, Ozcan B, Oztas H, Ozer B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: A preliminary study. *Parasitol Res*. 2008;102(6):1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0896-5>.
- Escudero-Martínez JM, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM, et al. Antileishmanial activity and tubulin polymerization inhibition of podophyllotoxin derivatives on *Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017;7(3):272–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijddr.2017.06.003>.
- Delmas F, Avellaneda A, Di Giorgio C, et al. Synthesis and antileishmanial activity of (1,3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. *Eur J Med Chem*. 2004;39(8):685–690. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.04.006>.
- Di Giorgio C, Shimi K, Boyer G, Delmas F, Galy JP. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. *Eur J Med Chem*. 2007;42(10):1277–1284. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.02.010>.
- Valdés AF C. Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. *Open Med Chem J*. 2011;5:11–20. <https://doi.org/10.2174/1874104501105010011>.
- de Almeida S, Lafayette E, da Silva L, et al. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):13023–13042. <https://doi.org/10.3390/ijms160613023>.
- de Lima Serafim V, Félix MB, Prade Silva DK, et al. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chromometric, and Molecular Docking Studies. Vol 91; 2018. doi:10.1111/cbdd.13176.
- Menezes TM, de Almeida SMV, de Moura RO, Seabra G, de Lima M do CA, Neves JL. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein ligand interaction and molecular docking studies. *Int J Biol Macromol*. 2019;122:289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.175>.
- Carole DG, Michel DM, Julien C, et al. Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. *Bioorganic Med Chem*. 2005;13(19):5560–5568. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.06.045>.
- Mahajan S, Khan SI, Tekwani BL, Khan IA, Singh IP. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 7-arylbenzo[c]acridine-5,6-diones as Potential Anti-Leishmanial and anti-trypomastix Agents. *Med Chem (Los Angeles)*. 2018;14(6):563–572. <https://doi.org/10.2174/1573406414666180226163222>.
- Heald RA, Stevens MFG. Antitumour polycyclic acridines. Palladium(0) mediated syntheses of quino[4,3,2-kl]acridines bearing peripheral substituents as potential telomere maintenance inhibitors. *Org Biomol Chem*. 2003;1(19):3377–3389. <https://doi.org/10.1039/b305177n>.
- Charnantray F, Demecynck M, Carrez D, et al. 4-Hydroxymethyl 3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. *J Med Chem*. 2003;46(6):967–977. <https://doi.org/10.1021/jm020389w>.
- Belmont P, Dorange I. Acridine/acridone: A simple scaffold with a wide range of application in oncology. *Expert Opin Ther Pat*. 2008;18(11):1211–1224. <https://doi.org/10.1517/13543776.18.11.1211>.
- Patel MM, Mali MD, Patel SK. Bernthsen synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2010;20(21):6324–6326. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.001>.
- Barros FWA, Silva TG, da Rocha Pitta MG, et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. *Bioorganic Med Chem*. 2012;20(11):3533–3539. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.007>.
- Gao C, Li B, Zhang B, et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA binding and apoptosis-inducing agents. *Bioorganic Med Chem*. 2015;23(8):1800–1807. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.036>.
- Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in *Leishmania infantum*. *J Med Chem*. 2009;52(8):2603–2612. <https://doi.org/10.1021/jm900185q>.
- Baiocco P, Ilari A, Ceci P, et al. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase. *Mol Biol*. Published online 2011:230–233. <https://doi.org/10.1021/ml1002629>.
- Ilari A, Baiocco P, Messori L, et al. A gold containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*. 2012;42(2–3):803–811. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0997-9>.
- Turcuno L, Torrente E, Missineo A, et al. Identification and binding mode of a novel *Leishmania* Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):e0006969. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006969>.
- Saccoliti F, Angiulli G, Pupo G, et al. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1):304–310. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1250755>.
- Revelto A, Ruiz-Santagüera M, de Lucio Héctor, et al. Pyrrolopyrimidine vs Imidazole-Phenyl-Thiazole Scaffolds in Nonpeptide Dimerization Inhibitors of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase. *ACS Infect Dis*. 2019;5(6):873–891. <https://doi.org/10.1021/acinfed.8b00355>.
- Tahghighi A, Hamzeh Mivehroud M, Asadpour Zeynali K, Foroumadi A, Dastmalchi S. QSAR and docking studies on the (5-nitroheteroaryl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) piperazinyl analogs with antileishmanial activity. *J Chemom*. 2016;30(5):284–293. <https://doi.org/10.1002/cem.v30.510.1002/cem.2789>.
- Kukowska M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. *Eur J Pharm Sci*. 2017;109:587–615. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.027>.
- Brahmachari, U.N. and Maity, B.B. Ind. J. Med. Res. 1925, 13, 21–24. in: Chakraborty, A. K; Majumder, H. K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988, 152, 605–611.
- Chen CK, Leung SSF, Guilbert C, Jacobson MP, Mckerrrow JH, Podust LM. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000651>.
- Hargrove TY, Wawrzak Z, Liu J, Nes WD, Waterman MR, Lepesheva GI. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26838–26848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237099>.
- Verna S, Mehta A, Shalva C. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*. 2011;6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025273>.

- 35 Pandiarkar T, Zhu X, Mathur R, et al. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the arylimidamide DB766: Azole interactions and role of CYP5122A1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4682–4689. <https://doi.org/10.1128/AAC.02405-14>.
- 36 McCall LJ, El Aroussi A, Choi JY, et al. Targeting Ergosterol Biosynthesis in *Leishmania donovani*: Essentiality of Sterol 14 α -demethylase. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003588>.
- 37 Enami S, Tavangar P, Keighobadi M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. *Eur J Med Chem.* 2017;135:241–259. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.044>.
- 38 Gouveia RG, Ribeiro AG, Segundo MASP, et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. *Bioorganic Med Chem.* 2018;26(22):5911–5921. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.038>.
- 39 Craig PN. Interdependence between Physical Parametess and Selection of Substituent Groups for Correlation Studies. *J Med Chem.* 1971;14(8):680–684. <https://doi.org/10.1021/jm00290a004>.
- 40 Chanquia SN, Larregui F, Puente V, Labriola C, Lombardo E, García LG. Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Bioorg Chem.* October 2018;2019(83):526–534. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.053>.
- 41 Upadhyay A, Kushiwaha P, Gupta S, et al. Synthesis and evaluation of novel triazolyl quinoline derivatives as potential antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2018;154:172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.014>.
- 42 Sangshetti JN, Kalam Khan FA, Kulkarni AA, Arote R, Patil RH. Antileishmanial drug discovery: Comprehensive review of the last 10 years. *RSC Adv.* 2015;5(41):32376–32415. <https://doi.org/10.1039/c5ra02669e>.
- 43 Majumetová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep.* 2018;45(5):1469–1478. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>.
- 44 Sangshetti JN, Shaikh RJ, Khan FAK, et al. Synthesis, antileishmanial activity and docking study of N' substitutedbenzylidene 2 (6,7 dihydrothieno[3,2 c]pyridin 5 (4H)-yl) acetohydrazides. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2014;24(6):1605–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.035>.
- 45 Pandey RK, Kumbhar BV, Sundar S, Kunwar A, Prajapati VK. Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase. *J Recept Signal Transduct.* 2017;37(1):60–70. <https://doi.org/10.3109/1079893.2016.1171344>.
- 46 Blaikie L, Kay G, Kong Thoo Lin P. Synthesis and in vitro evaluation of vanillin derivatives as multi target therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2020;30(21):127505. doi:10.1016/j.bmcl.2020.127505.
- 47 Chávez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, et al. A Computational Approach Using Bioinformatics to Screening Drug Targets for *Leishmania infantum* Species. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6813467>.
- 48 Ortali M, Ilari A, Colotti G, et al. Identification of chalcone based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. *Eur J Med Chem.* 2018;152:527–541. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.057>.
- 49 Matadamas Martínez F, Hernández Campos A, Téllez Valencia A, et al. *Leishmania mexicana* Trypanothione Reductase Inhibitors: Computational and biological studies. *Molecules.* 2019;24(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183216>.
- 50 Raj S, Sasidharan S, Balaji SN, Saudagar P. An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. *Parasitol Res.* 2020;119(7):2025–2037. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06736-x>.
- 51 Lionta E, Spyrou G, Vassilatis D, Cournia Z. Structure Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(16):1923–1938. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445>.
- 52 Huang SY, Grinter SZ, Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys.* 2010;12(40):12899–12908. <https://doi.org/10.1039/c0cp00151a>.
- 53 Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: An open source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform.* 2019;11(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>.
- 54 Eberle C, Lauber BS, Fanklauser D, et al. Improved Inhibitors of Trypanothione Reductase by Combination of Motifs: Synthesis, Inhibitory Potency, Binding Mode, and Antiprotozoal Activities. *ChemMedChem.* 2011;6(2):292–301. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000420>.
- 55 Richardson JL, Nett IRE, Jones DC, Abdille MH, Gilbert IH, Fairlamb AH. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem.* 2009;4(8):1333–1340. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900097>.
- 56 Apuy JL, Busenlehner LS, Russell DH, Giedroc DP. Ratiometric Pulsed Alkylation Mass Spectrometry as a Probe of Thiolate Reactivity in Different Metalloprotein Derivatives of *Staphylococcus aureus* p1258 CadC. *Biochemistry.* 2004;43(13):3824–3834. <https://doi.org/10.1021/bi035668f>.
- 57 Otero L, Vieites M, Boiani L, et al. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosenarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J Med Chem.* 2006;49(11):3322–3331. <https://doi.org/10.1021/jm0512241>.
- 58 Amaro RE, Baudry J, Chodera J, et al. Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophys J.* 2018;114(10):2271–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>.
- 59 Prada CF, Álvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R, et al. Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(10):1433–1440. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.024>.
- 60 Tejería A, Pérez-Pereteo Y, Reguera RM, et al. Antileishmanial effect of new indeno-1,5 naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infantum* type IB DNA topoisomerase. *Eur J Med Chem.* 2016;124:740–749. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.017>.
- 61 Mamidala R, Majumdar P, Jha KK, et al. Identification of *Leishmania donovani* Topoisomerase 1 inhibitors via intuitive scaffold hopping and bioisosteric modification of known Top 1 inhibitors. *Sci Rep.* 2016;6(February):1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26603>.
- 62 Pérez-Pereteo Y, Escudero-Martínez JM, Reguera RM, et al. Antileishmanial activity of terpenylquinones on *Leishmania infantum* and their effects on *Leishmania* topoisomerase IB. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019;11(July):70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijddr.2019.10.004>.
- 63 de Mello MVP, Abrahim-Vieira B de A, Domingos TFS, et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2018;150:920–929. doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.047.
- 64 Coimbra ES, Antinarelli LMR, Silva NP, et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interact.* 2016;260:50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017>.
- 65 Hameed A, Masood S, Hameed A, Ahmed E, Sharif A, Abdullatif MI. Anti malarial, cytotoxicity and molecular docking studies of quinolinyl chalcones as potential anti-malarial agent. *J Comput Aided Mol Des.* 2019;33(7):677–688. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00210-2>.
- 66 Malachowska-Ugarte M, Cholewinski G, Dzierzbicka K, Trzonkowski P. Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/ acridone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2012;54:197–201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.040>.

APÊNDICE C

Parasitology Research (2019) 118:3067–3076
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06403-w>

TREATMENT AND PROPHYLAXIS - ORIGINAL PAPER



Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-*Leishmania* activity and cytotoxicity

Juliana da Câmara Rocha^{1,2} · Klinger Antonio da Franca Rodrigues³ · Patrícia Lima do Nascimento Nérís¹ · Larisse Virgolino da Silva² · Fernanda Silva Almeida⁴ · Viviane Silva Lima² · Rephany Fonseca Peixoto² · Juliene da Câmara Rocha⁵ · Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo⁶ · Robson Cavalcanti Veras⁶ · Isac Almeida de Medeiros⁶ · Wagner André Vieira da Silva⁷ · Claudio G. Lima-Junior⁷ · Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos⁷ · Ian Porto Gurgel do Amaral² · Márcia Rosa de Oliveira⁸ · Tatjana de Souza Lima Keesen²

Received: 11 October 2018 / Accepted: 19 July 2019 / Published online: 7 August 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

This study is a report on the anti-*Leishmania* activity of Morita-Baylis-Hillman (MBH) homodimers adducts against the promastigote and axenic amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and on the cytotoxicity of these adducts to human blood cells. Both studied homodimers, MBH 1 and MBH 2, showed activity against the promastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*, which are responsible for visceral and cutaneous leishmaniasis, respectively. Additionally, the homodimers presented biological activity against the axenic amastigote forms of these two *Leishmania* species. The adducts exhibited no hemolytic activity to human peripheral blood mononuclear cells or erythrocytes at the tested concentrations and achieved higher selectivity indices than amphotericin B. Evaluation of cell death by apoptosis revealed that the homodimers had better apoptosis/necrosis profiles than amphotericin B in the promastigote forms of both *L. infantum* and *L. amazonensis*. In conclusion, these Morita-Baylis-Hillman adducts had anti-*Leishmania* activity in an in vitro model and may thus be promising molecules in the search for new drugs to treat leishmaniasis.

Keywords *Leishmania* spp. · Anti-*Leishmania* activity · Treatments · Morita-Baylis-Hillman

Section Editor: Sarah Hendrickx

✉ Tatjana de Souza Lima Keesen
 tat.keesen@cbiotec.ufpb.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

² Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

³ Coordenação do curso de Medicina, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI 65202-020, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil

⁶ Instituto de Pesquisa de Medicamentos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

⁷ Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba Campus I, João Pessoa, Paraíba 58059-900, Brazil

⁸ Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

APÊNDICE D



16/03/2022 870220022542
14:33

29409161936375400

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 004869 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 12671814000137

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Baraúnas, 351

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58429-500

País: Brasil

Telefone: (83) 3315 3383

Fax:

Email: inovatecuepb@uepb.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária, s/n, Conjunto Castel

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 321 67558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Professor Moraes Rego nº 1.235, Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-420

País: BRASIL

Telefone: (81) 212 68000

Fax:

Email: secretariadine.propesqi@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DE UM COMPOSTO ESPIROACRIDÍNICO PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Resumo: A presente invenção se refere ao uso de um composto espiro-acridínico para a preparação de um medicamento para tratamento de doenças negligenciadas. Além da escassez de opção terapêutica, a resistência a medicamentos é um dos desafios enfrentados na terapia antiparasitária. Dessa maneira, significativos esforços são direcionados para o desenvolvimento de novas drogas com potencial terapêutico antiparasitário, sendo os derivados espiro-acridínicos fármacos potenciais para tratamento dessas patologias. Portanto, a presente invenção fornece um segundo uso de compostos espiro-acridínicos para fins antiparasitários, que apresentam atividade antiparasitária promissora, com baixo potencial de citotoxicidade e boa seletividade.

Figura a publicar: 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: RICARDO OLÍMPIO DE MOURA

CPF: 99963213472

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: R. Compositor Rosil Cavalcante, 855, apt. 204, bl: J, Novo Bodocongó

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58431-070

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 280751

Fax:

Email: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com

Inventor 2 de 10

Nome: GLEYTON LEONEL SILVA SOUSA

CPF: 09019908413

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Pedro Barbosa, 49, Monte Castelo

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58407-158

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 128353

Fax:

Email: gleytonleonel@gmail.com

Inventor 3 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

Nome: PAULA ROBERTA DA SILVA

CPF: 09724399435

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Um, Nº 284, Cajueiro Seco

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP:

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 920609

Fax:

Email: paula.r.silva@hotmail.com

Inventor 6 de 10

Nome: FERNANDA SILVA ALMEIDA

CPF: 09712339424

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Monteiro da Franca, 1480, Manaíra

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58038-323

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 444961

Fax:

Email: fernanda_s_almeida@hotmail.com

Inventor 7 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

Nome: TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA

CPF: 97890472668

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Luzia simões Bertolini, 101 ap 601, Aeroclube

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58036-630

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 229995

Fax:

Email: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br

Inventor 8 de 10

Nome: LUIZ CARLOS ALVES

CPF: 47968290406

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua oito, nº 20 – 5ª etapa, Rio Doce

Cidade: Olinda

Estado: PE

CEP: 53090-290

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 687916

Fax:

Email: lcalves@cpqam.fiocruz.br

Inventor 9 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2022 às 14:33, Petição 870220022542

