

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Imunopatologia

JÉSSICA ANDRESA COSTA

***Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados de
aldiminas para o tratamento da leishmaniose visceral***

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientadora: Msc. Ana Flávia Pereira Costa

OURO PRETO – MG

2024

JÉSSICA ANDRESA COSTA

**Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados de
aldiminas para o tratamento da leishmaniose visceral**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Ciências Biológicas Bacharelado da
Universidade Federal de Ouro Preto como
requisito parcial para a obtenção do Grau
em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientadora: Msc. Ana Flávia Pereira
Costa

OURO PRETO

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C837a Costa, Jessica Andresa.

Avaliação in vitro do potencial leishmanicida de derivados de aldiminas para o tratamento da leishmaniose visceral. [manuscrito] / Jessica Andresa Costa. - 2024.

48 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

Coorientadora: Ma. Ana Flávia Pereira Costa.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Leishmaniose visceral. 2. Tratamento. 3. Avaliação. 4. In vitro. I. Roatt, Bruno Mendes. II. Costa, Ana Flávia Pereira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Paulo Vitor Oliveira - CRB6/2551



FOLHA DE APROVAÇÃO

Jéssica Andresa Costa

Avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados de aldiminas para o tratamento da leishmaniose visceral

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 16 de fevereiro de 2024

Membros da banca

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
MSc. Ana Flávia Pereira Costa - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves
Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa - Universidade Federal de Ouro Preto

Bruno Mendes Roatt, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 22/02/2024



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/02/2024, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0672093** e o código CRC **5C054872**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar a oportunidade de estudar em uma universidade federal e por não me deixar desistir. Ao meus pais Leontina e Evaldo por me apoiarem em toda graduação, amo vocês!

Aos amigos que fiz nesses anos de Ouro Preto, vocês são muito especiais.

A moradia socioeconômica, Vila Universitária, em especial a casa 06, vulgo Fraternidade ComFusão. Onde pude residir durante todo o curso. Apesar das dificuldades de dividir uma casa com mais 23 pessoas, eu aprendi muito com todos os moradores. E agradeço por cada momento vivido, cada alimento compartilhado, as amizades que levarei por toda vida, aos “puxões de orelha” e até pelas brigas, vocês me fizeram evoluir muito como ser humano. Saio daqui uma pessoa melhor do que quando cheguei. Vale destacar, que é muito importante ter este auxílio quando moramos longe de casa, assim como todos os auxílios que são oferecidos pelas universidades federais.

A Soraia, umas das primeiras pessoas que conheci em Ouro Preto e que mesmo entre tapas e beijos, sempre foi meu ombro amigo. Sou grata pela amizade que construímos.

Ao meu namorado, que esteve comigo nessa reta final da graduação. Agradeço por todo apoio, paciência, companheirismo e amor.

Aos locais que trabalhei em Ouro Preto, agradeço pelo conhecimento compartilhado e pela confiança depositada.

À empresa júnior do curso de Ciências Biológicas, Eremanthus, por toda minha evolução como pessoa e profissional com a vivência no meio empresarial.

À toda equipe do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), pelo suporte, apoio e conhecimento.

Ao meu orientador Bruno Roatt pela oportunidade de fazer parte do Laboratório, pela orientação e compreensão.

A minha co-orientadora Ana Flávia por estar sempre a disposição, pelos ensinamentos passados, pela paciência e apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para que a minha caminhada fosse mais leve.

À Universidade Federal de Ouro Preto e aos professores por todo suporte e conhecimento ensinado ao longo desses anos de curso.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Laboratório de Imunopatologia (LIMP), Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo (LMU), a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Agradeço as agências de Fomento, CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCT-DT.

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença provocada por parasitos do gênero *Leishmania*. Trata-se de uma patologia endêmica totalizando quase todos os continentes, com exceção da Oceania, e estando entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas. As Leishmanioses são classificadas em três tipos clínicos, são elas: visceral (LV), cutânea (LC) e mucosa/mucocutânea (LMC). Elas são propiciadas por mais de 20 espécies de protozoários da classe Kinetoplastida, incluídas no gênero *Leishmania*. É notório que muitos pacientes com LV não reagem bem a quimioterapia convencional, por apresentar muitos efeitos colaterais, fazendo com que o paciente rejeite o tratamento. Sendo assim, são necessários mais testes com novos compostos para tratar essa doença negligenciada. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade de moléculas químicas sintéticas derivadas de aldiminas (3D7 e 3H8) em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e a capacidade leishmanicida destas moléculas em macrófagos infectados por *L. infantum* transfectadas com o gene repórter GFP⁺. Em uma primeira etapa, avaliamos a citotoxicidade dos diferentes compostos derivados de aldiminas (3D7 e 3H8) em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 através do ensaio de MTT. Em seguida, determinamos o IC₅₀ dos diferentes compostos químicos derivados do grupo das aldiminas. Posteriormente, avaliamos a inibição da infecção de formas promastigotas em macrófagos RAW 264.7 utilizando parasitos de *L. infantum* OP46 GFP⁺ pré-tratados com os diferentes compostos e avaliamos a atividade leishmanicida destes compostos contra as formas amastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ em macrófagos murinos RAW 264.7. Após serem realizados os experimentos, nossos resultados *in vitro* confirmaram que os compostos das aldiminas (3H8 e 3D7) apresentaram baixa citotoxicidade e são uma boa alternativa terapêutica leishmanicida, em promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Baseando-se nesta totalidade de informações, recomenda-se que estes compostos devem ser classificados como possíveis fármacos para estudos quimioterápicos experimentais *in vivo* para o tratamento da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, aldiminas, citotoxicidade, tratamento.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL), caused by parasites of the *Leishmania* genus, remains endemic across most continents, excluding Oceania, ranking among the top neglected tropical diseases. Classified into visceral (VL), cutaneous (CL), and mucosal/mucocutaneous (MCL) types, Leishmaniasis is prompted by over 20 species of protozoa from the Kinetoplastida subgroup within the *Leishmania* genus. Notably, VL patients often respond poorly to conventional chemotherapy due to adverse effects, leading to treatment rejection and the emergence of resistant strains. To address this, novel compounds are imperative. Hence, this study aimed to assess the cytotoxicity of synthetic chemical molecules derived from aldimines (3D7 and 3H8) on murine RAW 264.7 macrophages and their leishmanicidal potential on *L. infantum*-infected macrophages with GFP+ gene transfection. Cytotoxicity of aldimine-derived compounds (3D7 and 3H8) was evaluated in RAW 264.7 macrophages using MTT assay. IC₅₀ of aldimine-derived chemical compounds was determined subsequently. The study also assessed inhibition of promastigote infection in RAW 264.7 macrophages using *L. infantum* OP46 GFP+ parasites pre-treated with compounds and leishmanicidal activity against amastigote forms of *L. infantum* OP46 GFP+ in murine RAW 264.7 macrophages. In vitro results confirmed low cytotoxicity of aldimine compounds (3H8 and 3D7) and their potential as therapeutic alternatives for leishmanicidal treatment against both promastigotes and amastigotes of *L. infantum*. Based on these findings, these compounds are recommended as potential drug candidates for experimental in vivo chemotherapeutic studies for visceral leishmaniasis treatment.

Keywords: Visceral leishmaniasis, aldimines, cytotoxicity, treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB- D Anfotericina B Desoxicolato

AmB-L Anfotericina B Lipossomal

Anf-B Anfotericina B

Anti-LV Anti*Leishmania*

BOD Biochemical Oxygen Demand

DMSO Dietilsufóxido

GFP⁺ Gene Reporter - Proteína Verde Fluorescente

IC₅₀ Concentração Inibitória 50%

L. infantum *Leishmania infantum*

LC Leishmaniose Cutânea

LIT Meio de Cultura (Liver Infusion Triptose Médium)

LMC Leishmaniose Mucosa MucoCutânea

LV Leishmaniose Visceral

MS Ministério da Saúde

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5- difenil tetrazólio

OMS Organização Mundial da Saúde

OP46 Cepa de Promastigotas de *L. Infantum*

PBS Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

RAW 264.7 Linhagem de Macrófagos Murinos

rpm Rotação por Minuto

RPMI Meio de Cultura com Vermelho de Fenol (Rowell Park Memorial Institute)

SDS Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)

SFB Soro Fetal Bovino

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da Leishmania em flebotomíneos e humanos.

Figura 2: Estrutura Geral das aldiminas.

Figura 3: Avaliação do perfil de citotoxicidade das aldiminas em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando a metodologia de MTT.

Figura 4: Avaliação da inibição da infecção de macrófagos infectados utilizando promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ pré-tratadas com os compostos sintéticos derivados de aldiminas após os tempos de 24, 48 e 72 horas.

Figura 5: Avaliação do percentual de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados por promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ e tratados com os compostos químicos sintéticos derivados de aldiminas (3D7 e 3H8) nas concentrações (IC₅₀, IC₅₀ 50%).

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC_{50} , representando a concentração inibitória, obtidas nos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 após o tratamento com os compostos químicos derivados de aldiminas, bem como suas médias correspondentes.

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3.	MATERIAS E MÉTODOS.....	20
3.1	Obtenção dos compostos químicos sintéticos.....	20
3.2	Diluição dos compostos químicos sintéticos.....	21
3.3	Manutenção células murinas da linhagem RAW 264.7.....	21
3.4	Determinação da concentração celular a ser utilizada nos experimentos.....	22
3.5	Avaliação da citotoxicidade dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 pela metodologia de MTT.....	22
3.6	Cultivo das promastigotas de <i>L. infantum</i> OP46 GFP ⁺	23
3.7	Inibição da infecção dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando promastigotas de <i>L. infantum</i> OP46 GFP ⁺ pré-tratados.....	24
3.8	Tratamento dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com promastigotas de <i>L. infantum</i> OP46 GFP ⁺	24
3.9	Análises estatísticas.....	25
4.	RESULTADOS.....	25
4.1	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 pela metodologia de MTT.....	27
4.2	Determinação dos valores de IC ₅₀ nos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 a serem utilizados nos experimentos posteriores encontrados pela metodologia de MTT.....	28
4.3	Infecção de células murinas da linhagem RAW 264.7 utilizando os parasitos de <i>L. infantum</i> OP46 GFP ⁺ pré-tratados com os compostos derivados das aldiminas.....	30
4.4	Análise do perfil leishmanicida no tratamento dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com a cepa de <i>L. infantum</i> OP46 GFP ⁺	32
5.	DISCUSSÃO.....	33
6.	CONCLUSÃO.....	36
7.	REFERÊNCIAS.....	37

1. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no âmbito global, as leishmanioses situam-se como umas das dez principais doenças tropicais que sofrem descaso, sendo consideradas doenças negligenciadas. Elas são um grupo de doenças endêmicas que atingem 99 países, onde, 89 são endêmicos para leishmaniose cutânea (LC), 80 para leishmaniose visceral (LV) e 71 para ambas as formas clínicas (LC e LV) (PAHO, 2024).

Dentre os 9 países que reportam 85% dos casos de LC, o Brasil, Colômbia e Peru estão incluídos na lista e quatro países, Índia, Sudão, Brasil e Quênia, concentram 68% dos casos de LV em todo o mundo. Na Região das Américas, casos de LV foram notificados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excluindo o Chile e as Ilhas do Caribe (OPAS, 2024).

A LC e a LV estão presentes em um total de 21 países, sendo 19 endêmicos para LC e 13 países para LV. No período de 20 anos entre 2001 e 2021, a OPAS recebeu notificação de um total de 1.105.545 casos de LV e LC, com uma média anual de 52.645 casos. A LV, por sua vez, registrou 69.665 novos casos no mesmo período, com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade em torno de 8%, a mais elevada quando comparada a outros continentes (OPAS, 2023)

As leishmanioses possuem diferentes manifestações clínicas, classificadas em três formas: mucosa/mucocutânea (LMC), cutânea (LC), e visceral (LV). A leishmaniose LMC, pode levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz e da boca, podendo causar grave incapacidade. A LC, por sua vez, é a forma mais comum da infecção, produzindo principalmente lesões ulcerativas que deixam cicatrizes pelo resto da vida. Já a LV é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia (PAHO, 2023).

Elas podem ser causadas por mais de 20 espécies de protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao subgrupo taxonômico da classe Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, inseridas no gênero *Leishmania* (Temponi, 2019)

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas aos seus hospedeiros vertebrados, que vão desde o ser humano até animais domésticos e silvestres, por fêmeas de insetos pertencentes à família *Psychodidae* (Subfamília: *Phlebotominae*) (Lainson e Shaw, 1987). Para mais, a LV se destaca por ser a forma mais grave da doença, podendo se manifestar de forma assintomática, avançando para uma forma oligossintomática até

atingir a forma sintomática que, pode ser aguda ou crônica, de caráter debilitante, podendo causar a morte em mais de 90% dos casos quando não tratados. (Desjeux, 2004, PAHO, 2023).

A LV, também conhecida como Calazar, é uma doença parasitária grave causada pelo protozoário *L. infantum*, que afeta órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea (DNDi, 2024). Sendo transmitida por meio do repasto sanguíneo de flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*) infectados, popularmente conhecidos como mosquito-palha ou birigui (Desjeux, 2004).

Este parasito possui o ciclo biológico digenético (heteroxênico), dispondo de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado, onde as formas de desenvolvimento alternam-se entre duas principais formas morfológicas distintas, sendo elas, a promastigota extracelular ocorrendo no hospedeiro invertebrado, com flagelo livre presente, e na forma amastigota intracelular ocorrendo no hospedeiro vertebrado, presente no interior dos macrófagos de mamíferos, sejam eles, silvestres, domésticos ou o homem. (Killick-Kendrick, 1979; Bates e Rogers 2004).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre após a inoculação de formas promastigotas metacíclicas na pele durante o repasto sanguíneo de fêmeas do flebotomíneo infectado. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas perdendo seus flagelos e iniciando a sua multiplicação dentro de fagolisossomos (Lainson, Ryan e Shaw, 1987; Van Griensven e Diro, 2012). À medida que a infecção progride, os macrófagos infectados se rompem, liberando amastigotas que invadem novos macrófagos, sendo novamente fagocitados por estas mesmas células e se disseminam pelo sistema retículo-endotelial, afetando órgãos como o fígado, baço e medula óssea, dando continuidade ao ciclo (Basano e Camargo, 2004; Chappuis et al., 2007).

A infecção se inicia quando o flebotomíneo infectado ao sugar o sangue do hospedeiro humano, introduz as formas promastigotas através do repasto. Dentro do hospedeiro humano, as formas promastigotas são fagocitadas por células especializadas chamadas de macrófagos. No interior dos macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam dentro dos macrófagos, destruindo essas células durante processo. Essas formas são pequenas e ovoides e, apresentam alta taxa de multiplicação dentro do flebotomíneo. O flebotomíneo ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro humano infectado, ao sugar o sangue, ele ingere as formas amastigotas do parasito. No interior dos insetos, as formas amastigotas se multiplicam até o rompimento

da célula, se diferenciam novamente em promastigotas metacíclicas. Após isso, elas passam por divisão binária e migram para a região salivar (probóscide) do inseto vetor, onde, estarão prontas para infectar o novo hospedeiro mamífero durante o próximo repasto sanguíneo, moldando o sistema imunológico do hospedeiro a seu favor. (Chappuis et al., 2007; Sunter e Gull, 2017).

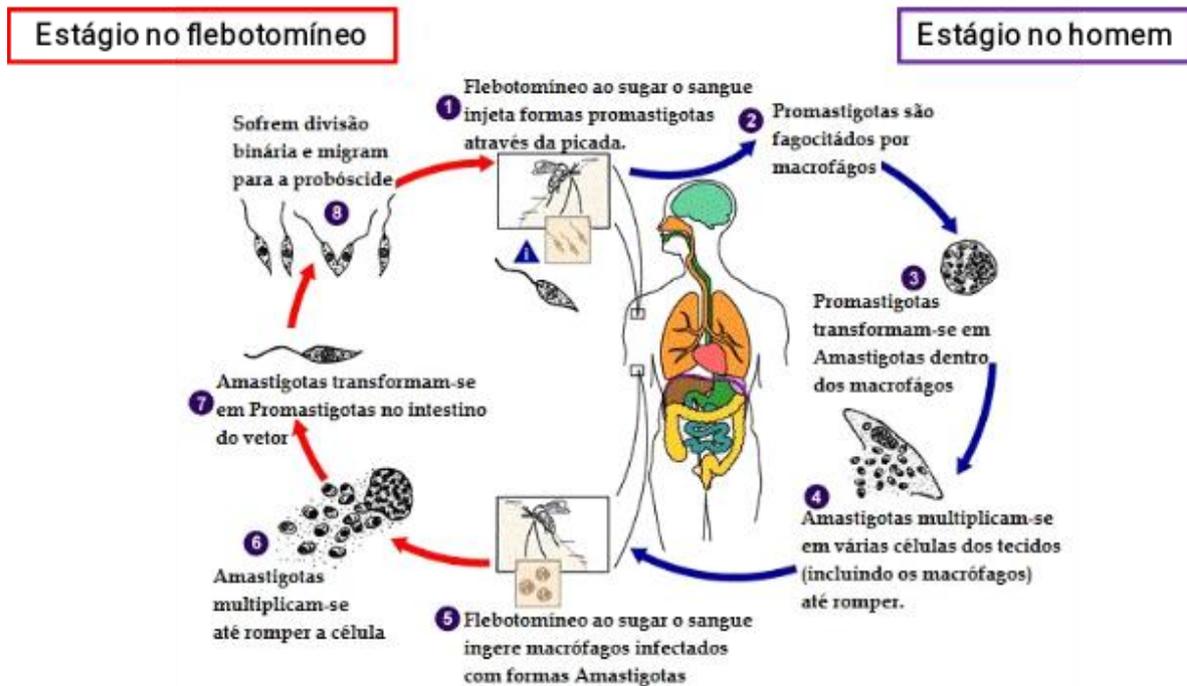


Figura 1: Ciclo de vida da Leishmania em flebotomíneos e humanos

Fonte: Adaptado de CDC Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
Acesso em: 07 Jul. 2023.

Em relação ao espectro clínico, a LV é uma doença de evolução crônica, caracterizada por perda de apetite e peso, episódios irregulares de febre de longa duração, fadiga, hepatoesplenomegalia e grave anemia, além de um comprometimento no sistema imunológico que, se não tratada, a taxa de mortalidade pode chegar em mais de 90% dos casos. Nos últimos anos, a letalidade tem aumentado cada vez mais, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (MS, 2022). Isso é preocupante, visto que, ainda existem pelo mundo cerca de 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas ou estão em risco de adquirir a doença (WHO, 2021).

O tratamento da LV, é realizado com diferentes classes de fármacos que se apresentam como opções terapêuticas viáveis. Mas, apesar de comprovada eficácia de alguns destes eles podem apresentar sérios efeitos colaterais graves (hepatotóxicos,

nefrotóxicos e cardiotoxicos) (Oliveira et al., 2004) além de longos períodos de terapia o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento, bem como as suas formas e tempo de administração e efetividade diminuída devida à crescente resistência das cepas e elevados custos (Roatt et al., 2014; WHO, 2020).

O tratamento consiste em algumas opções disponíveis de diversas classes de fármacos, que incluem os: antimoniais pentavalentes, a anfotericina B lipossomal e desoxicolato, a paromomicina, a pentamidina e a miltefosina, (Santiago, Pita e Guimarães., 2021).

Apesar da toxicidade, os antimoniais pentavalentes, possuem suas estruturas químicas desvendadas e estudadas ao longo dos anos e, o seu mecanismo em partes, ainda é desconhecido. Ainda assim, é sabido que os antimoniais provocam regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a eliminação do parasito (Rath., 2003; Istanbulu et al., 2020).

Como o antimoniato é rapidamente absorvido e excretado, faz-se necessário que a aplicação seja feita em doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, a fim de assegurar o elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, alcançar êxito no tratamento (Roberts, et al., 1998). A elevada toxicidade do medicamento e sua aplicação ser via intravenosa, requer atendimento hospitalar, o que propicia a não adesão do paciente ao recurso terapêutico, elevando assim a quantidade de abandono dos casos e contribuindo para o surgimento de cepas resistentes (Croft et al., 2005).

No Brasil, o medicamento mais utilizado é o Glucantime® (Serenio *et al.*, 2000) onde a formulação disponível e fornecida pelo governo federal através do Ministério da Saúde (MS), é o antimoniato N-metil-glucamina. Esta classe de fármacos apresenta-se como a terapia mais econômica disponível (Herwaldt, 1999).

Além dos antimoniais pentavalentes, a Anfotericina B foi usada primeiramente no tratamento de infecções fúngicas (Vandeputte et al., 1956), é um fármaco insolúvel em água e com pH neutro. Sua ação transcorre de sua ligação ao ergosterol, com decorrente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito o levando a óbito (Saha *et al.*, 1986; Singh & Sivakumar, 2004).

A Anfotericina B é o fármaco mais potente anti-*Leishmania* disponível, com efeito demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo* na destruição deste protozoário, tanto na forma promastigota quanto na amastigota (Thakur *et al.*, 1994). Porém, este fármaco possui pouca habilidade para absorção gastrointestinal e característica hidrofóbica, sendo capaz de interligar-se em vias celulares de mamíferos, acarretando distúrbios, sendo a

nefrotoxicidade o seu maior efeito colateral. (Motta & Sampaio, 2012). Mas por ser um fármaco excessivamente tóxico exige internação e monitoramento de funções vitais, sendo um tratamento de elevado custo (Kafetzis *et al.*, 2005).

Atualmente, no Brasil, existem dois tipos de formulações, de Anfotericina B oferecidas pelo MS, que são a Anfotericina B desoxicolato (AmB-D) e a Anfotericina B lipossomal (AmB-L) (Anvisa, 2023). E uma maneira de buscar atenuar a toxicidade e resistência aos fármacos leishmanicidas, é desenvolver novas formulações com a finalidade de destinar o medicamento ao macrófago.

A principal diferença entre essas formulações está na estrutura e na forma como são administradas. A AmB-D é a formulação tradicional da anfotericina B. É solubilizada em um composto chamado desoxicolato para ser administração por via intravenosa. A AmB-D é eficaz contra fungos, mas tem o efeito colateral conhecido como nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, o que limita sua aplicação em pacientes com função renal comprometida. Já a AmB-L é encapsulada em lipossomas e administrada por via intravenosa. Uma vantagem dessa formulação é que a presença dos lipossomas reduz a toxicidade renal associada à AmB-D, tornando-a menos prejudicial aos rins. Como resultado, a AmB-L é geralmente indicada em pacientes com risco aumentado de toxicidade renal (MS, 2017).

A anfotericina B em sua forma lipossomal, é utilizada como fármaco de segunda opção no tratamento da leishmaniose visceral e apresenta altas taxas de cura, no entanto tinha um elevado custo de tratamento (Murray, 2001; Sundar *et al.*, 2010). Entretanto, no ano de 2007, a Organização Mundial de Saúde informou uma considerável diminuição do valor do fármaco, para que pudesse ser fornecida nos serviços de saúde pública de países onde a LV é endêmica (Chappuis *et al.*, 2007). Mas ainda assim o tratamento continua oneroso.

A Anfotericina B tem sido usada como fármaco de segunda escolha em sua forma lipossomal, quando os antimoniais falham ou não podem ser utilizados, como em situações de comorbidades, idade, gravidez, por ser um medicamento menos nocivo que os antimoniais pentavalentes e miltefosina (MS, 2016). Este fármaco diminui os efeitos colaterais e apresenta excelentes índices de eficácia terapêutica, inclusive em indivíduos sem resposta ao tratamento com antimoniais (Paula *et al.*, 2003).

Além disso, as formulações da Anfotericina B estão associadas a um maior risco de efeitos adversos gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia. Esses efeitos

colaterais podem ser limitantes para alguns pacientes, levando à interrupção do tratamento ou à necessidade de redução da dose (Patel et al., 2014).

Outro ponto negativo é a possibilidade de interações medicamentosas com a Anfotericina B. Certos medicamentos podem afetar a absorção, distribuição ou metabolismo da Anfotericina B, reduzindo sua eficácia terapêutica ou aumentando o risco de efeitos adversos (Branson et al., 2013).

Este fármaco demonstra imenso benefício, pelo fato de não possibilitar acúmulo plasmático quando administrados em doses diárias, e seus efeitos colaterais mais constantes acontecem principalmente quando há infusão venosa (Stone et al., 2016). Dentre esses efeitos colaterais mais constantes, estão: febre, náuseas, vômitos, calafrios, hipotensão ou hipertensão, comprometimento da função renal e redução de níveis séricos de potássio. Alguns efeitos divergentes menos presentes, só que contra indicam a sua utilização são: anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (Brajtburg & Bolard, 1996; MS, 2007).

Outro fármaco ainda utilizado para o tratamento da LV é a paromomicina, desenvolvida inicialmente na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) em 1963. A paromomicina é um dos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos mais utilizados, também conhecida como aminosidina. Produzida a partir da bactéria *Streptomyces rimosus*, é eficaz no tratamento de infecções bacterianas e demonstra uma capacidade de inibição do crescimento de diversos microrganismos, incluindo protozoários do gênero *Leishmania spp.* (Iraji e Sadeghinia, 2005).

É o único aminoglicosídeo com atividade anti-*Leishmania* clinicamente significativa (Sundar e Chakravarty, 2008; Chew e McCarthy, 2017), atuando por meio da interferência na síntese de proteínas e alterando a fluidez da membrana celular, o que provoca interferência na função ribossômica e incomoda o potencial de membrana mitocondrial no microrganismo (Fernández, Malchiodi e Algranati, 2011).

Embora a paromomicina tenha sido licenciada em 2006 para o tratamento da LV na Índia, sua eficácia continua sendo limitada como monoterapia em países da África Oriental (Matos et al., 2020). No entanto, a paromomicina pode ser benéfica devido à sua administração por um período mais curto, segurança comprovada e eficácia em pacientes pediátricos. Em 2010, a OMS recomendou o uso de paromomicina em combinação com outros medicamentos, como antimoniais pentavalentes e anfotericina B em sua forma lipossomal, para o tratamento da LV em humanos, especialmente em regiões como África e Europa (WHO, 2010).

Entretanto, no Brasil, a paromomicina não é rotineiramente utilizada devido a amplas variações na eficácia de seu tratamento, tanto entre diferentes regiões como dentro de uma mesma região (Ramirez et al., 2017). Devido à sua eficácia limitada como monoterapia, tem sido realizada pesquisas para melhorar a eficiência da paromomicina, como a produção de formulações em microesferas, lipossomas e nanopartículas, com objetivo de superar as limitações do uso convencional e diminuir os efeitos colaterais e toxicidade local (Matos et al., 2020).

Outro fármaco utilizado é a pentamidina, uma diamidina aromática que foi originalmente sintetizada na década de 1940 e encontrou uso principalmente no tratamento da tripanossomíase africana, bem como na LV e LC. Embora tenha sido considerada uma alternativa terapêutica para casos de leishmaniose não responsivos aos antimonialis, a pentamidina apresenta efeitos colaterais adversos significativos e sua administração é parenteral. Seus mecanismos de ação incluem inibição do metabolismo mitocondrial, interferência na replicação e transcrição em nível mitocondrial, (Basselin et al., 2002; Coelho et al., 2003; Silva-López., 2010; Kumar e Singh., 2012;). Existem duas formulações de pentamidina disponíveis: mesilato de pentamidina (Lomidine®) e isotionato de pentamidina (Pentacarinat® ou Pentam®), sendo esta última, a única comercializada no Brasil. (Frézard et al., 2009).

A pentamidina é administrada por via intravenosa em dias alternados, mas seu uso é limitado devido aos efeitos adversos graves, como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal (Neves Lo et al., 2011). Ademais, a pentamidina tem sido rejeitada nos últimos anos em razão de outras terapias por causa da sua alta toxicidade, resistência de parasitos e sérios efeitos colaterais, especialmente na Índia. (Piccica et al., 2021).

A miltefosina foi descoberta em 1987, onde pela primeira vez, cientistas evidenciaram a ação leishmanicida da miltefosina sobre *L. donovani* (Hart; Coombs, 1982; Croft e Coombs, 2003). Sua primeira atuação anti-*Leishmania* é resultante da modulação dos receptores de superfície celular, do metabolismo do inositol, da ativação da fosfolipase e da proteína quinase C, além das vias mitogênicas, seguindo em apoptose celular (Verma et al., 2004).

Como os demais medicamentos, a miltefosina também possui alguns efeitos colaterais que incluem, os distúrbios gastrointestinais: transitórios ou reversíveis (Sundar et al., 2007). No entanto, sua utilização não dispõe de registro sanitário ativo na Anvisa e o seu uso no Brasil, não é aprovado em seres humanos (Anvisa, 2023). Entretanto esse

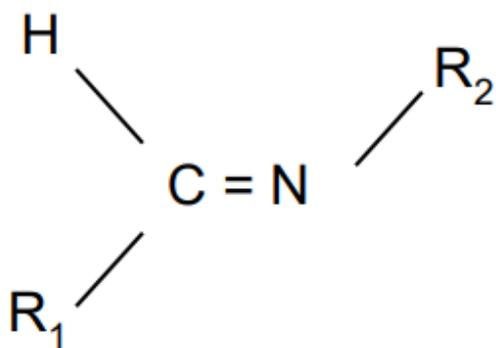
fármaco provém de alguns benefícios como, o custo, sua aplicação ser feita por via oral e a duração definida do tratamento, o que levam a favor da utilização da miltefosina no tratamento da LV (Sundar e Chakravarty, 2015).

Sendo assim, levando em consideração que esses medicamentos não apresentam êxito e apontam alta toxicidade no tratamento terapêutico dessa doença, a OMS apoia o estudo e a busca por outros compostos que possam abrir novas possibilidades para a elaboração de fármacos mais eficazes (Richter e Eger, 2018). Além de que, a ausência de uma vacina eficaz contra a LV humana, traz a necessidade emergente de fármacos mais eficientes e que estejam aptos a somar ou até mesmo suceder os medicamentos de uso frequente no tratamento da doença (Rocha *et al.*, 2005).

Uma alternativa é o aperfeiçoamento de compostos químicos sintéticos e seus derivados, que representam uma forte estratégia na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que, estes compostos nos disponibilizam maior capacidade de produção industrial por meio de sínteses químicas, bem como uma redução do custo (Tiuman, *et al.*, 2011).

Neste cenário, diversos compostos químicos sintéticos têm sido estudados como potenciais fármacos contra as leishmanioses, destacando as aldiminas, pois tais compostos já apresentaram atividade antifúngica, antibacteriana e anti-tripanicida, bem como atividade farmacológica para antidiabetes, antiviral, anti-Alzheimer (Debache *et al.*, 2009; Edraki *et al.*, 2009; Al Kahraman *et al.*, 2010; Reimão *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2013).

As aldiminas são também conhecidas como bases de Schiff, e compreendem uma das classes mais valiosas de substâncias orgânicas (Schiff, 1864). São compostos obtidos por meio de condensação entre aldeídos e aminas primárias e apresentam diversas aplicações nos campos da química (Khan *et al.*, 2020).



$\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{Alquil ou Aril}$

Figura 2: Estrutura Geral das Aldiminas (da Silva et al., 2011b).

A síntese clássica das aldiminas, conforme descrita por Schiff, envolve a condensação sob destilação azeotrópica, que ajuda a remover a água residual produzida durante a reação. Esse método permite a obtenção de aldiminas a partir de uma ampla variedade de substratos (da Silva et al., 2011a).

Dessa forma, a busca por novas abordagens na síntese orgânica e desenvolvimento de novas metodologias, visando a obtenção de moléculas inéditas de forma mais rápida e econômica, além de reduzir o impacto ambiental, tem facilitado a exploração dessas reações. No entanto, são necessários estudos adicionais para comprovar a eficácia desses compostos, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*.

Nesse sentido, o presente estudo busca avaliar a citotoxicidade e o potencial leishmanicida de compostos químicos sintéticos derivados de aldiminas através de metodologias modernas como a citometria de fluxo. Os resultados aqui gerados poderão abrir novas perspectivas para o avanço no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LV, além do desenvolvimento de metodologias *in vitro* mais acuradas e dinâmicas para o reconhecimento e direcionamento de potenciais drogas anti-LV e que possam direcionar para o prosseguimento de quimioterapia experimental *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade de moléculas químicas sintéticas derivadas de aldiminas (3D7 e 3H8) em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e a capacidade leishmanicida destas moléculas em macrófagos infectados por *L. infantum* transfectadas com o gene repórter GFP⁺.

2.2 Objetivos específicos

1 - Avaliar a citotoxicidade dos diferentes compostos derivados de aldiminas (3D7 e 3H8) em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7;

2 - Determinar o IC₅₀ dos diferentes compostos químicos derivados do grupo das aldiminas;

3 - Avaliar a inibição da infecção de formas promastigotas em macrófagos RAW 264.7 utilizando parasitos de *L. infantum* OP46 GFP⁺ tratados com os diferentes compostos;

4 - Avaliar a atividade leishmanicida destes compostos contra as formas amastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ em macrófagos murinos RAW 264.7;

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos compostos químicos sintéticos

Os compostos químicos sintéticos derivados das aldiminas utilizados nos experimentos foram cedidos pelo professor Ângelo de Fátima, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Nesta monografia foram testados 2 compostos químicos sintéticos derivados das aldiminas, demonstrados pelas siglas: **3D7** e **3H8**.

3.2 Diluição dos compostos químicos sintéticos

Após disponibilização, os compostos químicos, foram conservados a temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Os compostos foram devidamente pesados e em seguida solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). As diluições foram feitas em meio RPMI 1640 10% de soro fetal bovino (SFB) (Rowell Park Memorial Institute) (pH 7,2 – 7,4) de forma a alcançar amostras nas seguintes concentrações: C₁: 500 µg/mL; C₂: 400 µg/mL; C₃: 300 µg/mL; C₄: 200 µg/mL; C₅: 100 µg/mL; C₆: 50 µg/mL; C₇: 25 µg/mL; C₈: 12,5 µg/mL; C₉: 6,25 µg/mL; C₁₀: 3,125 µg/mL; C₁₁: 1,5625 µg/mL; C₁₂: 0,78125 µg/mL; C₁₃: 0,390635 µg/mL.

Para Anfotericina B (Anf-B), as diluições também foram realizadas em meio RPMI 1640 10% SFB com o objetivo de conseguir amostras nas concentrações: C₄: 200 µg/mL; C₅: 100 µg/mL; C₆: 50 µg/mL; C₇: 25 µg/mL; C₈: 12,5 µg/mL; C₉: 6,25 µg/mL; C₁₀: 3,125 µg/mL; C₁₁: 1,5625 µg/mL; C₁₂: 0,78125 µg/mL; C₁₃: 0,390635 µg/mL. Para as análises, foi usado uma dose de 4 µg/mL de Anf-B como dose de referência (Salomão, 2016).

3.3 Manutenção células murinas da linhagem RAW 264.7

As células murinas da linhagem RAW 264.7 foram gentilmente cedidas pelo professor Luis Carlos Crocco Afonso do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Elas foram mantidas no Laboratório de Imunopatologia/NUPEB/UFOP e conservadas em nitrogênio líquido no criobanco até o momento de uso. Para sua utilização, as células, eram cultivadas em garrafas de cultura (Thermo Scientific Nunc) de 100mL contendo 10mL de meio RPMI 1640 10% de SBF e gentamicina (Sigma-Aldrich) e deixadas em estufa de CO₂ a 37°C. As células formavam um tapete contínuo nas garrafas ao fundo, o que pôde ser observado em microscópio invertido.

Para manutenção das células, a cada três dias, o meio RPMI 1640 10% SBF era trocado. Além disso, as garrafas eram monitoradas em dias alternados de forma macroscópicas com o objetivo de observar as contaminações como presença de partículas suspensas ou turbidez do meio. E microscopicamente, eram observados o crescimento celular e a morfologia indicada para cada linhagem.

Todo manuseio das células foi feito em capela de fluxo laminar (Bio Seg 12 – Grupo Veco). Com o intuito de evitar qualquer tipo de contaminação, antes de cada experimento, as cabines eram colocadas em execução por 10 minutos para esterilização da atmosfera interna e posteriormente, 20 minutos com a luz ultravioleta ligada com os materiais usados no experimento. Todos os materiais foram esterilizados com álcool 70% antes de serem colocados na capela.

Os repiques eram feitos através do atrito mecânico com *cell scraper* para ampliação das células, e feita a transferência do sobrenadante na concentração 1×10^5 células/mL para garrafas de 500 mL com 100 mL do meio RPMI 10% SFB e mais uma vez, mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ para crescimento.

3.4 Determinação da concentração celular a ser utilizada nos experimentos

Para determinação da concentração celular, o sobrenadante exaurido era desprezado, eliminando dessa forma as células não aderidas ou mortas. Dessa forma, foi acrescentado 30 mL de RPMI 1640 10% SFB, cobrindo o fundo da garrafa e as células foram raspadas com *cell scraper* e transferidas para um tubo cônico graduado de 50 mL, logo após foram centrifugadas a 1300 rpm por 7 minutos a 4°C. Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante foi dispensado e adicionado 10 mL de RPMI 1640 10% SFB. Foi feita uma contagem das células viáveis em câmara de Neubauer, para calcular a concentração a ser usada. As células foram previamente diluídas em azul de tripan, marcando células inviáveis ou mortas. Após a contagem, as células foram ajustadas na concentração de 1×10^6 /mL e plaqueadas com o volume final de 100 µL por poço.

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 pela metodologia de MTT

Para a avaliação de citotoxicidade dos compostos 3D7 e 3H8, utilizamos a técnica de MTT. Após o item 3.4, as células foram adicionadas com um volume de 100 µL de células em placas de cultura de 96 poços (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates; Thermo Fisher; Catalog number: 243656) com fundo reto e deixadas por 3 horas em estufa de CO₂ a 37°C para adesão destas ao fundo da placa.

Posteriormente a esse período de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 50 μ L de RPMI 10% SFB mais 50 μ L dos compostos químicos nas concentrações testadas em cada poço (C₁₃ até C₁). As placas foram incubadas na estufa CO₂ a 37 °C pelos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após o período de incubação de cada placa no seu tempo, a viabilidade das células foi analisada pela diminuição metabólica do brometo de 3,4,5-dimetil-2-triazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O sobrenadante foi removido com cuidado, para não retirar as células do fundo do poço, e adicionados 100 μ L de RPMI/SFB 10% mais a solução de MTT na concentração de 2 mg/mL. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por mais 4 horas em estufa CO₂ a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 60 μ L de SDS 10% em HCl 0,01 M (SDS-HCl) em cada poço e a placa foi novamente incubada *overnight* na mesma estufa. Após o período de incubação, a leitura da absorbância foi medida em espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA com um comprimento de onda de 490 nm. Os experimentos foram realizados três vezes e os compostos analisados sempre em triplicata.

3.6 Cultivo das promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺

Os parasitos de *L. infantum* OP46 GFP⁺ (MCAN/BR/2008/OP46 GFP⁺) são mantidos no criobanco, congelados com nitrogênio líquido no LIMP localizado no NUPEB na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Todos os experimentos foram direcionados de forma similar, sempre descongelando os criotubos, repicando os parasitos para o crescimento em meio LIT suplementado com 20% de SBF em erlenmeyers estéreis e repicados em sua fase estacionária a cada três dias. No decorrer do período de cultivo, as culturas eram analisadas em microscópio ótico em relação à motilidade, ausência de agentes infectantes e morfologia, e só após eram feitos novos repiques com novo meio de cultura e vidrarias.

As culturas eram então repicadas para outros erlenmeyers na proporção de 1 mL de cultura com 10⁷ a 10⁸ promastigotas/mL e acrescidos a 3 mL de meio LIT. Os parasitos foram novamente repicados após três dias e adicionado 10 mL de meio LIT ao erlenmeyer. Em seguida, após três dias de cultivo, as culturas foram repicadas mais uma vez e movidas para novos erlenmeyers estéreis, numa medida de 10 mL de cultura de *Leishmania* para 30 mL de meio LIT, conservadas em condições iguais por mais sete dias.

3.7 Inibição da infecção dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ pré-tratados

Para avaliação da inibição da infecção dos macrófagos murinos RAW 264.7, os parasitos foram preparados para contagem em formalina em câmara de Neubauer, ajustados na concentração de 1×10^7 parasitos/mL e incubados em tubos de polipropileno de 5 mL, pelo tempo de uma hora na estufa BOD de $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com a presença dos compostos nas concentrações de IC₅₀ e IC₅₀ 50%. Após o período de uma hora, as células RAW 264.7 foram inseridas nos tubos na concentração de 1×10^6 células/mL e colocados em estufa de CO₂ a 37°C pelos tempos de 24,48 e 72 horas. Após os períodos de incubação, os tubos foram retirados da estufa e suspensão foi transferida para os tubos com fundo redondo de poliestireno 5 mL, centrifugados a 1700 rpm, pelo tempo de 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi vertido, o *pellet* foi ressuscitado e acrescentado 2 mL de PBS 1X estéril. Seguidamente foi realizada nova centrifugação, nas mesmas condições. Por fim, para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur®, foi adicionado 200 µL de PBS 1X estéril.

3.8 Tratamento dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺

Para avaliação da atividade leishmanicida, os parasitos foram contados na câmara de Neubauer por meio de centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos na temperatura de 23°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* com os parasitos foi ressuscitado em meio RPMI 1640 10% SFB, a uma concentração final de 1×10^6 parasitos/mL.

As células foram preparadas e contadas em câmara de Neubauer com azul de Tripan e sua concentração ajustada ao volume final de 1×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 10% SFB, por meio da centrifugação à 4°C , 1700 rpm pelo tempo de 7 minutos.

As células e os parasitos foram colocados em contato em tubos de polipropileno de 5 mL por 24 horas para internalização dos parasitos em estufa CO₂ a 37°C . Após esse período de 24 horas de contato das promastigotas com as células, foi realizada uma lavagem com PBS 1X estéril para retirar as promastigotas não internalizadas. Então os compostos foram aplicados nas concentrações de IC₅₀ e IC₅₀ 50%, e novamente

armazenados na mesma estufa. Após os tempos de incubação (24, 48 e 72 horas), os tubos foram retirados da estufa, centrifugados a 1700 rpm, na temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pallet* homogeneizado. Em seguida foram lavados com PBS 1X estéril e levados para leitura e avaliação da redução da taxa de infecção dos macrófagos, em citômetro de fluxo FACScalibur®, (Becton Dickinson).

As informações foram adquiridas pelo programa CellQuest®, por meio da obtenção de 20mil eventos por tubo e analisados usando o software FlowJo® (Becton Dickinson). Todos os experimentos foram executados em triplicata de tubos e duplicata de experimentos.

3.9 Análises estatísticas

A realização dos testes estatísticos foi desenvolvida com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As análises dos testes de infecção e tratamento foram realizadas com o auxílio do teste two-away ANOVA empregando múltiplas comparações pelo teste de Tukey, seguido pelo Teste t múltiplos. Os valores de IC₅₀ foram calculadas utilizando dose-resposta sigmóides. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicata, que apresentaram resultados semelhantes. As diferenças com valores de “*p*” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

4. RESULTADOS

Os resultados deste estudo expõem um conjunto de dados da avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de compostos químicos sintéticos derivados das aldiminas 3D7 e 3H8. Esses resultados têm o potencial de impulsionar novos estudos, conduzir e orientar pesquisas futuras no campo do tratamento da leishmaniose visceral.

Visando facilitar a leitura e entendimento dos resultados, primeiramente descreveremos os testes de citotoxicidade executados através da metodologia tradicional de MTT. Onde encontramos e determinamos os valores de IC₅₀ a serem utilizados nos experimentos posteriores. Consequentemente, descreveremos os resultados das

avaliações de atividades leishmanicida com o pré-tratamento das formas promastigotas antes da infecção em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

E por último discorreremos sobre o tratamento dos macrófagos infectados com as formas amastigotas. Em ambos os experimentos, utilizamos o tratamento com os compostos químicos sintéticos derivados das aldiminas 3D7 e 3H8 em três tempos diferentes (24, 48 e 72h) utilizando as concentrações de IC_{50} e IC_{50} reduzido a 50%.

4.1 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 pela metodologia de MTT

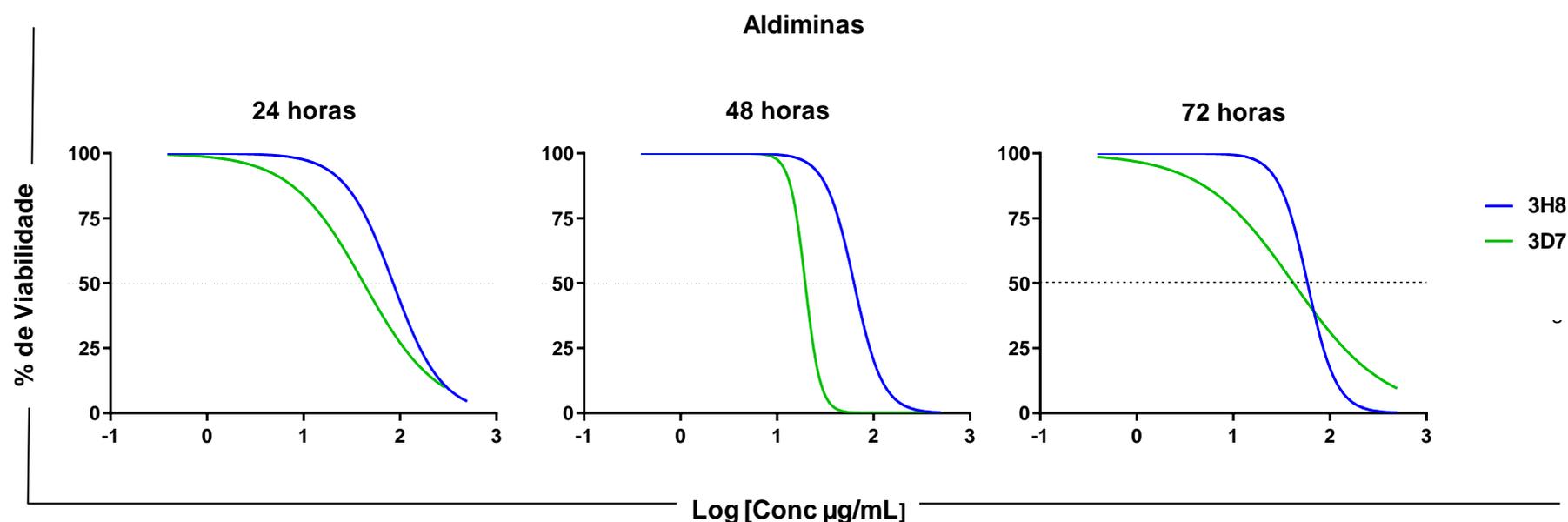


Figura 3: Avaliação do perfil de citotoxicidade das aldiminas em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando a metodologia de MTT. No gráfico, o eixo "y" representa a porcentagem da viabilidade dos macrófagos murinos tratados com diferentes concentrações das aldiminas, com períodos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. No eixo "x", temos o log das concentrações das aldiminas, correspondendo às diluições que variam de C1: 500 µg/mL até C13: 0,1953125 µg/mL. O composto 3H8 está representado pela linha de cor azul e o composto 3D7 está representado pela linha de cor verde e a linha tracejada representa a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de cada composto.

A figura 3 apresenta os resultados do teste de citotoxicidade realizado com a técnica de MTT. O gráfico representa a viabilidade dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 após o período de incubação com os compostos sintéticos derivados de aldiminas durante os tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados são plotados em curvas que representam as diferentes concentrações dos compostos químicos testados (C₁: 500 µg/mL; C₂: 400 µg/mL; C₃: 300 µg/mL; C₄: 200 µg/mL; C₅: 100 µg/mL; C₆: 50 µg/mL; C₇: 25 µg/mL; C₈: 12,5 µg/mL; C₉: 6,25 µg/mL; C₁₀: 3,125 µg/mL; C₁₁: 1,5625 µg/mL; C₁₂: 0,78125 µg/mL; C₁₃: 0,390635 µg/mL).

Esses resultados determinam a concentração inibitória celular (IC₅₀) de cada composto, utilizado em testes de fármacos. A IC₅₀ é a dose capaz de matar 50% das células e quanto maior for o valor da IC₅₀, menos tóxico é o composto. Isso significa que uma alta dose (concentração) é necessária para que o composto seja tóxico para as células. É importante ressaltar que, embora não esteja mostrado na figura, a Anfotericina-B (Anf-B) foi usada como controle positivo nos testes de citotoxicidade, nas mesmas concentrações dos compostos sintéticos (C₄ até C₁₃).

Ao analisar a figura 3, gráfico de 24 horas dos derivados de aldiminas, pode ser observado que o composto 3D7, representado pela linha verde, apresenta alta citotoxicidade com um IC₅₀ de 42,13 µg/mL. Por outro lado, o composto 3H8, exibe uma menor citotoxicidade, com IC₅₀ de 85,16 µg/mL. No período de 48 horas, pode ser observado que o composto 3D7, representado pela linha verde, continua exibindo maior citotoxicidade, semelhante ao observado no período de 24 horas, com um IC₅₀ de 19,61 µg/mL. Quanto ao composto 3H8, ele apresenta valor de IC₅₀ de 62,9 µg/mL. Ao analisar o período de 72 horas, os compostos mostraram valores de IC₅₀ reduzidos, indicando uma maior toxicidade nesse período de avaliação. O composto 3H8 apresentou um IC₅₀ de 58,84 µg/mL e o composto 3D7 mostrou um IC₅₀ de 42,14 µg/mL. Por fim, foi possível constatar que o composto sintético 3H8 apresentou uma menor toxicidade em todos os tempos analisados, quando comparado ao composto 3D7.

4.2 Determinação dos valores de IC₅₀ nos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 a serem utilizados nos experimentos posteriores encontrados pela metodologia de MTT

Após o experimento de citotoxicidade, determinamos quais seriam os valores a serem utilizados como concentração para os seguintes.

Portanto, com o intuito de empregar os resultados obtidos da metodologia de MTT, para a determinação do IC₅₀ de cada composto derivado de aldiminas a ser utilizado nos experimentos subsequentes, utilizamos a média destes valores de IC₅₀ encontrados nos três períodos de avaliação (24, 48 e 72 horas), como demonstrado na tabela 1, a seguir:

Tabela 1: Valores de IC₅₀, representando a concentração inibitória, obtidas nos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 após o tratamento com os compostos químicos derivados de aldiminas, bem como suas médias correspondentes.

IC ₅₀	Aldiminas (µg/mL)	
	3D7	3H8
24 h	42,13	85,16
48 h	19,61	62,9
72 h	42,14	58,84
Média	34,63	68,97

Com o intuito de garantir uma execução mais eficiente dos experimentos subsequentes, procedemos a uma aproximação dos valores de IC₅₀ para torná-los mais precisos. É importante destacar que, em todos os experimentos posteriores, utilizamos as doses de IC₅₀ como concentração e a dose de IC₅₀ reduzida a 50%, correspondendo a 50% dos valores de IC₅₀ alcançados por meio dos resultados de citotoxicidade pelo ensaio MTT. A seguir, são apresentados os valores de IC₅₀ encontrados, bem como suas respectivas reduções:

1) Composto 3D7:

- IC₅₀: 35 µg/mL
- IC₅₀ 50%: 17 µg/mL

2) Composto 3H8:

- IC₅₀: 70 µg/mL
- IC₅₀ 50%: 35 µg/mL

4.3 Infecção de células murinas da linhagem RAW 264.7 utilizando os parasitos de *L. infantum* OP46 GFP⁺ pré-tratados com os compostos derivados das aldiminas

Na tentativa de diminuir a taxa de infecção dos macrófagos como uma ação profilática, realizamos o pré-tratamento dos parasitos com os compostos. Durante uma hora, os parasitos foram expostos a cada composto nas concentrações de IC₅₀ e IC₅₀ 50% e, em seguida, os macrófagos foram colocados em contato. Após os tempos de 24, 48 e 72 horas as leituras foram realizadas em citômetro de fluxo.

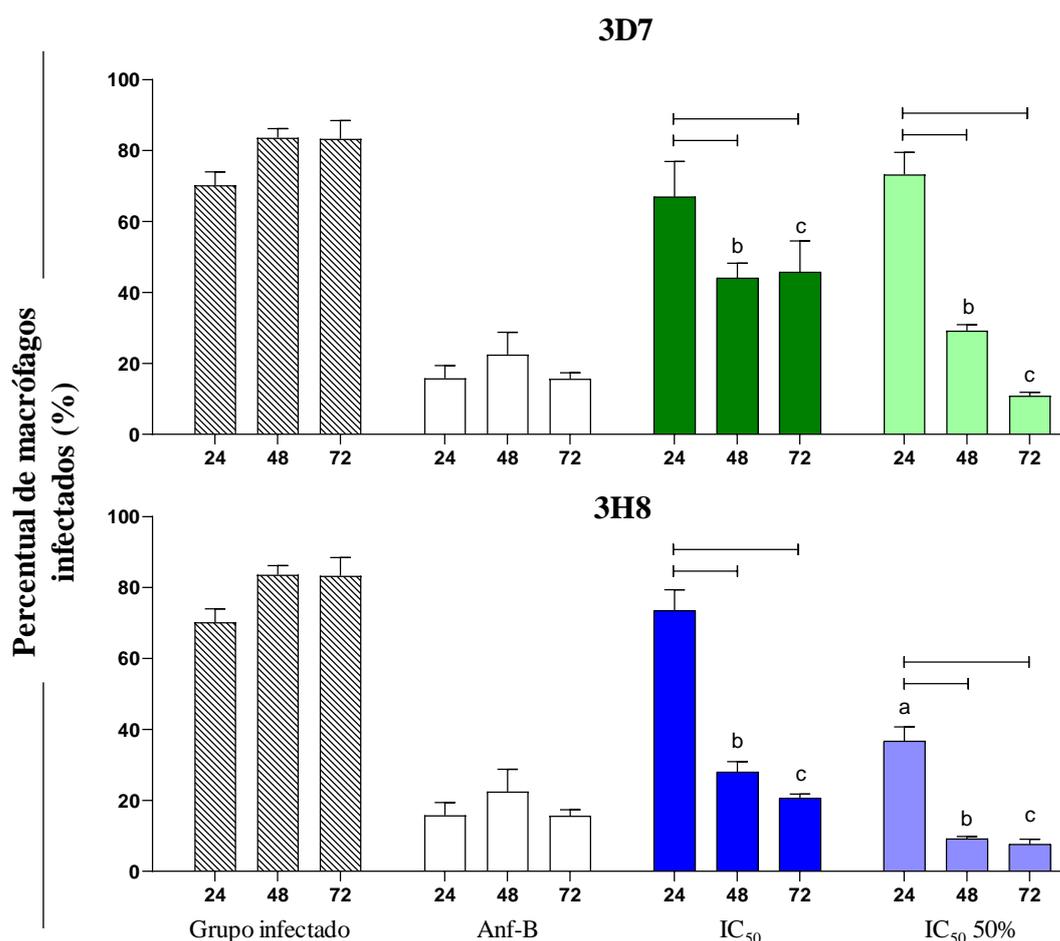


Figura 4: Avaliação da inibição da infecção de macrófagos infectados utilizando promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ pré-tratadas com os compostos sintéticos derivados de aldiminas após os tempos de 24, 48 e 72 horas. Os parasitos foram tratados com os compostos pelo tempo de uma hora e incubados com os macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 na proporção de 1:10. No eixo “y” temos o percentual de macrófagos infectados, e no eixo “x” a concentração utilizada em seus respectivos valores de IC₅₀ e IC₅₀ 50%. As cores verdes em degradê representa o composto 3D7 e as cores azuis em degradê representa o composto 3H8. As letras “a”, “b” e “c” representam a diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle infectado. As linhas conectivas representam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao tempo de exposição ao composto.

Na figura 4, o eixo "y" representa o percentual de macrófagos infectados após a exposição às promastigotas pré-tratadas. No eixo "x", são apresentadas as concentrações de cada composto derivado das aldiminas e sua redução. É importante ressaltar que para cada composto, utilizamos sua própria concentração de IC₅₀, juntamente com a dose reduzida de 50% do IC₅₀. A concentração de Anf-B foi utilizada apenas na concentração de 4 µg/mL.

Dessa forma, observamos que o composto 3D7 no tempo de 24 horas não apresentou redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle infectado de 24 horas. Já nos demais tempos de 48 e 72 horas foi possível observar uma redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle infectado dos respectivos tempos de 48 e 72 horas. De forma interessante, ao avaliarmos a concentração de IC₅₀, notamos que houve uma redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) no tempo de 48 e 72 horas, quando comparados ao tempo de 24 horas, o mesmo acontece com o IC₅₀ reduzido a 50%.

Já para o composto 3H8, observamos que ao utilizar a dose de IC₅₀ no tempo de 24h, não foi possível observar uma redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) quando comparamos ao grupo controle infectado. Para a dose do IC₅₀ do 3H8 reduzido a 50%, observamos uma diminuição do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) quando comparamos ao grupo controle infectado deste mesmo tempo. Nos tempos de 48 e 72 horas ao utilizar ambas as doses de IC₅₀ e IC₅₀ 50% observamos uma redução do percentual dos macrófagos infectados ($p < 0,05$), quando comparamos ao grupo controle infectado desses mesmos tempos. Quando comparamos a dose de IC₅₀ do composto 3H8, observamos que houve uma redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) nos tempos de 48 e 72 horas, quando comparados ao tempo de 24 horas, e ao usar a dose de IC₅₀ 50% também foi possível observar uma redução do percentual de macrófagos infectados ($p < 0,05$) nos mesmos tempos.

4.4 Análise do perfil leishmanicida no tratamento dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com a cepa de *L. infantum* OP46 GFP+

Para avaliar a efetividade terapêutica *in vitro* dos compostos sintéticos derivados das aldiminas em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺, seguimos a técnica de citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como percentual de macrófagos infectados com as amastigotas após o tratamento por 24, 48 e 72 horas.

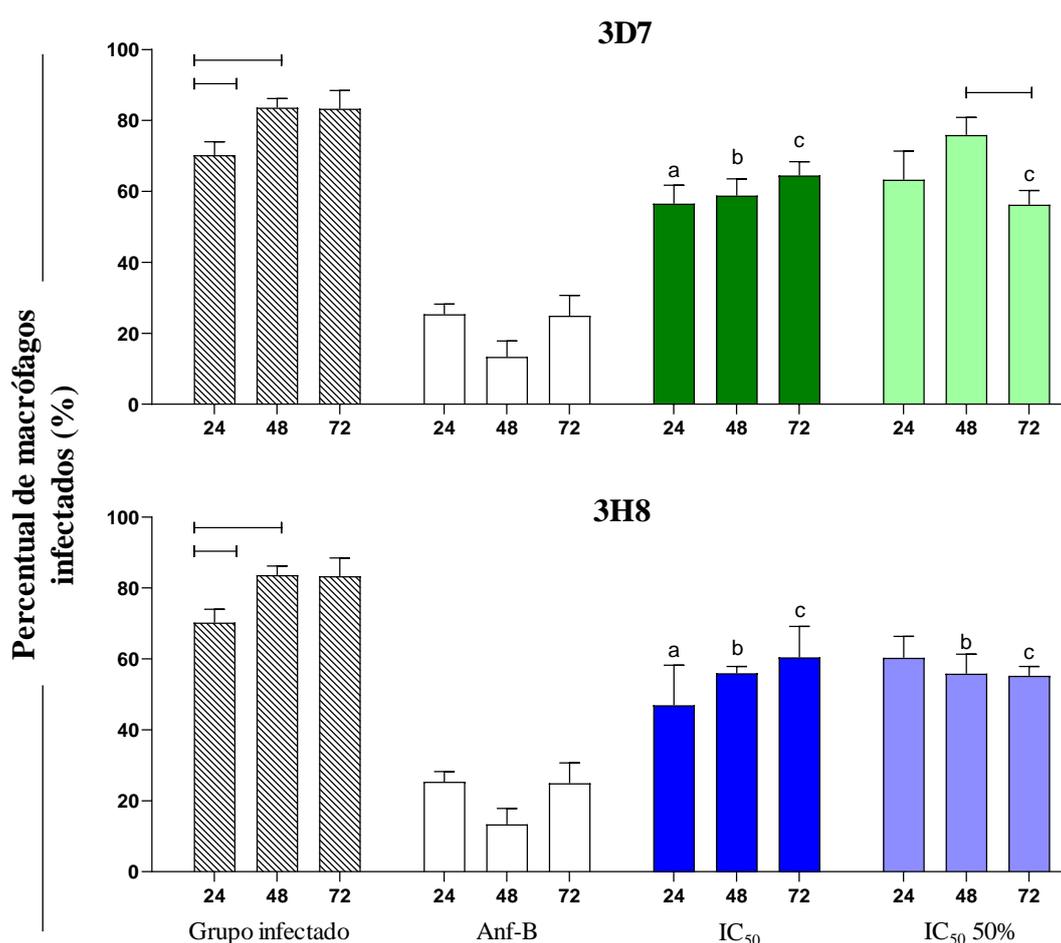


Figura 5: Avaliação do percentual de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados por promastigotas de *L. infantum* OP46 GFP⁺ e tratados com os compostos químicos sintéticos derivados de aldiminas (3D7 e 3H8) nas concentrações (IC₅₀, IC₅₀ 50%) no eixo “y” está representado o percentual de macrófagos infectados e no eixo “x”. está representado os grupos com as concentrações utilizadas de IC₅₀ e IC₅₀ 50%. As cores verdes em degradê representa o composto 3D7 e as cores azuis em degradê representa o composto 3H8. As letras “a”, “b” e “c” representam as diferenças de percentuais estatísticos ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle infectado. As linhas conectivas representam diferença estatística entre os tempos de exposição ao composto.

Ao usar o composto 3D7 (figura 5) na dose de IC₅₀, observamos uma diminuição significativa ($p<0,05$) no percentual de macrófagos infectados em todos os tempos (24, 48 e 72 horas) em comparação ao grupo controle infectado. Nas outras doses de IC₅₀ 50%, essa redução significativa ($p<0,05$) só foi observada no tempo de 72 horas em comparação ao grupo controle infectado. Além disso, notamos que, para o composto 3D7, na dose de IC₅₀ 50%, houve uma redução significativa ($p<0,05$) no percentual de macrófagos infectados nos tempos de 24 e 72 horas quando comparados ao tempo de 48 horas.

No caso do composto 3H8 (figura 5), tanto a dose de IC₅₀ quanto a dose de IC₅₀ 50% tiveram a capacidade de reduzir significativamente ($p<0,05$) o percentual de macrófagos infectados nos três tempos analisados (24, 48 e 72 horas) em comparação ao grupo controle infectado. Em relação à dose de IC₅₀, vemos uma redução significativa ($p<0,05$) no percentual de macrófagos infectados no tempo de 24 horas quando comparados com os tempos de 48 e 72 horas.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças zoonóticas, transmitidas por vetores com um ciclo de transmissão complexo, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. Consideradas um grave problema de saúde pública no mundo e principalmente no Brasil, dentre as formas da leishmaniose, a leishmaniose visceral (LV), uma doença infecciosa sistêmica, se destaca por ser a forma mais grave, afetando 12 milhões pessoas no mundo e mais de 3.500 pessoas no Brasil (OMS, 2023).

Um dos problemas que tem intensificado o cenário da LV globalmente é o crescente número de pacientes que não reagem à quimioterapia convencional tanto com os antimonialis, quanto à anfotericina B, que são medicamentos os mais utilizados (Croft et al., 2006). Os fármacos usados como opção terapêutica para LV geralmente são altamente tóxicos, com elevado custo e têm longos tempos de tratamento (Sundar, 2016). Devido á essas causas, as formas de tratamento podem se diversificar nas distintas regiões atingidas por essa doença (Chakravarty et al., 2010). Diante a esses obstáculos, os pesquisadores procuram novas técnicas de tratamento, como terapias combinadas, imunoterapia e imunoquimioterapia, e por novos compostos como alternativas promissoras para o tratamento da LV. Além disso, cabe ressaltar que, os efeitos colaterais são mais intensos

em crianças e agravam-se em pacientes idosos, havendo também interações medicamentosas com outros fármacos que estes pacientes já utilizam (MS, 2013).

Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho foi testar dois novos compostos químicos sintéticos, visando estes serem uma alternativa para o tratamento da LV. Assim, avaliamos *in vitro*, a citotoxicidade dessas moléculas derivadas de aldiminas (3D7 e 3H8), em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e a capacidade leishmanicida destas moléculas em macrófagos infectados por *L. infantum* transfectadas com o gene repórter GFP⁺.

Estudos *in vitro* representam um passo crucial e essencial na avaliação de novos compostos para, futuramente, vir a se tornar um fármaco de tratamento para a LV. Eles são conduzidos primordialmente para analisar a toxicidade ou dano, genotoxicidade (dano ao DNA) e viabilidade de uma célula. Confrontados aos testes em organismos vivos (*in vivo*), os testes *in vitro* revelam diversas vantagens como menor custo, cenários experimentais controlados, resultados ágeis e sem a necessidade de aprovação de comitês éticos (Croft, et al., 2006).

Nessa perspectiva, iniciamos nossos estudos com ensaios *in vitro* em células murinas para os testes desses compostos. Os valores encontrados em nossa análise, pelo ensaio de MTT, correspondem aos valores de IC₅₀, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, para o composto 3D7 de 42,13 µg/mL; 19,61 µg/mL; 42,14 µg/mL, respectivamente; e para o composto de 3H8, 85,16 µg/mL; 62,9 µg/mL; 58,84 µg/mL, também respectivamente.

No estudo de Costa (2021), foi demonstrada uma análise *in vitro* do potencial leishmanicida de novos derivados sintéticos híbridos isoxazolininas. Com relação à atividade leishmanicida para a espécie de *L. infantum*, a molécula 3G foi a que apresentou o menor valor de IC₅₀ (13,06 µg/mL) para a promastigota. Diante disso, novamente nossos resultados alcançados em nosso trabalho, se mostram aptos e reprodutíveis, demonstrando assim a efetividade dos experimentos realizados. Levando em consideração que quanto maior for o valor de IC₅₀, menos tóxico é o composto, nossos resultados se mostraram mais eficazes e com menor citotoxicidade, com perspectivas de evoluir para testes *in vivo* (FIOCRUZ, 2009).

A citometria de fluxo analisa as características físicas e químicas de células isoladas, dentre suas inúmeras aplicabilidades, mede a dispersão e a fluorescência para estabelecer um conjunto de propriedades celulares únicas. A citometria de fluxo é utilizada em muitas áreas da ciência e pode identificar vários subconjuntos fenotípicos de uma mistura, selecionar uma única célula e até mesmo isolar essa célula por um processo

chamado classificação celular (Robinson, 2022). A criação a *Leishmania* geneticamente modificada através da fluorescência, esta utilizada em nosso trabalho e, seu uso nos experimentos de fármacos *in vitro* por meio da citometria de fluxo, faz-se indispensável de modo a aumentar a credibilidade, reprodutibilidade, segurança, percepção, viabilizando e permitindo a triagem em larga escala de fármacos mais modernos (Serenio et al., 2007).

Dessa forma, em um estudo de Tavares e colaboradores (2019), utiliza-se de metodologias convencionais como a microscopia óptica, o que aumenta as tendências de possíveis erros de contagem. Entretanto, estudos já descritos na literatura comprovam que a citometria de fluxo descomplica e aperfeiçoa o processo dessas contagens, permitindo um resultado eficaz, bem como uma análise dos efeitos e funcionamento dos compostos sobre as formas amastigotas das diversas espécies de *Leishmania* em macrófagos. Evidenciando que nosso trabalho corrobora com a literatura descrita de uma tecnologia moderna e sem muitos vieses (Plock et al., 2001).

Diante do relato, nota-se que nosso estudo está em concordância com a literatura, que com intuito de demonstrar a redução da taxa de infecção dos macrófagos, tanto no experimento onde utilizamos o pré-tratamento dos promastigotas, quanto o de macrófagos infectados com amastigotas. Entretanto, nos estudos com compostos com potencial anti-*Leishmania*, não houve um acordo sobre o tempo ideal para experimentos no tratamento *in vitro*, sendo 24 horas, 48 horas (Reimão et al., 2010; Maia et al., 2013) ou 72 horas (Rathelot et al., 2002; Tasdemir et al., 2006; Palit & Ali, 2008). Sendo, por isso, demonstrado em todos os tempos em nosso trabalho.

Em nosso trabalho, buscamos o potencial leishmanicida de derivados das aldiminas, uma importante classe de substâncias orgânicas para obtenção de moléculas inéditas de forma mais rápida e econômica por meio de condensação entre aldeídos e aminas. Os resultados deste estudo correlacionam com outros experimentos *in vitro* que obtiveram produtos de potencial leishmanicida dos compostos sintéticos derivados das aldiminas em promastigotas de *Leishmania* (Palit & Ali, 2008; Al-Kahraman et al., 2010; Remião et al., 2010).

No estudo, Salomão (2016) sobre a avaliação *in vitro* do potencial leishmanicida de derivados de aldiminas e adutos de Hantzsch, os resultados obtidos destacam, que a ação leishmanicida dos compostos ocorreu logo após as 24h de tratamento sendo mais evidenciada no tempo de 72h de contato com as aldiminas (3H8 e 3G2), a viabilidade das promastigotas foi reduzida acima de 50%. Para a avaliação *in vitro* o tratamento com os

diferentes compostos químicos foi avaliado pela análise microscópica e citometria de fluxo em 24, 48 e 72h e os resultados encontrados foram semelhantes entre as duas metodologias. Foi observado redução no percentual de infecção principalmente após 48h. Os compostos 3H8, 3H9 e 3D7 apresentaram reduções maiores na taxa de infecção, próximas ao grupo controle tratado com Anf-B. Bem como em os nossos resultados aqui já relatados, os resultados *in vitro* de Salomão demonstram baixa citotoxicidade e boa atividade leishmanicida, tanto em promastigotas quanto em amastigotas de *L. infantum*. Nesse contexto, os nossos estudos sobre as aldiminas também se mostraram eficientes, onde, os compostos 3D7 e 3H8, além de apresentarem baixa citotoxicidade, demonstraram alta capacidade leishmanicida. Logo, o arsenal de dados obtidos nos dois trabalhos sugere que os compostos derivados das aldiminas são, de fato, compostos que devem ser desenvolvidos para estudos experimentais *in vivo* contra LV.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados *in vitro* confirmam que os compostos 3D7 e 3H8, além de apresentarem baixa citotoxicidade, demonstraram alta capacidade leishmanicida em células murinas RAW 264.7. Com base nesse conjunto de informações, recomenda-se que estes compostos devem ser classificados como possíveis fármacos para estudos quimioterápicos experimentais *in vivo* para o tratamento da leishmaniose visceral.

7. REFERÊNCIAS

AL-KAHRAMAN, Y. M. S. A. et al. Antileishmanial, Antimicrobial and Antifungal Activities of Some New Aryl Azomethines. **Molecules**, v. 15, n. 2, p. 660–671, 28 jan. 2010.

ALVAR, J. et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, abr. 2008.

ANDRADE NETO, V. V. et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. **ARCA: Home**. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/>>., 2018.

AZAS, N. et al. Leishmania infantum Promastigotes: Flow Cytometry as a Possible Tool for Assessing the Effects of Drugs on Cellular Functions. **Experimental Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 1–7, 1 set. 1997.

BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 1 set. 2004.

BASSELIN, M. et al. Resistance to Pentamidine in Leishmania mexicana Involves Exclusion of the Drug from the Mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3731–3738, 1 dez. 2002.

BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. **Leishmania: Sex, lies and karyotype**. v. 8, n. 5, p. 174–177, 1 maio 1992.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 1 set. 2004.

BHAT, K. et al. Synthesis and characterization of various Schiff bases for non-linear optical applications. **Materials chemistry and physics**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 1996.

BRAJTBUR, Janina; Bolard, Jacques. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 512-531, 1996.

BRANSON BM, et al. (2013) Oral amphotericin B: time for a hard pill to swallow? **Clin Infect Dis**. 57(9):1263-5.

- CHALFIE, M. Green fluorescent protein. **Photochemistry and photobiology**, v. 62, n. 4, p. 651–6, 1995.
- CHAPPUIS, F. ET AL. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews; Microbiol**, v. 5, p. 57-516, 2007
- CHEW, Rusheng; McCarthy, James S. Paromomycin. In: Kucers' The Use of Antibiotics. **CRC Press**, p. 3149-3161. 2017.
- CIMERMAN, Zvezdana; GALIC, Nives; BOSNER, Branka. The Schiff bases of salicylaldehyde and aminopyridines as highly sensitive analytical reagents. **Analytica Chimica Acta**, v. 343, n. 1-2, p. 145-153, 1997.
- COELHO, Adriano C.; Beverley, Stephen M.; et al. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *L. major*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 130, n. 2, p. 83-90, 2003.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advancing the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 502-508, 2003.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 399, 2006a.
- CROFT, S.L.; BARRETT, M.P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.
- CROFT, SIMON L.; SUNDAR, SHYAM; FAIRLAMB, ALAN H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006b.
- DA SILVA, C. M. ET AL. Schiff bases: a short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced research**, v. 2.1, p. 1-8, 2011a.
- DA SILVA, C. M. ET AL. Synthesis of aryl aldimines and their activity against fungi of clinical interest. **Chemical biology & drug design**, v. 78, n. 5, p. 810-815, 2011b.
- DEBACHE, A. ET AL. An efficient one-step synthesis of 1, 4-dihydropyridines via a triphenylphosphine-catalyzed three-component Hantzsch reaction under mild conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 37, p. 5248-5250, 2009.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 27:305-318, 2004.

EDRAKI, N.; MEHDIPOUR, A. R.; KHOSHNEVISZADEH, M.; MIRI, R. Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 21, p. 1058-1066, 2009.

ELZA, S. Variantes no gene MBL2 codificador da Lectina Ligante de Manose (MBL): implicações na leishmaniose visceral humana. **Uerj.br**, 2024.

Estudo in vitro revela composto com alta atividade e seletividade contra o T. cruzi.

Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/estudo-in-vitro-revela-composto-com-alta-atividade-e-seletividade-contr-o-t-cruzi>>. Acesso em: 23 de fev. 2024.

FEIGAL, R. J. ET AL. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. **Archives of oral biology**, v. 30, n. 8, p. 609-613, 1985.

FERNÁNDEZ, M. M.; Malchiodi, E. L.; Algranati, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 86–93, 2011.

FOUCHET, P., JAYAT, C., HÉCHARD, Y., RATINAUD, M. H., & FRELAT, G. **Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology.** *Biology of the Cell*, 78(1-2), 95-109, 1993.

FREITAS, C. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of β -acetyl-digitoxin, a cardenolide of *Digitalis lanata* potentially useful to treat visceral leishmaniasis. v. 28, p. 38–38, 14 abr. 2021.

FRÉZARD, Frédéric; Demicheli, Cynthia; Ribeiro, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 224-230, 2004.

GIL, Antonio Carlos. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. 12. reimpr. **São Paulo: Atlas**, 2010.

GOYAL, N; Gupta D. Amphotericin B formulations: A comparative review of liposomal, colloidal, and lipid-complexed forms. **Indian J Pharm Sci**, 78(1):3-12, 2016.

HART, D. T.; Coombs, G. H. *Leishmania mexicana*: Energy metabolism of amastigotes and promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 54, n. 3, p. 397–409, 1982.

- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 99, n. 1, p. 3-9, 2005.
- ISTANBULLU, Huseyin et al. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of novel thiazolopyrimidine derivatives as antileishmanial compounds. *Archiv der Pharmazie*, v. 353, n. 8, p. 1900325, 2020.
- KAFETZIS, D.A. et al. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalente antimony compounds? *International Journal Antimicrobial Agents*, v. 25, n. 1, p. 26-30, 2005.
- KAYE, P.; Scott, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KHAN, Diluar et al. Imine Reductases. *Applied Biocatalysis: The Chemist's Enzyme Toolbox*, p. 135-164, 2020.
- KILLICK-KENDRICK R. Biology of Leishmania in phlebotomine sand fly. In: *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, London, New York & San Francisco, v. 2, p.395-460, 1979.
- KUMAR, V. et al. In vitro antileishmanial activity of thioridazine on amphotericin B unresponsive/ sensitive Leishmania donovani promastigotes and intracellular amastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 257, p. 108688, 1 fev. 2024.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniasis in biology and medicine*, v. 1. 1a ed. Londres: Academic Press, cap. 7, p. 291-364, 1987.
- LAINSON, Ralph. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. 2010.
- LAINSON, Ralph; RYAN, Lee; SHAW, Jeffrey Jon. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

Leishmaniose visceral | DNDi América Latina. Disponível em: <<https://dndial.org/doencas/leishmaniose-visceral/>>. Acesso em: 22 fev. 2024.

M.S. Ministério da Saúde 2017. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. **Brasília: Editora do Ministério da Saúde**, 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf Acesso em 03 ago. 2023

M.S. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: [Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral — Ministério da Saúde \(www.gov.br\)](http://www.gov.br). Acesso em 20 jul. 2023

MAGALHÃES, T. F. F. et al. Cinnamyl Schiff bases: synthesis, cytotoxic effects and antifungal activity of clinical interest. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 490-497, 2020.

MAIA C., MÓNICA NUNES, MÓNICA MARQUES, et al. In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. **Experimental Parasitology**. 135 p (36-41), 2013.

MAIA C.; N. ROLÃO, M. NUNES, L. GONÇALVES, L. CAMPINO. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica** 103 150–155, 2007.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101664, 2020.

MAZIERO, J. et al. Avaliação Da Toxicidade De Nanopartículas De Prata Estabilizadas Com Goma Arábica. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio-api.ipen.br/server/api/core/bitstreams/bf8d1c20-7924-439f-bc9a-14757c2119b6/content>>. Acesso em: 21 fev. 2024.

MEDEIROS, A. C. R.; Roselino, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC**, v. 74, n. 4, 2007.

MENDES, K. D. S.; SILVEIRA, R. C. DE C. P.; GALVÃO, C. M. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 758–764, dez. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2006) de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde**, – 1. ed., 5. reimpr, 2016. Acesso em 10 jul. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, p. 331-335, 2012.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185-2197, 2001.

NEVES, L. O. et al. JUNIOR, GUERRA JA, FERREIRA LC, et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-101, 2011.

OLIVEIRA, MC, AMORIM, RFB, FREITAS, RA, COSTA, ALL. Óbito em caso de leishmaniose cutâneo mucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Parasitol**, v.46, p.231-234, 2004.

OPAS. **Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em 10 jul. 2023.

OPAS. **Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em 19 fev. 2024.

PAHO. **Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em 20 jul. 2023.

PAHO. **Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em 19 fev. 2024.

PALIT, P.; ALI, N. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1, 4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 374-377, 2008.

PATEL GP, et al. Oral amphotericin B: history, controversies, and current guidelines. **J Mycol Med.** 24(2):83-90, 2014.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de Nmetil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365-371, 2003.

PETROIANU, ANDY. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta cir bras**, v. 11, n. 3, p. 157-64. Belo Horizonte, 1996.

PICCICA, MATTEO 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.

PLOCK, ANNICK; SOKOLOWSKA-KÖHLER, WANDA; PRESBER, WOLFGANG. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* Spp. **Experimental parasitology**, v. 97, n. 3, p. 141-153, 2001.

RAMIREZ, MARIA S.; Tolmasky, Marcelo E. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.

RATH. et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: **Estado da Arte. Quim. Nova**, Vol. 26, No. 4, 550-555, 2003.

RATHELOT, P., AZAS, N., EL-KASHEF, H., DELMAS, et al. 1, 3-Diphenylpyrazoles: synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, 37(8), 671-679, 2002.

Recomendação de tratamento da leishmaniose visceral. ANVISA Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>>.

Acesso em 10 jul. 2023.

REIMÃO, J. Q.; SCOTTI, M.T.; TEMPONE, A.G. Anti-leishmanial and anti-trypansomal, activities of 1,4-dihydropyridines in vitro evaluation and structure-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 8044-8053, 2010.

RIBEIRO, J. M. C.; MANS, B. J.; ARCA, B. An insight into the sialome of blood feeding nematocera. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, n. 11, p. 767–784, 2010.

RICHTER, K. W., & EGER, I. Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* de diaminas terpênicas. 2018 Disponível em:

https://siseve.apps.uepg.br/storage/eaic2018/11_Kevin_William_Richter-153618346316120.pdf.

ROATT BM, AGUIAR-SOARES RD, COURA-VITAL W, et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Frontiers Immunology**, v. 13, n. 5, p. 272, 2014.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. V. 42, N. 5, p. 1076–1082, 1998.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6-7, p. 514-535, 2005.

ROCHA, M. N. Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de *L. amazonenses* GFP como modelo para testes quimioterápicos. **Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, MG**, 83 F, 2009.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. (2003). **Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias**. *Material Research*, v. 6, n. 3, p.317-320

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, J.; BRADIERE, A. Mechanism of action of amphotericin

B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 19, p. 195-200, 1986.

SALOMÃO, Neyza Emília de Oliveira. Avaliação in vitro do potencial leishmanicida de derivados de aldiminas e adutos de Hantzsch. 2016.

SANTIAGO, ALEXANDRE SILVA; DA ROCHA PITA, SAMUEL SILVA; GUIMARÃES, ELISALVA TEIXEIRA. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.

SANTIAGO, H. R. Leishmaniose visceral no adulto um relato de caso. **pesquisa.bvsalud.org**, 2021.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: eine neue Reihe organischer Basen. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 131, n. 1, p. 118-119, 1864.

SEGURA, Daniel F. et al. Síntese e avaliação biológica de compostos ternários de prata contendo ligantes quelantes de N, N e tiourea: estrutura de raios X de [$\{Ag(bpy)(\mu-tu)\}_2(NO_3)_2$] (bpy= 2, 2'-bipiridina; Tu= tiourea). **Poliedro**, v. 79, pág. 197-206, 2014.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta tropica**, v. 74, n. 1, p. 25-31, 2000.

SERENO, D; CORDEIRO DA SILVA, A; MATHIEU-DAUDE, F; OUAISSI, A. (2007). Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*. Vol. 56, p. 03-07, 2007.

SHI, LEI et al. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 4, p. 558-564, 2007.

SILVA-LÓPEZ, RAQUEL ELISA DA. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

SINGH, NISHA; KUMAR, MANISH; SINGH, RAKESH KUMAR. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis.** *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 10, p. 307–315, 2004.

STILLER, E. T.; VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. L. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. **Antibiotics Annual**, v. 3, p. 587–591, 1955.

STONE, NEIL RH et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485-500, 2016.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001a.

SUNDAR, S. Treatment of visceral leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 89-92, 2001b.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, 21 dez. 2012.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 3-4, p. 98–109, jun. 2016.

SUNDAR, SHYAM .D., M.D., DIPTI AGARWAL, M.D., MADHUKAR RAI, M.D., AND HENRY W. MURRAY, M.D. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **The new England Journal of Medicine**; v. 362, p.504-512, 2010.

SUNDAR, SHYAM; CHAKRAVARTY, JAYA. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, SHYAM; CHAKRAVARTY, JAYA. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-794, 2008.

SUNTER, JACK; GULL, KEITH. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

T.F.F. MAGALHÃES et al. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticytotoxic agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 137–143, 20 maio 2013.

TASDEMIR, D., KAISER, M., BRUN, R., YARDLEY, V., SCHMIDT, T. J., TOSUN, F., & RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 50(4), 1352-1364, 2006.

TEMPONI, C. L. Estudo histopatológico de leishmaniose com acometimento oral. **repositorio.ufjf.br**, 20 nov. 2019.

THAKUR, C. P. et al. Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 72, n. 6, p. 931, 1994.

TIUMAN, TATIANA S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

VAN GRIENSVEN, JOHAN; DIRO, ERMIAS. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. L.; STILER, E. T. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by streptomyces II. The isolation and properties amphotericins. In: **Antibiotics Annual. New York: Medical Encyclopedia**, p. 581-591, 1956.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

World Health Organization (WHO). Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2018.

World Health Organization (WHO). Report of a meeting of the WHO. **Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 22–26, 2010.

World Health Organization. **Leishmaniasis**, 2021. Disponível em:
<<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, 2020